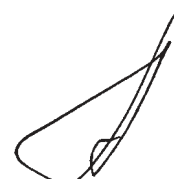


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НАРКОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

на правах рукописи



Григорьев Андрей Михайлович

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

02.00.02 – Аналитическая химия

**Диссертация
на соискание ученой степени доктора химических наук**

Москва – 2016

Содержание

Список сокращений и условных обозначений	4
Введение	6
Глава 1. Методология выявления метаболитов и артефактов ксенобиотиков в сыворотке крови и моче человека	12
1.1. Известные соединения	12
1.2. Неизвестные (не охарактеризованные) соединения	15
1.3. Основные термины	25
Заключение	27
Глава 2. Построение и преобразование поисковых ГХ и ГХ-МС библиотек	28
2.1. Система ГХ скрининга биологических объектов для определения известных ксенобиотиков	28
2.2. Обоснование зависимостей индексов от температуры и вида неподвижной фазы. Конвергенция удерживания членов гомологических рядов в условиях ГХ	31
2.3. Преобразования библиотек удерживания	42
Заключение	58
Глава 3. Выявление и идентификация метаболитов и продуктов деградации некоторых метаболизируемых и лабильных соединений методом ГХ-МС	60
3.1. Нерейстоксин	60
3.2. Дротаверин	74
3.3. Кветиапин	84
3.4. Димедрол	95
3.5. Краткие методические замечания по главе	101
Заключение.....	101
Глава 4. Выявление метаболитов нафтоиндольных, фенилацетилиндольных и бензоиндольных каннабимиметиков в моче и сыворотке крови человека и крыс	103
4.1. История появления синтетических каннабимиметиков на рынке психоактивных средств и общие подходы к определению нативных соединений .	103
4.2. Выявление и идентификация примесей, сопутствующих JWH-018 и JWH-073 в курительных смесях	109
4.3. Выявление метаболитов JWH-018.....	119
4.4. Выявление метаболитов JWH-073.....	140
4.5. Выявление метаболитов JWH-210.....	158
4.6. Выявление метаболитов JWH-250.....	170

4.7. Выявление метаболитов JWH-203.....	187
4.8. Выявление метаболитов JWH-251.....	203
4.9. Выявление метаболитов RCS-4.....	213
4.10. Выявление метаболитов AM-694.....	227
4.11. Выявление метаболитов AM-2233.....	236
4.12. Краткие методические замечания по главе	241
Заключение.....	242
Глава 5. Выявление метаболитов алканоильных и индазольных каннабимиметиков в моче человека. Циклогексилфенольный каннабимиметик CP47, 497 (C8)	244
5.1. Идентификация производных UR-144.....	244
5.2. Выявление метаболитов UR-144 и его производных	256
5.3. Выявление метаболитов AB-001.....	261
5.4. Выявление метаболитов АКВ-48 и АКВ-48F	279
5.5. Определение CP47,497(C8) в моче	281
5.6. Краткие методические замечания по главе	282
Заключение.....	283
Выводы.....	285
Список литературы.....	288
Приложение.....	318

Список сокращений и условных обозначений

Общая терминология

AC	derivatization by acetylation
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
EIC	экстрагированный ионный ток (Extracted Ion Current)
IT	масс-спектрометр типа «ионная ловушка»
Me	derivatization by methylation
MRM	режим регистрации нескольких ионов-продуктов столкновительной диссоциации (Multiple Reaction Monitoring)
PLOT	колонка со слоем пористого сорбента (Porous Layer Open Tubular)
QqQ	трехквadrупольный масс-спектрометр, в котором промежуточный квадруполь (гексаполь, октополь) использован как ячейка соударений
QqTOF	гибридный квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр с квадрупольной (гексапольной, октопольной) ячейкой соударений
SIM	режим регистрации выбранных ионов (Selected Ion Mode)
TFA	derivatization by trifluoroacetylation
TIC	общий ионный ток (Total Ion Current)
TMS	derivatization by trimethylsilylation
Артефакты	соединения, образующиеся в условиях пробоподготовки или инструментального анализа в результате протекания побочных реакций
ВЭЖХ-ДМД	высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием
ГХ	газовая хроматография
ГХ-МС	газовая хроматомасс-спектрометрия
ГХ-МС/МС	газовая тандемная хроматомасс-спектрометрия
ЖЖЭ	жидкостно-жидкостная экстракция
ЖХ	жидкостная хроматография
ЖХ-МС/МС	жидкостная тандемная хроматомасс-спектрометрия
ЖХ-МС ⁿ	жидкостная хроматомасс-спектрометрия с последовательной фрагментацией ионов
МС	масс-спектры, масс-спектрометрия
МСВР	масс-спектрометрия высокого разрешения
ОФ ВЭЖХ	обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
СК	синтетические каннабимиметики (каннабиноиды)
ТГК	Δ^9 -тетрагидроканнабинол
ТСХ	тонкослойная хроматография
ТФЭ	твердофазная экстракция
ХМС	хроматомасс-спектрометрия
ЭИ	электронная ионизация
ЭР	ионизация при электрораспылении с последующей столкновительной диссоциацией

Соединения

AB-001	1-адамантоил(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)метанон
AKB-48	<i>N</i> -адамантил-1-пентил-1 <i>H</i> -индазол-3-карбоксамид
AKB-48F	<i>N</i> -адамантил-1-(5-фторпентил)-1 <i>H</i> -индазол-3-карбоксамид
AM-2233	(2-иодфенил)(1-((1-метилпиперидин-2-ил)метил)-1 <i>H</i> -индол-3-ил)метанон
AM-694	(1-(5-фторпентил)-1 <i>H</i> -индол-3-ил)(2-иодфенил)метанон
CP47,497 C8	2-(3-гидроксициклогексил)-5-(2-метилнонан-2-ил)фенол
JWH-073	(1-бутил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)(нафталин-1-ил)метанон
JWH-018	нафталин-1-ил(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)метанон
JWH-203	2-(2-хлорфенил)-1-(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)этанон
JWH-210	(4-этилнафталин-1-ил)(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)метанон
JWH-250	2-(2-метоксифенил)-1-(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)этанон
JWH-251	1-(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)-2- <i>o</i> -толилэтанон
RSC-4	(4-метоксифенил)(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)метанон
UR-144	(1-пентил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)(2,2,3,3-тетраметилциклопропил)метанон

Введение

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 хромато-масс-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 хромато-масс-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 $\lg k' = f(n, 1/T)$ 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, дроптаверин, 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 термолиза 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 среднелетучих 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.

Дополнительный материал, не включенный в печатную версию данной работы, может быть получен от автора через E-mail chrzond4250@yandex.ru.

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

1.1 Известные соединения

Обнаружение некоего известного ранее соединения в анализируемой смеси является необходимым шагом, предшествующим любым последующим работам со смесью [1]. В данной работе рассматриваются, в основном, смеси биологического происхождения. Их специфика (наличие высоко вариабельной матрицы) и специфика целевых аналитов, общими особенностями которых можно считать органический характер, разнообразие, малое содержание и – нередко – низкую химическую и термическую стабильность, делают выбор методов анализа безальтернативным. В настоящее время необходимыми возможностями обладают только хроматомасс-спектрометрия, непосредственным результатом применения которой является характеристика удерживания и масс-спектра целевого аналита. Принятие решения об обнаружении аналита (как цели проводимого анализа) выносится на основании соответствия этих характеристик неким стандартным величинам [2] а, следовательно, процедура принятия решения базируется на вероятностной основе.

В настоящее время существует ряд профессиональных организаций, специализирующихся на выработке требований или рекомендаций, необходимых для вынесения решения об обнаружении аналита. В частности, это Food and Drug Administration (FDA) [3], European Union Commission (EUC) [4], College of American Pathologists (CAP) [5], World Anti-Doping Agency (WADA) [6], US Pesticide Agency [7]. В ряде пунктов их рекомендации принципиально различны, однако, в отношении важнейших критериев обнаружения – результатов процедур сравнения удерживания и масс-спектров – различия носят лишь количественный характер. При этом основной смысл процедуры принятия решения об обнаружении заключается в сравнении этих характеристик для обнаруженного и стандартного соединений (в ряде случаев допустимо использование ХМС библиотек). Поскольку масс-спектр является многомерной величиной, то для сравнения выбирают несколько (3 и более) характеристических пиков. Решение об обнаружении аналита принимается на основании соответствия интенсивностей этих пиков (выражаемых в абсолютных или относительных единицах), а также удерживания при учете допустимых диапазонов отклонений. Диапазоны отклонений, предлагаемые различными организациями, различны. Это же касается и выбора величин интенсивности – абсолютных или относительных.

Разумеется, само существование различных наборов критериев обнаружения предполагает наличие затруднений при разработке единой системы, которая устраивала бы все профессиональные сообщества. Правила обнаружения аналитов, предлагаемые различными

организациями, были подвергнуты критике [1, 8-10]. Ее суть сводится как к малой обоснованности допустимых отклонений, так и к бесспорному тезису о том, что существование единого набора правил, справедливого для обнаружения всего многообразия аналитов в сложных матрицах переменного состава (к которым относятся и биологические образцы), невозможно. Процедура обнаружения должна включать стадию рассмотрения результатов квалифицированным аналитиком [1, 8, 9], и, следовательно, не может быть полностью формализована.

Жесткое следование требованиям, сопровождающееся отказом аналитика от учета особенностей образцов приводит к росту числа ложных результатов. Важнейшим источником последних следует считать соэлюируемые соединения [10], наличие которых требует проведения процедур вычитания фона и определения чистоты пика обнаруживаемого аналита. Для этого программное обеспечение большинства хроматографов предлагает ряд алгоритмов, требующих указания величины постоянного или линейно изменяющегося фона; обычно отбор значений фона производят перед началом и после окончания пика аналита. Однако, ввиду очевидной сложности матриц биологических образцов, эти алгоритмы следует признать недостаточными. Гораздо более надежным способом получения «чистых» масс-спектров аналитов представляется процедура деконволюции, выполняемая программой Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS, NIST) [11, 12]. Отличия получаемых «чистых» спектров обнаруживаемых соединений от библиотечных выражаются количественной мерой – фактором совпадения (Match Factor). Важнейшей особенностью этого подхода является его эмпиричность: параметры алгоритма сравнения спектров оптимизированы на основании большого количества практических сравнений [13], что делает данный алгоритм практически значимым и свободным от безосновательных предположений. Вместо бинарной логики («соединение обнаружено – соединение не обнаружено»), базирующейся на жестких критериях обнаружения, указанный подход предлагает количественную меру – вероятность обнаружения соединения на основании подобия масс-спектров и удерживания с возможностью регулирования «штрафных очков», начисляемых за отклонения измеренных величин от библиотечных. Данный подход – при учете экспертизы результатов опытным аналитиком и замечаний, описанных далее – использован в предлагаемой работе.

Следует отметить, что фактор совпадения зависит от вида масс-спектра. Так, факторы совпадения для соединений, спектры которых почти полностью состоят из одного-двух интенсивных пиков при отсутствии (или малой интенсивности) пика молекулярного иона, несколько снижаются (хинин, производные амфетамина и прочие соединения, содержащие атомы азота в алифатическом окружении и т.п.). Этот факт отмечен как авторами поискового алгоритма NIST [12, 13], так и нашими наблюдениями. Поскольку подобное снижение

информативности масс-спектров не может быть скомпенсировано никакими манипуляциями по их обработке, то установление предельных величин факторов совпадений принципиально бессмысленно. Принятие решения об обнаружении должно базироваться на комплексном подходе к образцу, включающему его историю, обнаружение метаболитов и артефактов, и, разумеется – на результатах подтверждающих обнаружений.

В том случае, когда на основании результатов анализа принимаются решения, обладающие высокой значимостью (общественной, государственной, экономической и пр.), то для повышения достоверности требуется проведение подтверждающего анализа. Как правило, при выполнении подтверждающего анализа процесс подготовки пробы полностью повторяют. Наиболее жесткие требования к проведению анализов подобного типа предполагают применение методов, кардинально отличающихся по физическим принципам от тех методов, посредством которых аналиты были обнаружены первоначально. Исходя из данного требования и имеющегося набора инструментальных методов обнаружения, подтверждение может быть выполнено лишь посредством смены механизма разделения – переход от ГХ-МС к ЖХ-МС (или наоборот) [8-10]. Однако требование подобной смены является бесспорным лишь в теоретическом – общеконцептуальном – плане, поскольку его применение на практике ограничено:

- принципиальными затруднениями (нестабильностью или неприемлемым временем элюирования некоторых аналитов в условиях ГХ/ЖХ, разными пределами обнаружения);
- практическими затруднениями. Главным образом, это недостаточная оснащенность лабораторий – недостаток, неустранимый в среднесрочной перспективе (следует учесть, что аппаратура для ГХ/МС почти на порядок дешевле, нежели для ЖХ-МС/МС). Также, это жесткие требования ко времени выполнения анализа и затрат на его проведение. Кроме того, можно отметить, что публикуемые в настоящее время методы обнаружения (и количественного определения) как правило, относятся к области ЖХ-МС(/МС), благодаря его очевидным преимуществам по сравнению с ГХ-МС и, следовательно, повышению его роли в современных аналитических дисциплинах. К сожалению, такое предпочтение приводит к резкому уменьшению публикуемого методического материала для метода ГХ-МС (даже для тех аналитов, обнаружение которых данным методом не вызывает осложнений). Эта ситуация свидетельствует о том, что указанные выше жесткие требования к проведению подтверждающего анализа игнорируются *de facto*. Более того, обнаружение и подтверждение обнаружения аналита может быть реализовано в пределах лишь одного метода (в данном случае – ультра-ВЭЖХ-МС/МС) даже в области допингового анализа – области, прекрасно оснащенной аналитическим оборудованием и крайне требовательной к достоверности результатов [14].

Действительно, необходимая степень достоверности обнаружения аналита должна быть согласована с возможными затратами. Кроме смены принципа разделения, для проведения подтверждающих обнаружений могут быть использованы следующие подходы, обладающие практической значимостью.

1. Варьирование условий пробоподготовки и химическая конверсия аналитов при пробоподготовке.

1.1. Смена способа гидролиза, проводимого при деконъюгировании образцов. Минеральный (кислотный или основной) гидролиз – в отличие от ферментативного – нередко приводит к образованию артефактов пробоподготовки, природа которых согласуется с химическими свойствами аналита. При кислотном гидролизе освобождаются гидроксильные и амино- группы, в то время основной гидролиз приводит к освобождению карбоксильных групп.

1.2. Смена способа дериватизации аналита. Получение соединений, обладающих различными ХМС характеристиками.

2. Варьирование условий ГХ-МС анализа и термическая конверсия аналитов.

2.1. Изменение температурных характеристик разделения.

2.2. Изменение вида (селективности) неподвижной фазы.

2.3. Обнаружение ГХ артефактов при учете мест их формирования (инжектор или хроматографическая колонка).

3. Обнаружение продуктов химической (окислительная деградация, гидролиз, окисление) и биохимической (метаболизм) конверсии ксенобиотиков, происходящей в живых и мертвых тканях или биожидкостях. Эти соединения образуют «куст» или группу, объединенную происхождением от единой структуры – ксенобиотика, попавшего в организм. Рассмотрение таких соединений в качестве дополнительных аналитов значительно повышает достоверность анализа, а их выявление имеет как научную, так и практическую пользу. Наличие одного (в присутствии исходного соединения) или нескольких (в его отсутствии) метаболитов в биообразце можно считать безусловным подтверждением обнаружения, за исключением случаев возможного загрязнения образца. Последнее затруднение решается повторной пробоподготовкой.

Перечисленные подходы (включая смену механизма разделения) были использованы в данной работе, причем в качестве основного способа подтверждения принято варьирование условий ГХ-МС анализа (Глава 2).

1.2. Неизвестные (не охарактеризованные) соединения

Все описанное выше относилось к области наиболее распространенных задач в практике аналитической химии, решение которых предполагает наличие стандартных соединений, или

хотя бы их ХМС характеристик. Однако, заметный прогресс в области синтеза новых психотропных средств («дизайнерских наркотиков»), приводит к расширению круга этих задач. Первым шагом на пути их решения должно быть выявление новых, неизвестных ранее соединений, наличие которых в биологических образцах позволило бы предполагать употребление новых психотропных средств и которые впоследствии могли бы быть обнаружены. Структуры таких соединений изначально неизвестны, и для их установления не могут быть применены традиционные методы структурного анализа, принятые в органической химии (в т.ч. ядерный магнитный резонанс) из-за малого содержания. Однако, в этом случае для частичного определения их структурных характеристик вполне приемлемы хромато-масс-спектрометрические методы, позволяющие в совокупности с классическими химическими методами получать достоверные результаты [15-18].

В подавляющем большинстве случаев аналиты, которые необходимо выявлять в биологических образцах, отличаются по своим структурам от исходных соединений, поступающих в организм (ксенобиотиков) вследствие протекания ряда процессов. Как отмечалось выше, к ним можно отнести метаболизм и деградацию, соответствующих биохимической и химической трансформаций исходного соединения. Дополнительным путем вариации исходных соединений следует назвать образование артефактов в процессе подготовке проб или при хроматографическом элюировании.

Выявление метаболитов, артефактов и продуктов деградации токсических веществ, лекарственных и одурманивающих средств представляет собой частный – и наиболее сложный – вариант химико-токсикологического анализа [19-24]. Его особенность состоит в специфическом характере поведения значительного числа ксенобиотиков, молекулы которых подвержены экстенсивному метаболизму или легко трансформируются иными способами. Синтетические каннабимиметики (СК) – ввиду значительной гидрофобности своих структур – являются яркими представителями такой группы. Результатом этих процессов является отсутствие или малое содержание неизмененных ксенобиотиков в моче и быстрое их выведение из системного кровотока. Это приводит к необходимости поиска биомаркеров, в качестве которых и могут применяться продукты трансформации и биотрансформации исходных соединений. В области решения этой задачи пересекаются цели аналитической химии (определение состава образца) и химико-токсикологического анализа (определение причины отравления).

В большинстве случаев результаты применения методов ХМС не позволяют точно устанавливать структуры неизвестных соединений, по крайней мере, из-за возможности существования изомерных форм. Обычно положение функциональных групп, приобретенных в результате химической или биохимической конверсии, остается неопределенным в пределах

структуры фрагментного иона, состав которого известен или обоснованно предполагается. С другой стороны, малое содержание аналитов делает невозможным применение методов ЯМР, а выполнение встречного синтеза крайне затруднительно. Поэтому – в условиях быстрого появления новых одурманивающих соединений – общие подходы к поиску и установлению структур их биомаркеров модифицируются следующим образом:

- ввиду распространения методов, предоставляющих существенную информацию о структурах и ориентированных на работу с малыми количествами вещества (масс-спектрометрия высоко разрешения, МСВР, регистрация последовательной фрагментации в масс-спектрометрах типа «ионная ловушка»), снижается необходимость проведения времязатратных стандартных процедур, принятых при выполнении идентификации новых соединений (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 (Глава 4).

В сложившихся условиях на первый план выступает задача быстрого выявления тематических аналитов – соединений, экскретируемых человеческим организмом или присутствующих в трупных средах, частичное или полное определение их структурных характеристик, что в итоге позволяет выяснять характер ксенобиотиков, попадающих в организм. Следует отметить, что в данном случае – для включения найденных соединений в список предполагаемых биомаркеров – необходимо и достаточно доказать существование связи между исходным и экскретируемыми (депонированными) соединениями, а также максимально сузить круг их предполагаемых структур. Полноценная идентификация выявленных аналитов, которая обычно выполняется посредством синтеза соединений-кандидатов (и после которой возможны производство и продажа аналитических стандартов и проведение количественного анализа), может быть выполнена впоследствии; эта область задач выходит за рамки предлагаемой работы. Характеристики выявленных соединений используются при их последующем ХМС обнаружении в биообразцах, причем методом пробоподготовки можно считать метод, примененный при выявлении.

Как отмечено выше, ксенобиотик, попадающий в организм, может образовывать целый ряд структурно-подобных соединений. В этом случае следует выбрать те из них, которые наиболее пригодны для рутинных обнаружений. Такой отбор осуществляли по двум критериям: высокая относительная интенсивность соответствующих хроматографических сигналов, отвечающая содержанию и максимальное подобие структуре исходного (неизмененного) ксенобиотика. Нередко результаты отбора по данным критериям приводили к

противоположным результатам, и окончательный выбор мог являться лишь следствием компромиссных решений.

Результатом работ по выявлению является создание методов предварительного качественного анализа, отвечающих на вопросы о присутствии данных аналитов в биообразцах. Здесь важно отметить, что область неопределенности при выявлении соединения относится к его структурным особенностям, однако происхождение выявленного соединения считается достаточно достоверным. Высокая степень достоверности обеспечивается модельными экспериментами, а также обнаружением разнообразных производных.

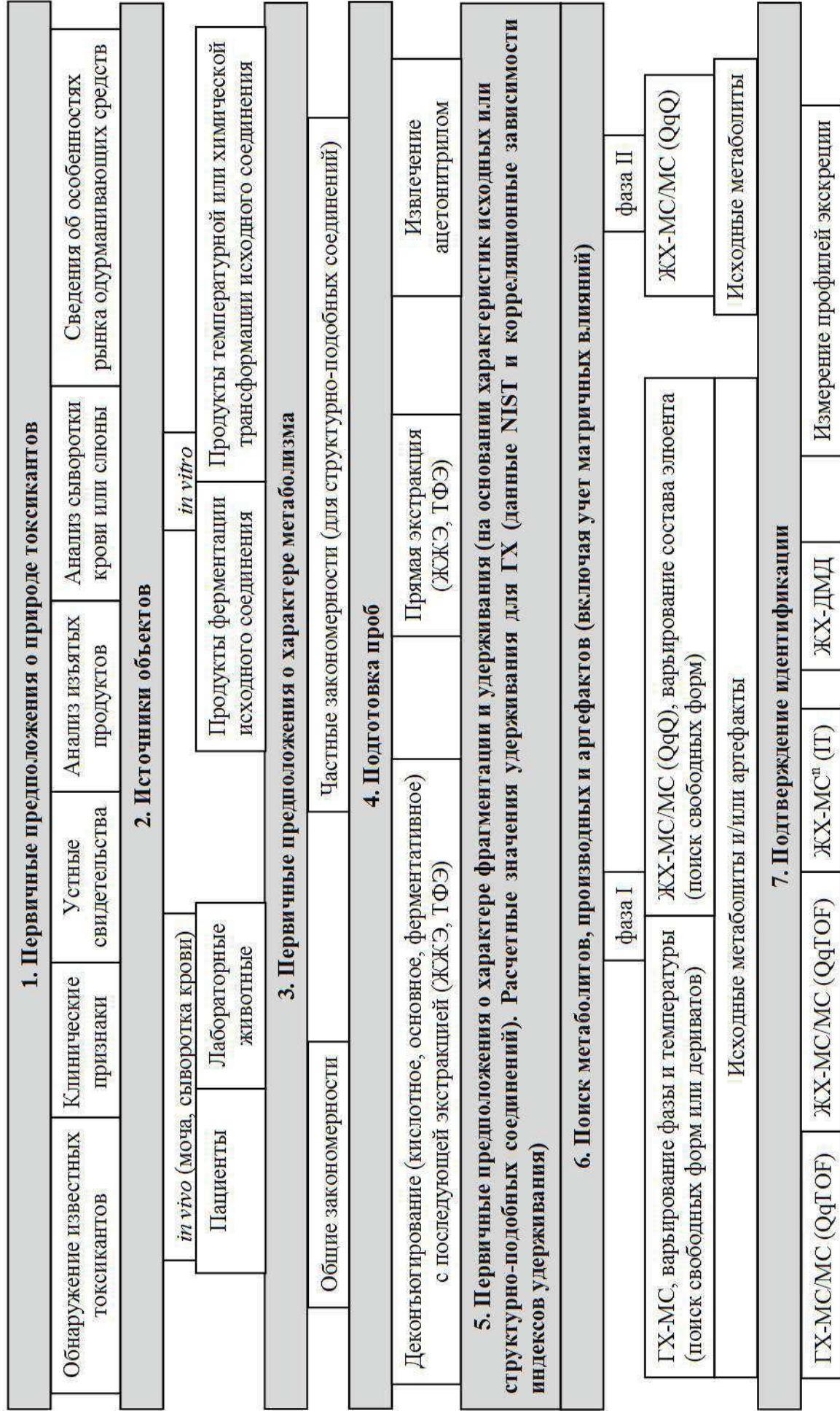
Наиболее сложная область задач, встречающаяся при выявлении, формируется в распространенной ситуации, когда аналитику неизвестно, какие ксенобиотики попадали в организм. При этом:

- неочевиден сам факт поступления ксенобиотика в организм человека;
- неизвестна его структура, и, следовательно, химические свойства, термическая стабильность и ХМС характеристики;
- неизвестна возможность экскреции ксенобиотика, продуктов его возможной химической и биохимической (метаболиты) конверсии с мочой – объектом, наиболее часто используемым при химико-токсикологическом анализе;
- неизвестны продукты метаболизма, их химические свойства, термическая стабильность и ХМС характеристики.

Решение подобных задач может быть лишь комплексным, и далеко не все подходы относятся к области аналитической химии, хотя они могут быть совершенно необходимы для достижения результатов. Методология поиска аналитов (метаболитов, артефактов, продуктов деградации) как новых (неизвестных ранее) соединений будет рассмотрена на примере СК, поскольку в данной работе им уделено основное внимание. Эта методология может быть применена и для иных подобных задач, в том числе тех, решение которых рассмотрено в Главе 3. Общая последовательность действий, позволяющих решать подобные задачи, представлена на Схеме 1.1. Далее приведены комментарии по ее основным пунктам.

1. Первичные предположения о природе токсикантов. Как правило, выявление должно базироваться на дополнительных сведениях об образце – его истории и особенностях его образования. Такая информация позволяет значительно сузить круг предполагаемых структур и, следовательно, повышает достоверность выявления. Основная цель данного пункта – поиск представительных образцов, что в условиях многообразия одурманивающих средств представляет собой серьезное затруднение.

Схема 1.1. Общая последовательность выявления метаболитов и артефактов



Простейшую сортировку мочевых образцов, поступающих в химико-токсикологическую лабораторию, выполняли посредством качественных определений известных ксенобиотиков, их метаболитов и артефактов быстрыми обзорными методами (иммуноферментные методы анализа и ГХ-МС). Отрицательный результат таких определений позволяет считать образец перспективным для дальнейшего поиска биомаркеров употребления новых соединений. Для быстрого скрининга образцов на присутствие известных соединений необходимо наличие обширных поисковых ГХ-МС библиотек, способы построения которых приведены в Главе 2.

Данный метод сортировки не может считаться исчерпывающим, поскольку прием сразу нескольких одурманивающих средств не является редкостью. В этом случае отбору образцов могут способствовать свидетельства, получаемые от пациентов наркологических диспансеров или анализ изъятых у них объектов, предназначенных для одурманивания (таблетки, порошки, жидкости, растительный и резиноподобный материал и пр.). В ряде случаев опытный врач-нарколог способен предположить причину одурманивания с большой достоверностью.

Важными возможностями при выдвижении предположений о причине одурманивания следует считать информацию о предпочтениях персон, составляющих группы риска в конкретной местности и о появлении новых соединений на рынке психотропных средств. Реализация этих возможностей достигается на основании опыта работы аналитика, информации получаемой от правоохранительных органов (в т.ч. службы по контролю за оборотом наркотиков, ФСКН), а также благодаря ресурсам Интернет.

Наиболее надежным показателем употребления новых ксенобиотиков является их наличие в слюне или в сыворотке крови в неизменном состоянии, и в этом случае соответствующие мочевые образцы, собираемые через 3-10 часов после предполагаемого момента приема с высокой вероятностью пригодны для проведения работ по поиску метаболитов. Однако, отбор крови вследствие инвазивного характера нежелателен и в целом, применяется редко. Отбор слюны необычен для практики наркологических диспансеров и не обеспечен необходимым оборудованием. Кроме того, из-за малого содержания, для анализа образцов слюны наиболее пригоден дорогостоящий метод – жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС).

2. Источники объектов. *In vivo*. Источником образцов человеческой мочи выступали наркологические диспансеры, клинические больницы и их отделения ряда городов РФ. Образцы отбирали согласно критериям и возможностям, перечисленным в п. 1.

Число представительных образцов мочи предназначенных для поиска метаболитов всегда превышало 5 шт. В ряде случаев пациенты точно указывали время приема СК, что позволяло измерять динамику экскреции метаболитов. Следует отметить, что обычным способом приема СК является ингаляция (курение растительных или иных горючих смесей,

вместе с нанесенными на них психотропными соединениями), причем данный способ обусловлен необходимостью создать достаточную концентрацию СК в крови в условиях их быстрого и полного метаболизма. Часть образцов мочи была отобрана у персон после перорального употребления ими СК.

Используемым лабораторным животным (крысы, Wistar) вводили суспензии СК интрагастрально или интраперитонеально, наблюдали за изменением поведения и собирали мочу. Этот (считающийся одним из канонических) способ изучения мочевого метаболизма продемонстрировал весьма ограниченный результат, что связано со значительными различиями метаболического профиля СК у крыс и у людей (Глава 4). Тем не менее, некоторые метаболиты СК в образцах мочи крыс и людей были найдены идентичными.

In vitro. Исследование продуктов ферментации ксенобиотиков на печеночных микросомах или в гепатоцитах позволяет определить основные направления метаболизма, но не указывает прямо на целевые соединения, которые надлежит искать в биообразцах. При данном способе продуцируется значительное количество метаболитов, действительное содержание которых в моче (в виде конъюгатов или в свободном состоянии) может быть минимальным, что приводит к затруднениям при работе с реальными образцами. Кроме того, стоимость соответствующих наборов реагентов достаточно высока. В рамках данной работы подобные исследования не проводили.

Дополнительным ограничением способа исследования метаболизма *in vitro* следует считать некоторую неопределенность в обозначении соединений, действительно абсорбируемыми легкими и попадающими в кровь курильщика. Примером этого ограничения служит СК UR-144 (и его аналоги, содержащие замещенный циклопропановый остаток) характеризующийся малой термической или химической стабильностью. В данном случае следует изучать свойства исходного СК, и только затем выдвигать предположения о характеристиках биомаркеров (Глава 5).

3. Первичные предположения о характере метаболизма. Наиболее распространенное следствие первичной стадии метаболизма (фаза I) – появление в структурах ксенобиотиков новых, большей частью гидрофильных функциональных групп. Это может произойти либо при упрощении исходной структуры (дезалкилирование, гидролиз и пр.), либо при ее усложнении (гидроксилирование, карбоксилирование и пр.). Многообразии возможных метаболических путей, их зависимость от структурных особенностей ксенобиотика [25-27] и, следовательно, затруднений в предсказании структур получающихся соединений делает данный пункт наименее обоснованным в Схеме. Тем не менее, правильность этого предсказания определяет вероятность правильного выбора метода подготовки проб. Ошибочные предположения имеют

следствием необходимость варьирования вариантов пробоподготовки и дериватизации (для ГХ-МС).

Касаясь частных закономерностей метаболизма ксенобиотиков, рассматриваемых в данной работе, можно отметить, что существует ряд публикаций об особенностях соединений, рассмотренных в Главе 3 (нереистоксин, дротаверин, кветиапин, и, разумеется, димедрол). Нами описаны результаты, дополняющие имеющиеся сведения, что позволило использовать их в аналитической практике.

На момент начала работ по синтетическим каннабимиметикам, существовала только одна публикация, рассматривающая метаболизм одного нафтоиндольного производного, не имеющего наркологического значения (JWH-015) *in vitro* [28] – и эта публикация была для нас единственной опорной точкой в данной области.

4. Подготовка проб. Выбор способов подготовки проб, разумеется, также осложнялся скудностью информации о характере выявляемых соединений. Специфика биоматериалов заключена не только в их сложности, (и, следовательно, высокой вероятности разнообразных матричных влияний), но и в разнообразии форм, в которых могут существовать искомые соединения. В первую очередь это касается метаболических процессов фазы II (конъюгирования) – связывания метаболитов фазы I с гидрофильными соединениями (уроновые кислоты, аминокислоты, глутатион и пр.). Конъюгирование возможно при наличии соответствующих функциональных групп (гидроксильных, карбоксильных, тиольных, первичных и вторичных аминных и.т.п.), имеющих у исходных соединений или появляющихся при метаболизме. Доля метаболитов фазы I, связанная в конъюгаты (метаболиты фазы II) обычно неизвестна, но может предполагаться на основании степени гидрофобности метаболитов фазы I. Последняя приблизительно оценивается по удерживанию в режиме обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Молекулы метаболитов СК, в целом, гидрофобны и (кроме ряда метаболических форм AM-2233 и карбоксилированных метаболитов) не ионизируются в водных растворах, по крайней мере, в диапазоне *pH* 2-9. Несмотря на то, что элюирование конъюгированных форм возможно методами ЖХ, подобный вариант анализа неудобен из-за затруднений, возникающих как при самом элюировании, так и при МС идентификации. Поэтому в процесс пробоподготовки, как правило, включена стадия деконъюгирования (гидролиза), метаболитов фазы II. Эту стадию можно считать наиболее ненадежной областью всего процесса, поскольку ее контроль – в полуколичественном плане – крайне затруднителен. В целом, деконъюгирование осуществляют ферментативными или минеральными способами.

При ферментативном деконъюгировании к образцу (обычно мочевому) добавляют раствор соответствующего фермента (преимущественно, характеризующегося

глюкуронидазной и/или сульфатазной) активностью, подстраивают pH и инкубируют некоторое время, после чего экстрагируют образовавшиеся метаболиты фазы I. Преимуществом ферментативного гидролиза является мягкость процесса, минимизирующая образование артефактов пробоподготовки, недостатками – возможная селективность ферментативных реакций, приводящая к искажениям наблюдаемого метаболического профиля и высокая стоимость.

При минеральном деконъюгировании мочевые образцы обрабатывают кислотами (обычно HCl) или основаниями (обычно NaOH) при нагревании. Выбор pH при деконъюгировании определяется предположениями о виде метаболитов фазы II (характером связи метаболита фазы I и остальной частью структуры конъюгата). В основном, кислотный гидролиз позволяет разрушать эфирные связи между метаболитами фазы I и уроновыми кислотами, основной – быстро омылять соответствующие сложные эфиры. Таким образом, первый способ более пригоден для гидроксилированных метаболитов, а второй – для карбоксилированных. Достоинством метода можно считать высокую эффективность протекания гидролиза и малую стоимость, недостатком – вероятность образования артефактов пробоподготовки. В частности, кислотный гидролиз, обычно осуществляемый при нагревании образцов в течение часа при 90-100°C в присутствии ~3 М HCl (Приложение 1) может приводить к дегидратации (Глава 4). Тем не менее, обнаружение артефактов пробоподготовки и определение их структурных характеристик нередко способствовали детализации структур выявляемых метаболитов.

Если метаболиты присутствовали в образце преимущественно в формах фазы I, или выполняли определение исходного (не метаболизированного) ксенобиотика, или деконъюгирование уже проводили, то образцы экстрагировали методами жидкостно-жидкостной (ЖЖЭ) или твердофазной (ТФЭ) экстракции при условии контроля pH водной фазы. Последнее определяется либо ионизируемостью аналитов в водной среде, либо (при отсутствии ионизируемости) снижением количеств соэкстрагирующихся матричных соединений. Поскольку гидролизованные образцы мочи, как правило, богаты кислотами, то (для экстракции неионизирующихся аналитов) предпочтительна экстракция из основных водных растворов.

Определение ионизируемости аналитов – и, следовательно, фиксации наличия протонируемых атомов азота и (или) карбоксильных групп может понадобиться не только для обнаружения, но и для оптимизации пробоподготовки. Эту процедуру выполняли методом ВЭЖХ-ДМД (высокоэффективной жидкостной хроматографией с диодно-матричным детектированием) и ЖХ-МС/МС (Главы 3 и 5), и она совершенно необходима при определении лабильных равновесных форм. Оценка величин pK_A способствует детализации структур.

Определение наличия атомов азота возможно и с помощью ГХ с термоионным (азотно-фосфорным) детектором, но подобный подход приемлем только для работы с достаточно концентрированными соединениями при сравнительно бедной матрице, и поэтому нами не применялся.

ЖЖЭ предпочтительнее ТФЭ в условиях ограниченной информации о выявляемых соединениях и – в особенности – при использовании ионообменных режимов ТФЭ ввиду затруднений при прогнозировании удерживания. С другой стороны, правильно реализованный ионообменный режим ТФЭ позволяет получать очень чистые элюаты. К сожалению (как отмечено выше), молекулы СК преимущественно не ионизируются, а гидрофобные режимы ТФЭ при экстракции высоко гидрофобных аналитов (в т.ч. многих метаболитов СК) не характеризуются высокими степенями отделения от матричных соэлюатов. ТФЭ, проведенная в гидрофобном режиме, может быть предпочтительна при выделении соединений меньшей гидрофобности (производные нереистоксина, Глава 3).

Осаждение белков ацетонитрилом или трихлоруксусной кислотой перед экстракцией удобно для анализа сред с богатой белковой матрицей (сыворотка крови). Недостатком такого метода является возможность соосаждения аналитов, что необходимо контролировать при создании методик. В данной работе анализ сыворотки проводили редко, и поэтому стадией осаждения пренебрегали. При ТФЭ сыворотки отмечали значительные потери аналитов, что объясняли их гидрофобным связыванием с белками, и поэтому немногочисленные образцы сыворотки экстрагировали только методом ЖЖЭ.

5. Первичные предположения о характере фрагментации и удерживания (на основании характеристик исходных или структурно-подобных соединений). Расчетные значения удерживания для ГХ (данные NIST и корреляционные зависимости индексов удерживания). Наиболее верные предположения формируются на основе хроматомасс-спектрометрических 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 также приемлемы, в особенности, при отсутствии информации об исходном соединении (Глава 2).

6. Поиск метаболитов и артефактов (включая учет матричных влияний). Наиболее удобным начальным методом поиска является метод ЖХ-МС/МС (QqQ), позволяющий достаточно быстро обозначить искомые соединения согласно их массам (в режиме регистрации спектра ионов-предшественников) и провести первичную структурную оценку основных метаболитов (в режиме регистрации спектров ионов-продуктов). Однако, данный метод весьма дорог, что накладывает ограничения на время проведения работ. Кроме того, сравнительно

малая эффективность набивных ЖХ колонок затрудняет разделение и (нередко) не позволяет получать надежные спектры. С другой стороны, высокая эффективность капиллярных ГХ колонок (по сравнению с ЖХ колонками) облегчает разделение и обнаружение изомерных форм, позволяет проводить деконволюцию пиков (в автоматическом или ручном режимах) и получать чистые масс-спектры. Варьирование способа дериватизации и определение ГХ-МС характеристик дериватов (включая образование ГХ артефактов) позволяют получать чрезвычайно важную информацию о структурных особенностях метаболитов (Главы 3-5).

7. Подтверждение обнаружения и структурных характеристик. Информация, подтверждающая как сам факт обнаружения соединения, так и его структурные особенности может быть получена как с помощью более сложных (и, как правило, более дорогих) ХМС методов, так и сравнительно простыми способами: определением характеристик экскреции найденных метаболитов и регистрацией УФ-спектров метаболитов методом ВЭЖХ-ДМД, (при их достаточном содержании и выборе режимов, минимизирующих соэлюирование с матричными соединениями). При наличии уверенности в правильности интерпретации ХМС характеристик, получаемой при выявлении структурно-подобных соединений, применение п. 7 не обязательно. В данной работе действительная потребность в выполнении подтверждающих измерений (регистрация спектров высокого разрешения и точных масс, qTOF) возникла только при определении структурных характеристик некоторых метаболитов АМ-2233, хотя подобные спектры регистрировали и при уточнении структур метаболитов других СК (JWH-018, АКВ-48 и АКВ-48F). Для повышения надежности аналитического заключения о присутствии аналитов в образце следует использовать стандартные соединения, синтезированные на основании полученных данных.

Почти вся предлагаемая работа выполнена на основе исследований реальных биообразцов, направленных для проведения химико-токсикологических экспертиз в ряде городов России. Кроме того, использовали образцы мочи и сыворотки крови, собранные у лабораторных животных. Модельные смеси применяли лишь при исследованиях удерживания членов гомологических рядов (Глава 2) и при создании методик количественного анализа (Глава 3).

1.3. Основные термины

Для последовательного изложения предлагаемой работы необходима четкая формулировка основных применяемых терминов. И, поскольку в настоящее время данная область терминологии является дискуссионной, то некоторые часто применяемые термины могут носить лишь условный характер. Таким образом, следует обозначить их смысл, который

будет использован в дальнейшем изложении. Определение терминологии связано с представлением общего методологического подхода, использованного в данной работе.

Обнаружение (в международной литературе – идентификация, *identification*) – результат проведения комплекса аналитических мер качественного характера, отвечающий на вопрос о присутствии обнаруживаемого соединения (аналита) в анализируемом биологическом образце на основании известных физико-химических характеристик [1]. Для данной работы это хроматографическое удерживание, масс-спектры (МС) и, учитывая методы подготовки проб, – химические свойства обнаруживаемого соединения. Количественные характеристики процедуры обнаружения могут быть отнесены лишь к степени достоверности измеряемых (вычисляемых) параметров – хроматографического удерживания и наличия (или относительной интенсивности) масс-спектрометрических пиков. Термин «обнаружение» относится к анализам, существование которых доказано ранее, а необходимые характеристики аналита – удерживание и масс-спектры – известны. Для определения данного вида анализа в международной литературе обычно используется термин «*targeting analysis*».

Подтверждение (*confirmation*) – проведение аналитических процедур качественного характера, предназначенных для вторичного обнаружения аналитов при существенном изменении условий.

Говоря о современной практике химико-токсикологического анализа (и с развитием иммунохимических и иммунохроматографических методов, ИХА) следует отметить, что к понятию «обнаружение» обычно относят проведение иммунохимического, а к понятию «подтверждение» – ХМС анализа. Несмотря на широкие возможности ИХА в области быстрого скрининга образцов, такая трактовка в данной работе игнорируется из-за ограничений метода ИХА, среди которых основными являются групповой характер обнаружения и недостаточный охват всего разнообразия подконтрольных аналитов.

Идентификация (*identification*, идентификация неизвестного, *identification of unknown*) – надежное установление структуры соединения, базирующееся в первую очередь, на основании применения физико-химических и химических методов, предоставляющих наиболее достоверную информацию (в том числе ядерный магнитный резонанс, ЯМР, масс-спектрометрия высокого разрешения, МСВР, и встречный синтез). В основном, данный термин применим для описания работ с теми соединениями, о существовании которых не сообщалось ранее или с теми, некоторые характеристики которых неизвестны или труднодоступны, причем происхождение и история анализируемого образца согласуются с природой идентифицированных компонентов. В последнем случае для идентификации достаточно выполнения структурной интерпретации на основе масс-спектров и удерживания, хотя в данной работе были привлечены и некоторые дополнительные методы.

Выявление (предполагаемая или рабочая идентификация, tentative identification) – комплекс мер, направленных на установление предполагаемой структуры нового (неизвестного ранее) соединения и применяемый, как правило, в условиях работ с малыми количествами выявляемого соединения с помощью методов, предназначенных для работ с малыми количествами аналитов.

Заключение

Методология поиска и определения структурных характеристик метаболитов и продуктов трансформации ксенобиотиков основана на совместном применении ХМС методов (включая предположения о фрагментации и удерживания) и химических методов (включая образование артефактов, а также дифференциацию свойств аналитов при изменении режима подготовки проб и дериватизации). Обнаружение известных ранее соединений производится с помощью алгоритмов AMDIS (NIST) при обработке газовых масс-хроматограмм, подтверждение – сменой условий хроматографирования (переход от газовой к жидкостной ХМС, варьирование условий ГХ-МС и пробоподготовки, обнаружение метаболитов и артефактов).

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

Быстрый обзорный анализ (скрининг) следов токсических, наркотических, психотропных и сильнодействующих лекарственных соединений в биожидкостях, тканях и других биологических материалах является основой токсикологических исследований [29, 30]. В этой области доминирует метод хроматомасс-спектрометрии [14-16, 31-33] благодаря возможности воспроизводимо регистрировать масс-спектр и удерживание определяемых компонентов. Совершенствование технологий изготовления капиллярных колонок для ГХ, покрытых слоем неподвижной фазы и обладающих воспроизводимыми характеристиками [34-40], позволило создавать обширные библиотеки параметров удерживания (далее – библиотеки удерживания), которые могут использоваться в качестве поисковых при автоматической обработке хроматограмм без применения аналитических стандартов [11, 12]. Поскольку геометрические характеристики колонок, а также разнообразие конструкций и правильность работы узлов хроматографа (пневматических и температурных регуляторов) не могут обеспечивать необходимую долговременную воспроизводимость абсолютного удерживания аналитов, то применение библиотек удерживания возможно лишь на относительной основе. Учитывая огромный материал, накопленный за время применения метода ГЖХ для анализа смесей органических соединений, а также очевидный физический смысл индексов удерживания (что необходимо при идентификации неохарактеризованных ранее соединений), мы полагаем, что метод стандартизации параметров удерживания на основе индексов является предпочтительным.

2.1. Система ГХ скрининга биологических объектов для обнаружения известных ксенобиотиков

Для автоматизированного обнаружения известных токсикантов и лекарственных соединений необходимы поисковые библиотеки, сформированные для хроматографических условий, принятых в аналитической лаборатории в качестве стандартных. Сформированная нами система ГХ и ГХ-МС скрининга (Таблица 2.1) предполагает использование двух типов колонок при определении среднелетучих и труднелетучих аналитов (№№ 1 и 2) и, по крайней мере, трех типов колонок (№№ 3, 5, 6 или 4-6) для детектирования летучих соединений.

Для метода ГХ-МС обнаружение ксенобиотиков, их метаболитов, артефактов и ряда матричных соединений биологических образцов (средне- и труднелетучие соединения) выполняется с помощью поисковой программы Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS, NIST) на основании двух независимых критериев: сходства масс-спектра и индекса удерживания аналита [11, 12, 41].

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, VF-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]					
МС ТИД ПИД	МС	ПИД ЭЗД МС	ПИД МС	ПИД ЭЗД	ПИД
[детектор]					
3 температурных режима		МС при выявлении неизвестных соединений		PLOT колонка	насадочная колонка
[примечание]					

Как отмечено в Главе 1, использование разных условий анализа для основного и дополнительного (подтверждающего, верификационного) определения аналитов является одним из общих требований при обнаружении ксенобиотиков [8-10, 14]. Это касается также селективного изменения удерживания при изменении температурного режима или смене используемой фазы – т.е. способов, применяемых при разделении сложных смесей, содержащих соэлюирующиеся аналиты, индивидуализация спектров которых при использовании AMDIS может быть затруднена. Поскольку ГХ разделение сложных смесей выполняется, как правило, при градиентном режиме работы колонки (причем приняты линейные градиенты), а значительное число тематических аналитов выходит из колонки на градиентной стадии, то целевой величиной принят линейный индекс удерживания. Кроме того, на использование линейных индексов ориентированы алгоритмы AMDIS.

Обзорный (скрининговый) анализ биообразцов при определении средне- и труднолетучих соединений включает следующую последовательность.

- подготовка проб методами экстракции из основных растворов после кислотного деконъюгирования, а также без него (см. Приложение);
- дериватизация ацелированием (АС) деконъюгированных образцов и/или основных экстрактов;
- анализ методом ГХ-МС (режим I, см. Приложение).

В зависимости от специфичности аналитической задачи, в эту схему могут быть включены следующие стадии:

- подготовка проб методами экстракции из кислых растворов и/или основное деконъюгирование (при определении кислот);
- ферментативное деконъюгирование (при определении лабильных соединений);
- специфичная подготовка проб (например, при определении клонидина);
- дериватизация триметилсилилированием (при определении кислот и синтетических каннабимиметиков или трифторацетилированием (для некоторых азотосодержащих соединений));
- анализ методом ГХ-МС (режим II и III – для слабо- и сильноудерживающихся соединений, соответственно);

Формирование и пополнение ГХ и ХМС библиотек. Поскольку возможности автоматизированного поиска определяются присутствием ХМС характеристик аналитов в поисковых библиотеках, то последние нуждаются в непрерывном пополнении. Обнаружение подконтрольных средне- и труднолетучих аналитов осложняется как их значительным (единицы тысяч) и постоянно увеличивающимся количеством [11, 42-50], так и отсутствием унифицированных методов измерения параметров удерживания.

Для поиска и определения ХМС характеристик обнаруживаемых аналитов использовали следующие источники.

1. Сформированные сторонними работниками и распространяемые (платные или бесплатные) хроматомасс-спектрометрические и масс-спектрометрические библиотеки общего и тематических назначений. Важным источником являются публикации в печатных изданиях и на тематических сайтах Интернет.

Следует учесть, что величины удерживания (если они приведены в библиотеках), а также условия их измерения, скорее всего, будут отличаться от тех, которые приняты в конкретной аналитической лаборатории. Удерживание чаще всего выражают в индексах или фиксированных временах. Условия анализа могут отличаться по температурным, пневматическим режимам (постоянство потока или давления), по геометрическим характеристикам колонок, по виду и полярности неподвижной фазы. Следовательно, должны существовать способы пересчета сторонних величин удерживания. Приблизительные значения индексов, получаемые этим способом, могут использоваться для принятия решения об идентификации аналита и включению его во внутрилабораторную библиотеку при условии соответствия его масс-спектра. Методы пересчета величин удерживания рассмотрены в подразделе 2.3 данной Главы.

В том случае, когда сторонняя библиотека вообще не содержит величин удерживания, то приблизительные значения индекса удерживания могут быть получены расчетными методами. Аддитивный метод расчета индексов (Зенкевич с соавт.) реализован в известной поисковой

программе MS Search (NIST, USA) [51]. Поскольку эти индексы ориентированы на неполярные фазы, то они могут быть пересчитаны для применения на слабополярных или среднеполярных фазах (раздел 2.3). Следует учесть, что в этом случае получаемые значения являются лишь ориентировочными.

Как отмечено в Главе 1, присутствие сопутствующих соединений (продуктов химической и биохимической конверсии) является признаком, подтверждающим достоверность обнаружения.

2. Результаты процедур ГХ дериватизаций. ХМС характеристики дериватов реже присутствуют в публикациях и библиотеках. Однако такие данные легко получаются посредством соответствующих синтетических процедур [52, 53] и определением ХМС параметров получаемых соединений. Осложнением подобного подхода нередко является формирование артефактов ГХ или пробоподготовки. Такие случаи рассмотрены в Главах 3-5.

3. Данные, получаемые при работе с соединениями, ХМС характеристики которых отсутствуют или с соединениями, охарактеризованными ХМС методами лишь частично при известности условий их существования (или получения). В этом варианте задача может быть решена только интерпретациями МС самого соединения и/или его дериватов (Глава 3); индекс удерживания рассчитывается методами, перечисленными выше (п. 1).

4. Новые (неизвестные ранее) соединения, выявляли методами, перечисленными в Главе 1.

Полученные ХМС характеристики включали в поисковые библиотеки (более 1000 веществ, известных ранее и не рассматриваемых в качестве выявляемых в данной работе) для использования в скрининговом анализе. ХМС характеристики соединений, идентифицируемых или выявляемых различными способами, приводятся в Главах 3-5.

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. Приводимые величины удерживания (обычно времена) также пересчитываются в индексы указанными методами.

2.2. Обоснование зависимостей индексов от температуры и вида неподвижной фазы.

Конвергенция удерживания членов гомологических рядов в условиях ГХ

Несмотря на то, что вопрос о селективности газохроматографических фаз и их полярности существовал со времен создания ГХ как метода [54, 55], в настоящее время этот вопрос нельзя считать решенным. Сложившаяся ситуация определилась фундаментальными сложностями: нерешенной проблемой жидкого состояния и очевидными сложностями в описании процессов, происходящих на поверхностях (в том числе – на поверхностях

полужидких фаз). Длительное время при попытках решения этой проблемы доминировал описательно-классификационный подход [55], при котором фазы старались разделить по группам селективности согласно их возможностям по разделению неких «тестовых» соединений и определению вкладов различных видов межмолекулярных взаимодействий [56-60]. Индексы удерживания – одна из характеристик фаз, имеющая непосредственный практический смысл. Несмотря на то, что к настоящему времени разработаны многочисленные основы для определения индексов, гомологическую *n*-алкановую шкалу следует признать бесспорным лидером в стандартизации удерживания на различных фазах [61, 62].

В настоящее время капиллярные колонки фабричного изготовления практически вытеснили все остальные возможные варианты в практической области, что объясняется совершенствованием технологий изготовления капиллярных колонок, и – что немаловажно – появлением сравнительно дешевых и надежных ГХ масс-спектрометров [34, 40]. Огромный – и постоянно увеличивающийся в 20-м столетии – список хроматографических фаз, наносимых на эти колонки [54, 55], свелся к немногочисленным вариантам, охватывающим почти весь диапазон условной полярности: от наименее полярных метилсилоксановых фаз к наиболее полярным фазам на основе полиэтиленгликолей [40]. Постоянство характеристик выпускаемых ГХ фаз (колонок) позволяет создавать библиотеки удерживания и масс-спектров, обеспечивающие возможность надежной идентификации аналитов без использования стандартных соединений.

Величины индексов удерживания зависят от температуры (например, [63, 64]); в наиболее общем случае эта зависимость положительная [54, 65, 66]. Кроме того, алкановые индексы аналитов, более полярных, нежели соединения используемой шкалы, растут при увеличении условной полярности неподвижной фазы. Учитывая приведенные выше ограничения, в настоящее время не представляется возможным прогнозировать эти изменения настолько надежно, чтобы полученные результаты были сопоставимы по точности с экспериментально измеренными значениями. Однако, для грубых оценок можно воспользоваться корреляционными зависимостями (Глава 2.3), и эти зависимости могут быть обоснованы.

Для обоснования мы обратили внимание на предположение о сходимости удерживания членов гомологических рядов (являющихся основой для большинства индексных систем) при определенной температуре в некоей точке – точке конвергенции (ТК). Это любопытное (хотя, как отмечалось, предполагаемое) свойство гомологических рядов объясняется энтальпийно-энтропийной компенсацией удерживания, причем точка (или зона) конвергенции (компенсации) обычно находится вне практически возможных характеристик хроматографической системы – в зоне эксклюзии аналитов (Рисунок 2.1) – и поэтому может

быть определена только экстраполяционными методами [67-69]. Однако, поскольку зависимости «удерживание – условия элюирования» обычно заметно нелинейны [66, 70] 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 определения физического смысла координат ТК.

Для обоснования этих зависимостей мы рассмотрели удерживание членов гомологических рядов *n*-алканов (C₈-C₃₂), *n*-алканолов-1 (C₅-C₁₈) и алкилбензоатов (длина цепи C₂-C₉) на ряде распространенных хроматографических фаз в широком диапазоне температур (Таблица 2.2).

Следует отметить, что состав современных хроматографических фаз, наносимых на капиллярные колонки (равно как и технология данного процесса), как правило, является секретом изготовителя. Поэтому для каждого вида выпускаемой хроматографической фазы, изготовители указывают аналог – состав, обладающий подобными ГХ характеристиками. Продаваемые колонки являются лишь «аналогами селективности» известных ранее классических составов.

Таблица 2.2. Параметры рассмотренных колонок, специфицированные изготовителем.

<i>P</i>	Фаза	Характеристика фазы (аналог)	<i>lg β</i>	Размер		
				Длина, м.	Внутр. диаметр, мкм	Толщина слоя фазы, мкм
5	HP-1	Диметил-ПС	2.50	30	320	0.25
8	HP-5	5% фенилметил-ПС	2.50	30	319	0.25
8	VF-5ms	5% фенилметил-ПС	2.40	30	250	0.25
8	HP-5ms	5% фенилметил-ПС	2.39	30	248	0.25
8	EVDX-5ms	5% фенилметил-ПС	2.18	20	200	0.33
13	CP-SEL 624	6% цианопропилметил-ПС	1.64	30	250	1.38
13	ZB-624	6% цианопропилметил-ПС	1.64	60	250	1.4
18	ZB-35ms	35 % фенилметил-ПС	2.40	30	320	0.32
24	DB-17ms	50 % фенилметил-ПС	2.39	15	258	0.25
58	ZB-FFAP	Терминированный полиэтиленгликоль	2.40	30	250	0.25
–	HP-B Alc	PLOT	0.51	7.5	320	20

Примечание: *P* – условная полярность фаз, указываемая изготовителем; *β* – фазовое отношение колонки, рассчитанное по приведенным геометрическим параметрам; ПС – полисилоксан, PLOT (Porous Layer Open Tubular) – колонка со слоем пористого сорбента.

Времена удерживания измеряли с помощью хроматографов ГХ(I), ГХ(II), ГХ-МС(I), оснащенных автоматическими пробоотборниками. Растворы гомологов вводили в этилацетате (0.2 мкл) в режиме деления потока (40:1). Газ-носитель азот при атмосферном давлении на

выходе из колонки (для ГХ(I) и ГХ(II)) и гелий при вакууме на выходе из колонки (для ГХ-МС(I)). Мертвые объемы хроматографических систем измеряли вводом метана (для ГХ(I) и ГХ(II)) и азота (для ГХ-МС(I)).

Основным затруднением для получения численных экспериментальных значений, предназначенных для дальнейшего использования в процедурах экстраполяции, является необходимость соблюдения высокой точности измерений, недостижимой ранее. Следует отметить, что совершенствование газовых регуляторов, используемых для формирования потока через колонку, привело к очевидным успехам. Кроме того, использование капиллярных колонок позволяет весьма точно измерять времена удерживания пиков за счет их малой ширины.

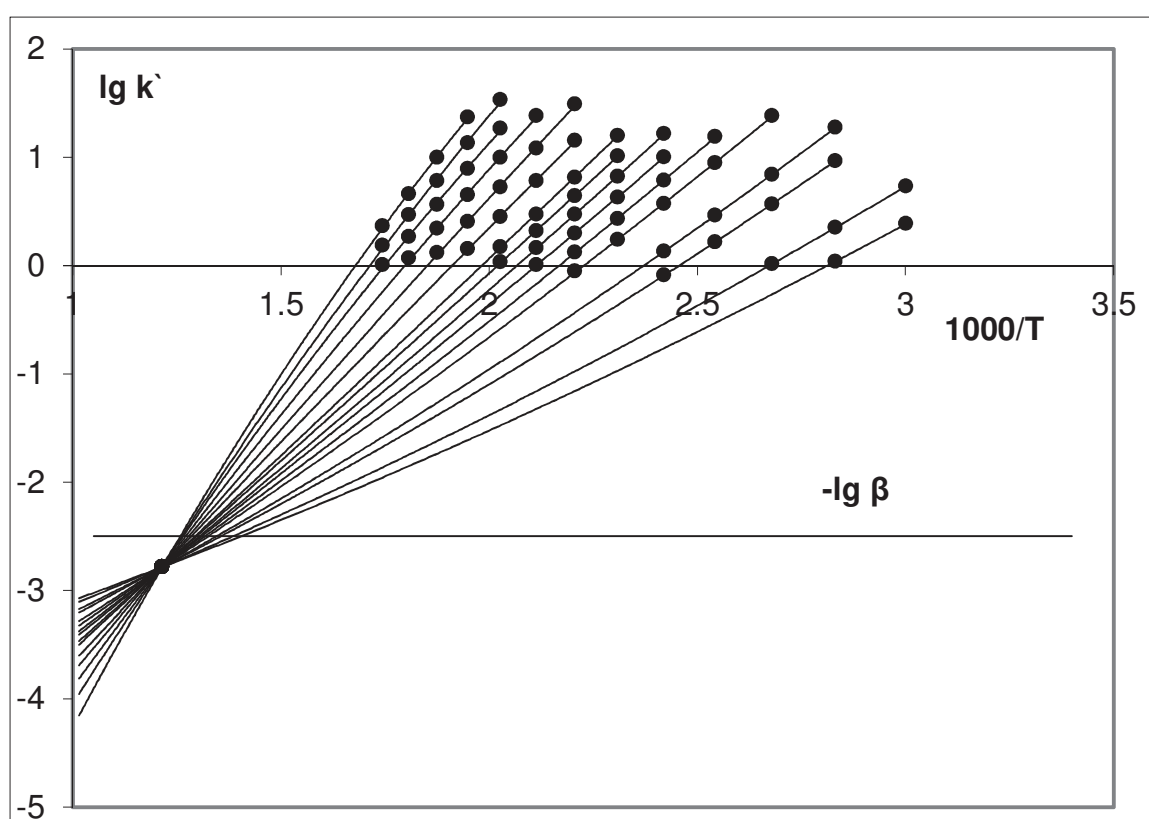


Рис. 2.1. Конвергенция зависимостей Вант-Гоффа для n -алканов C_8 - C_{32} (колонка НР-1). β – фазовое отношение колонки.

Однако, и этих преимуществ недостаточно для проведения экстраполяций из-за нелинейности зависимостей. Для частичного решения данных затруднений мы предлагаем 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 два графика зависимостей удерживания гомологов:

от температуры при $n=\text{const}$ (зависимость Вант-Гоффа)

$$\lg k'_n(1/T) = a_n(1/T) + b_n(1/T) * (1/T), \quad (2.2)$$

и номера при $T=\text{const}$

$$\lg k'_{1/T}(n) = a_{1/T}(n) + b_{1/T}(n) * (n). \quad (2.3)$$

Параметры a и b этих уравнений зависят от переменной, что и выражается в нелинейности соответствующих зависимостей. Поскольку при относительном удерживании:

$$\lg k'_2 = A + B * \lg k'_1, \quad (2.4)$$

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:

$$\lg k'^* = \frac{A}{1-B}, \quad (2.5)$$

где: A , B – параметры, постоянные в пределах сделанного допущения. В частности, для зависимостей Вант-Гоффа, коэффициент B является относительной энтальпией (ΔH) соседних гомологов, усредненной в пределах используемого температурного диапазона:

$$B_{I,J} = \frac{\Delta H_J}{\Delta H_I}, \quad (2.6)$$

и коэффициент A :

$$A_{I,J} = a_2 - \frac{\Delta H_J}{\Delta H_I} * a_1. \quad (2.7)$$

Метод ГХ на капиллярных колонках оптимален для подобных исследований, поскольку (в отличие, например, от ВЭЖХ) допускает надежное измерение мертвого объема, а величины фазовых отношений могут быть рассчитаны исходя из фабричных спецификаций применяемых колонок. В данном случае используемый метод предполагает распределительный механизм

удерживания (хотя для фазы НР-В-Alc это предположение может оказаться некорректным, но расчет для нее приведен лишь для сравнения).

Фазовые отношения применяемых колонок были различны, поэтому далее вместо величин $lg k'$ использованы логарифмы коэффициентов распределения ($lg K$). Количество пар точек, использованных для расчета, ограничено удерживанием $k' > 1$. Для всех рассмотренных фаз и во всем рассмотренном диапазоне температур величины $lg K^*$, полученные с помощью зависимости (2.3) представлены на Рисунке. 2.2.

Очевидно то, что точки пересечения зависимостей (2.3) не совпадают (по крайней мере, в широком диапазоне температур). В целом же получаемые величины $lg K^*$ снижаются по абсолютной величине при росте температуры для слабополярных фаз, почти постоянны для среднеполярных (нитрильная ZB-34 и фенилметилсилоксановая DB-17ms) и даже растут (*n*-алканы, колонка ZB-FFAP).

Такое поведение легко объяснимо вероятным изменением свойств неподвижных фаз в широком температурном диапазоне (фактор, как правило, не учитываемый при термодинамической интерпретации индексов удерживания), а также температурными зависимостями термодинамических характеристик системы. Поэтому для широкого температурного диапазона определение «область» или «зона» конвергенции (ОК) является более верным. Для проведения количественных сравнений величины $lg K^*$ для всех рассмотренных колонок были усреднены в диапазоне 140-200°C (Таблица 2.3). Воспроизводимость (S_r , %) расчета величин $lg k'^*$ составляла 1.5-2.5%, но для разностных величин $lg K^*$ величины S_r , % значительно увеличивались.

Изменение пневматического режима работы колонки (по крайней мере, для НР-1 и *n*-алканового ряда) не влияет на величину $lg K^*$. В целом, величины $lg K^*$ для *n*-алканов оказываются большими по абсолютной величине, нежели для бензоатов, причем эта разница растет при увеличении полярности хроматографической фазы. Несколько хуже заметно изменение в положении $lg K^*$ между рядами *n*-алканов и *n*-спиртов, что объяснимо значительной долей алифатических остатков в структурах последних. Такое различие в поведении формирует положительную температурную зависимость индексов удерживания (ΔRI_T) и увеличение индексов при росте условной полярности фазы.

Критериями применимости относительного подхода для определения ординат ТК можно считать:

- зависимости относительного удерживания (2.4) высоко линейны как для набора величин $lg k'_n = f_n(1/T)$ (отличающегося значительной нелинейностью), так и для набора $lg k'_{1/T} = f_{1/T}(n)$ (сравнительно линейных и потому часто используемых для прямых экстраполяций);

- расчет величин lgk^* для этих наборов величин приводит к сходным результатам (Таблица 2.3).

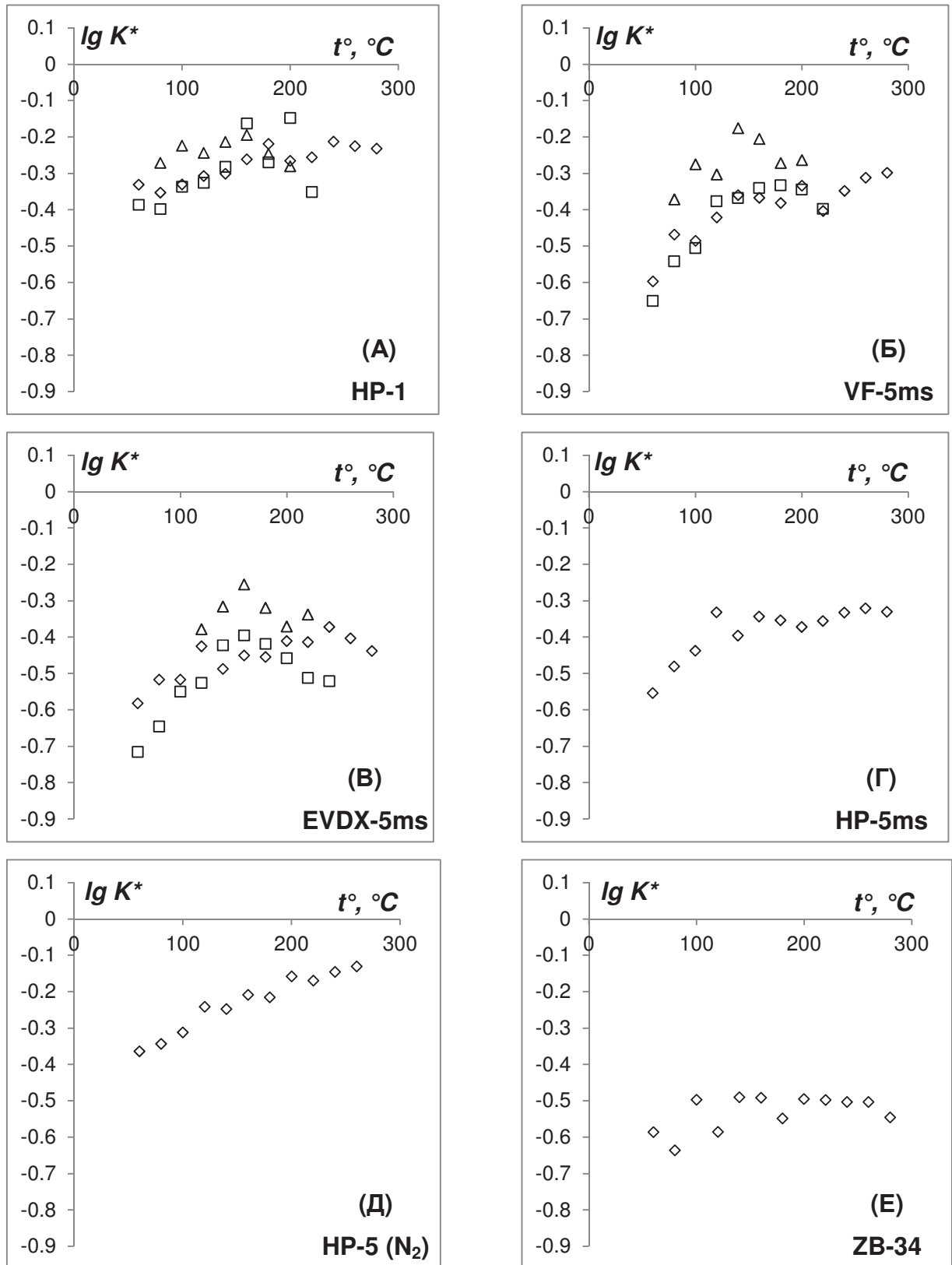


Рис. 2.2. Рассчитанные величины логарифмов коэффициентов распределения в ТК ($lg K^*$) для гомологических рядов n -алканов (\diamond), n -алканолов-1 (\square) и бензоатов (Δ), (А)-(Е).

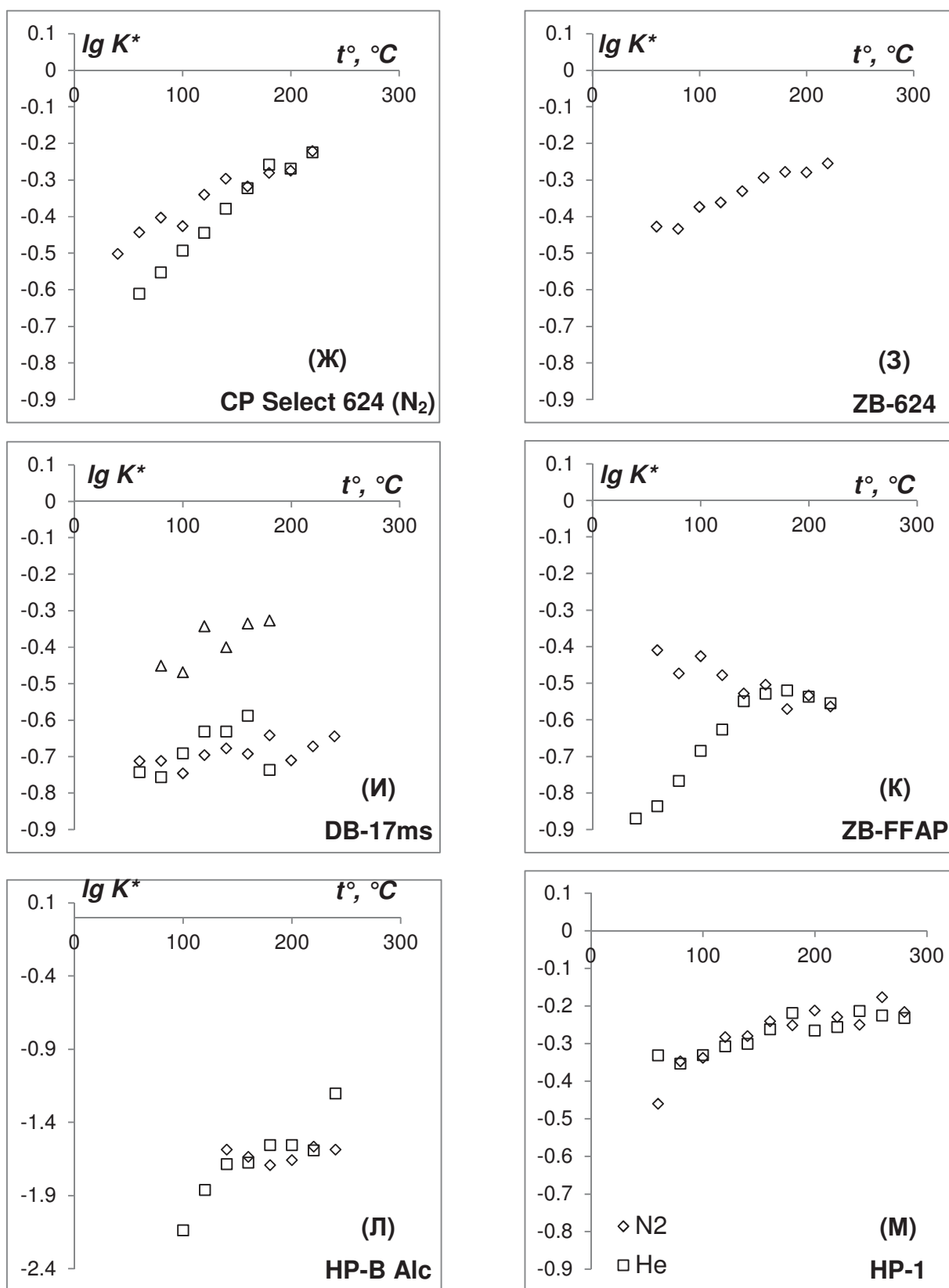


Рис. 2.2. Рассчитанные величины логарифмов коэффициентов распределения в ТК ($lg K^*$) для гомологических рядов n -алканов (\diamond), n -алканолов-1 (\square) и бензоатов (Δ). Окончание, (Ж)-(Л). Сравнение величин $lg K^*$ алканов для разных пневматических режимов работы колонки (М).

Таблица 2.3. Величины $\lg K^*$ (S_r , %) для трех гомологических рядов, рассчитанные для зависимостей (2.2), (2.3) и усредненные в диапазоне 140-200 °С.

<i>P</i>	Фаза	<i>n</i> -Алканы		<i>n</i> -Спирты		Бензоаты	
		(2.2)	(2.3)	(2.2)	(2.3)	(2.2)	(2.3)
5	HP-1	-0.24 (6)	-0.27(13)	-0.25 (13)	-0.22(32)	-0.20 (19)	-0.24(16)
5	HP-1 (N ₂)	-0.25 (5)	-0.25 (11)	-	-	-	-
8	HP-5 (N ₂)	-0.22 (11)	-0.21(18)	-	-	-	-
8	VF-5ms	-0.36 (11)	-0.36(6)	0.33 (6)	-0.34(4)	-0.20 (16)	-0.23(20)
8	HP-5ms	-0.37 (5)	-0.37(6)	-0.33 (8)	-0.35(5)	-0.25 (7)	-0.28(18)
8	EVDX-5ms	-0.45 (7)	-0.41(9)	-0.42 (11)	-0.38(6)	-0.29 (20)	-0.31(15)
13	CP-SEL 624 (N ₂)	-0.30 (12)	-0.29(7)	-0.27 (10)	-0.31(18)	-	-
13	ZB-624	-0.32 (13)	-0.30(8)	-	-	-	-
18	ZB-35ms	-0.51 (4)	-0.51(6)	-	-0.45(8)	-	-0.32(10)
24	DB-17ms	-0.68 (5)	-0.68(4)	-0.60 (8)	-0.66(12)	-0.36 (16)	-0.36(11)
58	ZB-FFAP	-0.47 (4)	-0.53(5)	-0.50 (3)	-0.53(2)	-	-
-	HP-B Alc	-1.69 (2)	-1.65(3)	-1.51 (17)	-1.62(4)	-	-

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

$$\ln k^*_I = \ln K^*_I - \ln \beta = -\frac{\Delta G_I}{RT} - \ln \beta = -\frac{\Delta H_I}{RT} + \frac{\Delta S_I}{R} + \frac{S_0}{R} - \ln \beta, \quad (2.8)$$

то в ОК при $T = T^*$:

$$-\frac{\Delta H_I}{RT^*} + \frac{\Delta S_I}{R} = 0, \quad (2.9)$$

и

$$S_0 = R \ln k^* + R \ln \beta. \quad (2.10)$$

В наших измерениях $S_0 \sim 5-12$ Дж*М⁻¹К⁻¹. Величины S_0 ($\lg K^*$) зависят от структуры родоначальников гомологических рядов и определяют температурную зависимость индексов удерживания.

Температура в ТК при $k^* = k^*$:

$$T^* = \frac{\Delta H_I - \Delta H_J}{\Delta S_I - \Delta S_J} = \frac{\Delta H_{CH2}}{\Delta S_{CH2}}, \quad (2.11)$$

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 приближительному значению $T^* \sim 500-600$ °С.

Как показывали наши измерения, наиболее зависимыми от температуры оказывались, в частности, индексы удерживания жестких структур – полиароматических углеводов (ПАУ), Таблица 2.4.

Таблица 2.4. Увеличение индекса Ковача для ПАУ при увеличении температуры колонки (EXDX-5ms) на 20°С от указанной.

ПАУ	Температура колонки, °С										
	280	260	240	220	200	180	160	140	120	100	80
Хризен	44	45	44	40	-	-	-	-	-	-	-
Пирен	-	41	40	38	36	34	-	-	-	-	-
Антрацен	-	-	-	30	27	26	25	-	-	-	-
Нафталин	-	-	-	-	-	-	-	14	13	15	13

Базируясь на приведенных выкладках, эти значения объясняются малым энтропийным вкладом в ГХ распределительный процесс для жестких структур ПАУ. Отрицательная температурная зависимость алкановых индексов удерживания наблюдалась бы для веществ, структуры которых обладают большей конформационной подвижностью, нежели *n*-алканы.

Далее приведены некоторые любопытные следствия изложенных выкладок. На Рисунке 2.3 иллюстрировано сравнение величин $B_{I,J}$ уравнения (2.6) – относительных энтальпий удерживания *n*-алканов для различных фаз.

Эти величины весьма близки для слабо- и среднеполярных фаз близкой химической природы (метилсилоксановых), но заметно выше для полиэтиленгликолевой ZB-FFAP, то есть, относительная энтальпийная селективность неполярных соединений – *n*-алканов – выше именно на фазе, являющейся полярной согласно классическому подходу к определению полярности. Данный результат определяется малыми значений факторов удерживания *n*-алканов на фазе ZB-FFAP по сравнению с метилсилоксановыми фазами. С другой стороны, общая селективность фаз к метиленовой группе [71], (Рисунок 2.4, $\Delta \lg k^{\prime}/n(CH_2)$), близка для фаз разной химической природы, но снижается для ZB-FFAP.

HP-V Alc – единственная фаза, о природе которой производитель (Agilent Technologies) не сообщил ничего. Судя по очевидному отличию рассчитанных величин (Таблица 2.3 и Рисунок 2.4), для этой фазы механизм удерживания гомологов отличается от остальных фаз и, скорее всего, имеет адсорбционный характер. В этом случае рассчитанные значения $\lg K^*$ некорректны из-за неверной оценки фазового отношения.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [72-75].

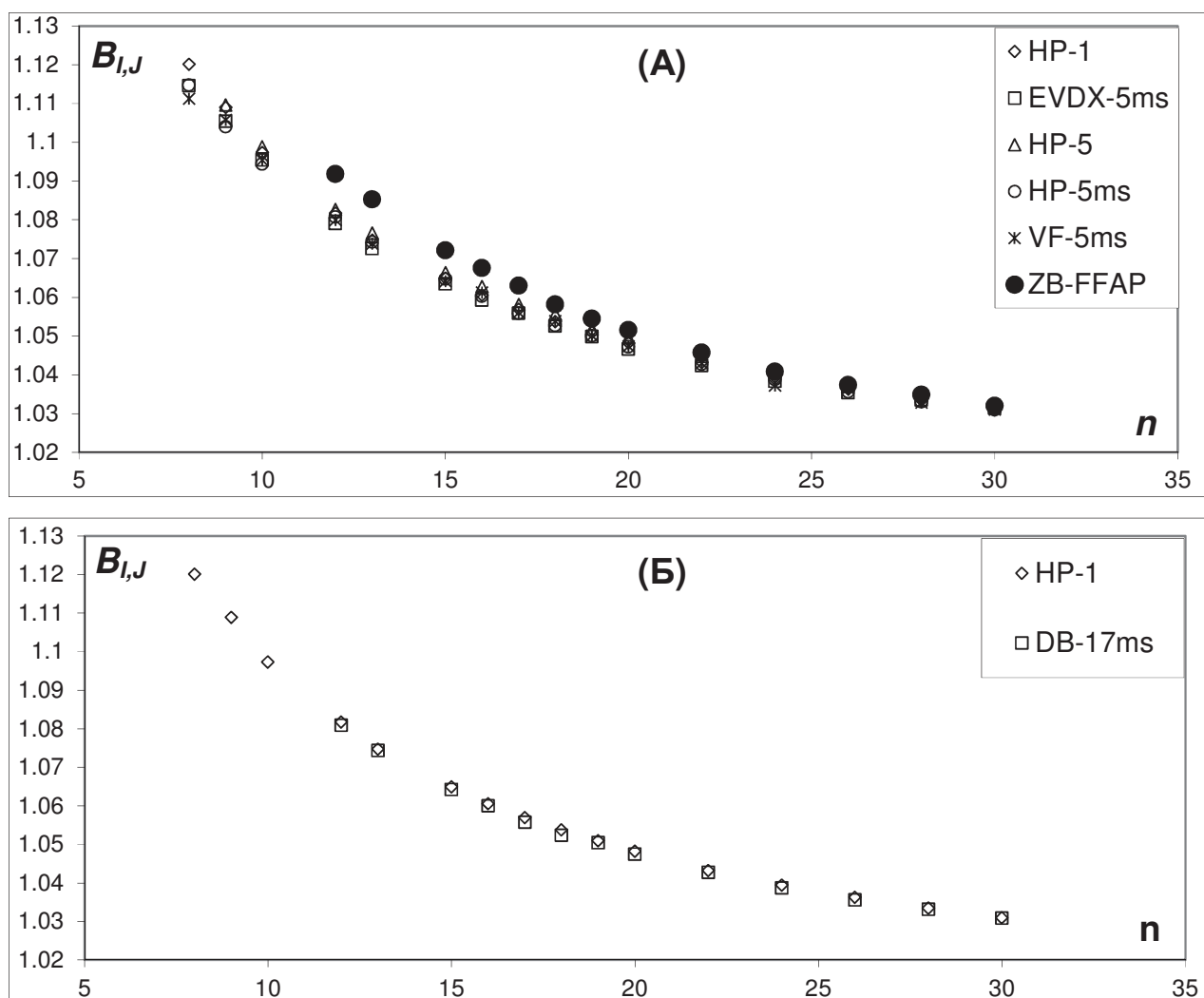


Рис. 2.3. Сравнение относительных энтальпий удерживания соседних гомологов для слабополярных метилсилоксановых фаз и сильнополярной ZB-FFAP (А). Подобное сравнение для фаз близкой химической природы: неполярной HP-1 и среднеполярной DB-17ms (Б). Ряд алканов.

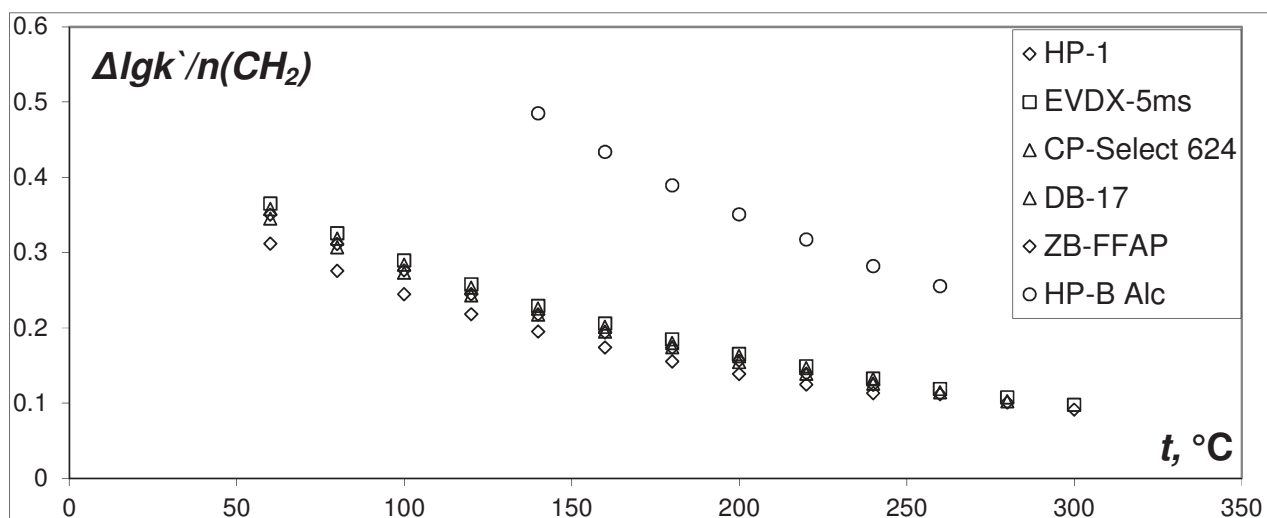


Рис. 2.4. Зависимость метиленовой селективности фаз разной химической природы от температуры. Ряд n -алканов.

2.3. Преобразования библиотек удерживания.

При отсутствии точных, непротиворечивых и общепринятых методов вычисления хроматографического поведения элюируемых соединений, системы определения относительного удерживания, безусловно, предоставляют единственную возможность сохранения и дальнейшего использования аналитической информации. Выпуск капиллярных колонок, обладающих высоко воспроизводимыми характеристиками, сделал возможными создание и массовое распространение библиотек относительного удерживания. Это достижение позволяет пользоваться величинами удерживания, стандартизованными для определенных хроматографических условий, но варьирование этих условий – совершенно необходимое для сохранения гибкости хроматографического метода - требует наличия оценок возможного изменения величин удерживания.

В настоящее время существует два основных подхода к стандартизации удерживания.

1. Индексы. Описание удерживания аналитов индексами имеет давнюю историю [76-78], а значит, располагает значительным экспериментальным материалом. Сформированы – и продолжают формироваться – как библиотеки общего назначения [41], так и тематические подборки в области химико-токсикологического и судебно-химического анализа [49, 50]. Большое число индексов сведено в хроматомасс-спектрометрическую (ГХ/МС) библиотеку NIST11 [51]. При определении индексов пневматический режим работы колонки (как и ее размеры) обычно не имеет решающего значения. Тем не менее, более удобным считается постоянство расхода газа-носителя (*const V*). Достоинствами системы индексов следует считать ее очевидный физико-химический смысл, возможность приблизительной оценки индексов, а также значительное число реперных соединений имеющих разное удерживание и снижающих погрешности измерения относительного удерживания. Недостатком является необходимость периодических измерений удерживания ряда реперных соединений, между которыми поведение хроматографической системы не контролируется. Частично этот недостаток компенсируется возможностью введения в состав проб одного-двух соединений из числа реперов, минимально осложняющих анализ хроматограмм, или же наблюдение за удерживанием матричных соединений проб.

Существует ряд подходов, позволяющих рассчитывать индексы удерживания различных групп соединений, основываясь на их физико-химических и структурно-топологических параметрах [79-84]. Весьма плодотворным в плане автоматизации расчета крупных массивов индексов удерживания является аддитивный подход, позволяющий делать оценки удерживания соединений, физико-химические свойства которых изучены недостаточно [85-87]. Расчетные величины индексов, ориентированные на неполярную фазу, приведены в библиотеке NIST11.

2. Фиксация времен удерживания (ФВУ, retention time locking, RTL) основана на измерении времен удерживания анализов относительно одного (выбираемого создателями библиотеки) реперного соединения и предполагает обязательное использование режима постоянства давления на входе в колонку (*const P*). Изменяя входное давление можно добиться надежного сохранения времен удерживания как при изменении геометрических характеристик колонки, в том числе при обрезке начального участка, так и при ее замене на новую, но содержащую ту же фазу и близкую по геометрическим параметрам. Подобные обзорные (скрининговые) тематические библиотеки ФВУ распространяются, например, фирмой Agilent Technologies [88-90], а также Савчуком с сотр. [91]. Обязательным требованием работоспособности таких библиотек является полное соответствие условий элюирования тем условиям, при которых библиотека была создана (кроме варьируемого входного давления). Безусловным достоинством системы ФВУ считается сохранение времен удерживания (что особенно удобно для рутинных анализов), недостатком – осложнение структурной интерпретации удерживания, а также затруднения расчета приблизительного удерживания.

Недостатки системы ФВУ определяют выбор в пользу системы индексов. Базис системы, построенный на *n*-алканах, позволяет пользоваться опубликованными данными, а принятый вариант определения индексов (линейный расчет) удобен ввиду существования мощного программного средства обработки ион-хроматограмм – AMDIS.

Осложнения использования системы индексов заключаются в следующем.

1. Различие применяемых фаз. Действительно, применение индексов Ковача (RI_{NP}) или линейных индексов для неполярной фазы (100% диметилполисилоксан) является сложившейся процедурой стандартизации удерживания. В дальнейшем описании для удобства эта фаза будет называться неполярной ввиду того, что она является наиболее неполярной из числа доступных фаз, наносимых на продаваемые капиллярные колонки и несмотря на то, что она проявляет признаки полярности по сравнению с углеводородными фазами. Однако, несмотря на обилие опубликованных величин индексов, в настоящее время широко используются слабополярные фазы (5% фенилдиметилсилоксан или его аналоги, SE-54, SE-52, HP-5, DB-5, EVDX-5ms, CP-Sil 8 CB, Ultra-2, SPB-5, Rtx-5, BP-5, OV-5, 007-2, MPS-5, XTI-5, PTE-5, ZB-5, AT-5, MDN-5 и пр.), а поиск характерных для них величин удерживания (RI_{SP}) затруднителен.

2. Условия элюирования. Даже если хроматографист располагает индексами удерживания интересующих его соединений, то они могли быть измерены в условиях, отличающихся от принятых в его лаборатории и используемых для обзорного анализа с использованием внутрилабораторных поисковых библиотек. Следует учесть, что никакая библиотека не может быть настолько полной, чтобы удовлетворить любые потребности и, следовательно, она должна быть расширяемой:

- за счет соединений, характеристики которых получены из различных внешних источников, причем их удерживание может быть охарактеризовано как индексами, так и фиксированными временами, обычно полученными в разных условиях;

- за счет известных соединений, обнаруженных хроматографистом или неизвестных ранее, но идентифицированных им на основании различных подходов (Главы 1, 3-5).

Смена условий анализа крайне неудобна ввиду удлинения времени, требуемого для его проведения. Как правило, обзорные библиотеки построены на градиентном режиме работы колонки – но это сходство может оказаться единственным. Основными различиями (кроме выбора постоянного параметра формирования потока газа-носителя) являются вид этого газа (обычно гелий или азот), давление на выходе колонки (атмосферное для большинства детекторов или вакуум для МС), температурные условия и фазовые отношения колонок. Данная часть работы посвящена адаптации величин удерживания, полученных в разных условиях.

Пересчет индексов удерживания при смене силоксановых фаз. Известно, что удерживание соединений на разных фазах – и, тем более, на фазах близкой химической природы - в значительной степени коррелировано [92-94]. В целом, индексы удерживания большинства соединений растут при увеличении условной полярности фазы. Этот эффект проиллюстрирован удерживанием гептилбензоата – соединения, удерживающегося приблизительно в середине рабочего диапазона для слабополярных фаз и имеющего структурные фрагменты, характерные для большинства тематических соединений (ароматический и алифатический остатки, атомы кислорода). В Таблице 2.5 приведены индексы Ковача для этого соединения на неполярной, слабополярных и среднеполярной силоксановых фазах. Для сравнения приведены величины удерживания на двух слабополярных фазах, полученных от разных производителей (HP-5ms, Agilent, и VF-5ms, Vaticon Inc.). В скобках указана разность между удерживанием на соответствующей фазе и неполярной HP-1. Тенденции изменения индексов находятся в соответствии с обоснованиями, сделанными в предыдущем разделе; индекс удерживания гептилбензоата заметно растет при переходе от неполярной к слабополярным фазам. Следует отметить, что при увеличении удерживания разность (RI_{SP})-(RI_{NP}) также увеличивается.

Учитывая существование значительного количества тематических и чрезвычайно структурно разнообразных соединений (библиотека MPW2011 [50] содержит характеристики 8650 аналитов), представляется крайне затруднительным рассчитывать индексы для различных фаз на основании структурных или физико-химических параметров соединений. Но, располагая крупными внутрилабораторными поисковыми библиотеками, содержащими характеристики именно тематических соединений, можно провести корреляционные оценки изменения

индексов при смене фазы без учета индивидуальных особенностей аналитов, по крайней мере, для фаз одной химической природы (силоксан).

Таблица 2.5. Индексы Ковача гептилбензоата для трех метил(фенил)силоксановых фаз: слабополярных (HP-5ms и VF-5ms), среднеполярной (DB-17ms). В скобках указано их отличие от индексов для неполярной фазы HP-1.

Температура колонки, °C	<i>RI (RI-RI_{SP})</i>			
	HP-1	HP-5ms	VF-5ms	DB-17ms
200	1668	1704 (36)	1708 (40)	-
180	1662	1696 (33)	1699 (37)	1905 (242)
160	1655	1688 (33)	1691 (36)	1891 (236)
140	1648	1680 (32)	1683 (35)	1878 (230)
120	1642	-	-	1867 (225)

Переход (неполярная фаза)→(слабополярная фаза). Для определения корреляции между индексами удерживания на неполярных метилсилоксановых фазах (RI_{NP}) и слабополярной (аналогичной 5% фенилметилсилоксан, RI_{SP}) нами измерены и обработаны величины RI_{SP} 280 соединений, имеющих лекарственное, токсикологическое и наркологическое значение, а также соединений, характерных для мочевой матрицы. Диапазон удерживания составил 800-3600 RI_{SP} . Это опиаты, каннабиноиды, фенилалкиламины, барбитураты, производные бензодиазепина и фенотиазина, анальгетики, холинолитики, противогистаминные препараты, средства местной анестезии, стероиды, жирные кислоты и их эфиры, полиароматические углеводороды, пестициды, простые ароматические соединения и фталаты, а также ряд метаболитов и продуктов ацетилирования.

Эти данные были сопоставлены индексам, опубликованным в литературе и измеренным для метилсилоксановых фаз. Следует отметить, что приводимые в публикациях данные удерживания не являются стандартизированными: они получены на разных колонках с применением разных температурных условий. Поэтому для отбора значений удерживания на метилсилоксановых фазах был введен ряд критериев и использованы значения RI_{NP} , полученные в следующих условиях (в порядке снижения предпочтения):

- капиллярные колонки с фазой DB-1 (HP-1);
- капиллярные колонки с любой из фаз, считающихся аналогами предыдущих;
- насадочные колонки с метилсилоксановыми фазами.

Кроме того, предпочтение отдавали изотермическим условиям. Выбранные значения RI_{NP} использовали в качестве независимых аргументов при проведении линейной

аппроксимации со значениями RI_{SP} , полученными в наших условиях при использовании двух температурных градиентных режимов (режимы I и II) и слабополярной колонки HP-5ms:

$$RI_{SP}(t) \approx a_t + b_t * RI_{NP}, \quad (2.12)$$

где a_t, b_t - коэффициенты, характерные для используемой температурной программы. С помощью коэффициентов, полученных для всей совокупности пар индексов (RI_{NP} и RI_{SP}), получали набор корректированных индексов ($RI_{SP,CALC}$):

$$RI_{SP,CALC}(t) = a_t + b_t * RI_{NP}, \quad (2.13)$$

и их относительные отклонения ($\Delta RI(t),\%$) от измеренных $RI_{SP}(t)$:

$$\Delta RI(t),\% = 100 * \left(1 - \frac{a + b * RI_{NP}}{RI_{SP}(t)} \right). \quad (2.14)$$

Поскольку получаемые отклонения были велики (11-13%, Рисунок 2.5), то исходную совокупность пар индексов ограничивали теми, для которых отклонения были

$$\Delta RI(t),\% < \Delta RI_{MAX}(t),\%, \quad (2.15)$$

т.е. не превышали установленных ограничений ($\Delta RI_{MAX},\%$) на $\pm 2\%$ или $\pm 4\%$. Размер ограничений устанавливали в соответствии с примерной длиной линейного участка на s -образной кривой, Рисунок 2.5, где величины относительных отклонений расположены в порядке возрастания для всей выборки пар индексов.

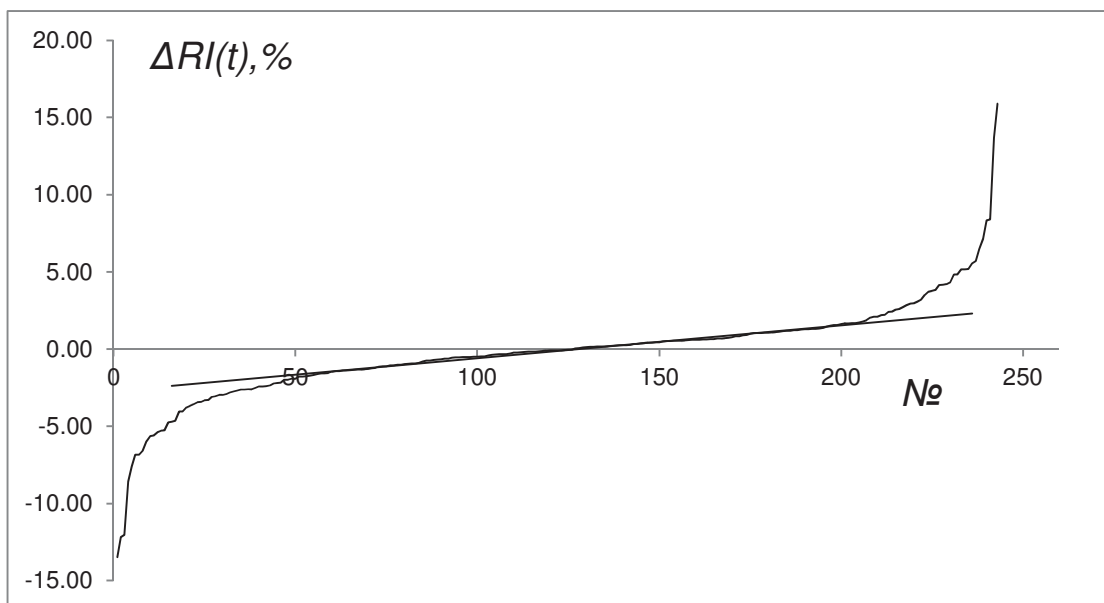


Рис. 2.5. Относительные отклонения от линейной зависимости между вычисленными и измеренными индексами для слабополярной фазы.

После введения ограничений коэффициенты зависимости (2.12) рассчитывали повторно.

Поскольку литературные величины (RI_{NP}) могут быть ближе к экспериментально определенным ($RI_{SP}(t)$), нежели расчетные ($RI_{SP,CALC}$), что может происходить при малом удерживании, и, следовательно, малой разнице между величинами удерживания для разных фаз, то для оценки применимости получаемых коэффициентов вводили дополнительное ограничение:

$$|\Delta RI(t)| < |RI_{SP}(t) - RI_{NP}| \quad (2.16)$$

Считая удовлетворительным допустимое отклонение $\pm 2\%$, можно заключить, что более 60% величин I_{NP} могут быть успешно скорректированы (Таблица 2.6).

Таблица 2.6. Результаты линейной аппроксимации для коррекции индексов при переходе от неполярной к слабополярной фазе (два температурных режима).

Параметр	Режим I		Режим II	
	$\pm 2\%$	$\pm 4\%$	$\pm 2\%$	$\pm 4\%$
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
Количество значений, % от выборки после введения ограничения (2.15)	66	85	70	87
Из них, после введения ограничения (2.16)	63	70	61	69

Соединения, удерживание которых с большей вероятностью значительно отклоняется от линейной зависимости, можно подразделить на следующие группы:

- слабо- ($RI_{SP} < 1200$) и сильноудерживающиеся ($RI_{SP} > 3000$) соединения;
- высокополярные компоненты, дающие крайне ассиметричные пики, форма и положение максимума которых значительно зависит от концентрации;
- полиароматические углеводороды тяжелее нафталина и простые гетероциклические производные (индол, скатол), см. раздел 2.2;
- соединения, структуры которых имеют значительные алифатические остатки (в том числе жирные кислоты и их метиловые эфиры, стероидные структуры без полярных групп).

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.

Переход (слабополярная фаза) → (среднеполярная фаза). При данном переходе рост индексов удерживания большинства соединений значительно превышает подобный рост, возникающий при переходе от неполярной к слабополярной фазе, Таблица 2.7. Среднеполярная колонка DB-17ms (Таблица 2.2, эквивалентна 50% фенилметилполисилоксан, аналог фаз HP-50+, Rtx-50, 007-17, SP-2250, SPB-50, BPX-50, SPB-17, AT-50 и пр.) удобна для выполнения

требуемых подтверждающих определений. Значительное отличие RI_{SP} от линейных индексов, получаемых на DB-17ms (RI_{MP}) обусловлено, в основном, концентрационной разницей в составе фаз. Это позволяет применить аналогичный подход. Для расчета использовали 227 пар индексов, измеренных в нашей лаборатории и используемых во внутрिलाбораторных поисковых библиотеках для колонок HP-5ms и DB-17ms. Поскольку разница $RI_{MP} - RI_{SP} \approx 700-800$ для $RI_{SP} \sim 3000$, то получаемые наклоны (b) линейных зависимостей значительно выше и, следовательно, должны быть увеличены допустимые отклонения.

Таблица 2.7. Результаты линейной аппроксимации для коррекции индексов при переходе от слабополярной к среднеполярной фазе (два температурных режима).

Параметр	Режим I		Режим II	
	$\pm 4\%$	$\pm 8\%$	$\pm 4\%$	$\pm 8\%$
Пересечение (a)	-114.31	-109.45	-117.28	-129.61
Наклон (b)	1.2547	1.2474	1.256	1.2557
Стандартное отклонение аппроксимации	58.6	92.47	57.01	82.56
Количество значений, % от выборки после введения ограничения (2.15)	72	90	73	89
Коэффициент детерминации (R^2)	0.993	0.983	0.993	0.985

Приведенные параметры 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.

Пересчет индексов удерживания при смене температурного режима разделения.

Переход (градиент 1) → (градиент 2). Возможность подобного пересчета следует из результатов, описанных в предыдущем подразделе: увеличение температуры разделения приводит к увеличению индексов удерживания. Количественная температурная зависимость индексов на конкретной фазе определяется структурой соединения [95-98], и данный факт был применен при выявлении и идентификации аналитов (гл. 3-5). Предлагаемый пересчет, выполненный способом, описанным выше для смены хроматографических фаз, также является корреляционным и приближительным. Наиболее надежные результаты получали при совпадении характеристик градиентных профилей, что объясняется линейризацией изменения удерживания в области температурного градиента. Число пар индексов, использованных в расчете, составило для HP-5ms – 245, DB-17ms – 282; все индексы были измерены в нашей лаборатории. Результаты представлены в Таблице 2.8.

Пересчет величин удерживания при смене пневматического режима разделения и геометрических характеристик колонок. Чтобы оперативно сопоставить различия в

поведении аналитов в двух разных пневматических режимах, следует выбрать ряд соединений (шкалу сравнения), удерживание которых охватывает весь разумный диапазон удерживания.

Таблица 2.8. Результаты линейной аппроксимации для коррекции индексов при переходе от температурного режима I к II на слабополярной к среднеполярной фазе.

Параметр	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
Количество значений, % от выборки после введения ограничения (2.15)	76	93	75	85
Из них, после введения ограничения (2.16)	73	80	-	-

Для метода ГХ-МС он ограничен снизу выбираемым растворителем (на время выхода которого должны быть отключены ряд цепей масс-спектрометра) и сверху – ориентировочным максимальным индексом удерживания для используемой колонки. В случае обзорных измерений это значение обычно несколько превышает индекс, соответствующий времени завершения температурного градиента (до максимально допустимой температуры колонки) и для слабополярных фаз примерно соответствует 3200-3500 единиц RI. При большем удерживании фактическая чувствительность определения быстро падает вследствие уширения пиков и возросшего фона колонки. Учитывая разнообразие хроматографического поведения соединений разной структуры, невозможно выбрать непротиворечивую шкалу сравнения. Тем не менее, специфика механизма удерживания алканов (наличие только одного вида взаимодействий – дисперсионного) а также сама суть используемой шкалы RI делает их естественными объектами для сравнения пневматических режимов. Конечно, в условиях различных соотношений между температурными градиентами и движением газа-носителя для более полярных соединений могут проявляться и своеобразные эффекты удерживания, (в первую очередь вследствие различия наклонов зависимостей Вант-Гоффа), но алканы – удобная отправная точка. Чем меньше нелинейность изменения времен удерживания алканов при смене режима, тем меньше возможные ошибки расчета времен удерживания аналитов. Можно также ожидать (это показано далее), что индексы могут быть рассчитаны и при значительной нелинейности алкановой шкалы.

Мы измерили удерживание 18 *n*-алканов (C₈ – C₃₂) на колонках, содержащих (согласно спецификации производителя) аналогичные фазы, но характеризующихся различной геометрией и фазовым отношением (β). Варьировали режим (*const. P* или *const. V*), вид газа-носителя (гелий или азот) и давление на выходе из колонки ($P_{\text{вых}}$, вакуум, атмосферное

давление или его превышение). Изменение времен удерживания аппроксимировали линейной зависимостью:

$$t_{R,V} = a + b \cdot t_{R,P} , \quad (2.17)$$

где $t_{R,V}$ и $t_{R,P}$ – времена удерживания алканов, измеренные в условиях постоянства потока и давления соответственно. Показателем различия хроматографического поведения алканов в этом случае является отклонение их времен удерживания от линейной зависимости. Для режима *const P* величины давления газа-носителя выбирали, основываясь на времени удерживания реперного соединения дифениламина (9.27 мин, условия ФВУ [91]). Для режима *const V* скорость потока гелия устанавливали согласно рекомендациям изготовителя колонок; скорость потока азота выбирали исходя из примерного сходства его средней линейной скорости со средней линейной скоростью потока гелия.

Пересчет библиотек выполняли по следующей схеме:

1. Выбор колонки, для которой следует рассчитать величины удерживания;
 2. Установка режима *const. P*, подбор и установление давления, при котором удерживание реперного соединения соответствует времени, указанному создателями библиотеки ФВУ;
 3. Измерение удерживания алканов в выбранных условиях;
 4. Вычисление индексов соединений, приведенных в библиотеке постоянного давления.
- Затем вычисленные индексы сравнивали с индексами соединений, измеренными ранее на этой же колонке в режиме *const V*.

Переход const. P (измерение ФВУ) → const. V (измерение индексов) без смены колонки. Для этого сравнения выбрали две колонки, характеризующиеся различными фазовыми отношениями (Таблица 2.9) и температурный режим I.

Толстофазную колонку EVDX-5ms использовали только вместе с МС (газ-носитель гелий и давление на выходе близко к 0), для колонки HP-5 (стандартная толщина фазы) устанавливали избыточное выходное давление и меняли вид газа-носителя. Несмотря на то, что при смене пневматического режима меняются времена удерживания (и, соответственно, температуры удерживания), для всех трех наборов условий показана высокая линейность изменений этих времен. Следует отметить, что удерживание алканов (факторы емкости) для выбранных колонок весьма различны из-за разных фазовых отношений. Так, для C₂₀ при 180°C они примерно равны 6.7 и 16.8 для HP-5 и EVDX-5ms, соответственно. Этим объясняются несколько большие отклонения для толстофазной колонки EVDX-5ms, причем эти отклонения будут расти на изократическом температурном участке вследствие логарифмической зависимости удерживания от номера алкана. На Рисунке 2.6 проиллюстрирована именно эта (наихудшая) зависимость. Наложенный профиль градиента температур позволяет убедиться в

отсутствии значительных систематических отклонений как на температурном плато (алканы C₂₃-C₃₂), так и при градиенте.

Таблица 2.9. Параметры аппроксимации удерживания алканов для колонок с разными геометрическими характеристиками при варьировании пневматических режимов.

Колонка	EVDX-5ms 25 м × 0.2 мм × 0.33 мкм		HP-5 30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм	
	β	151		319
$P_{ВЫХ}$	вакуум		избыток 2.5 psi	
Газ-носитель	гелий		азот	
$P_{ВХ} (const P)$, psi	33.79		12.19	11.03
$V_{ВЫХ} (const V)$, мл/мин	0.8		1.3	1.1
Индекс	Относительное отклонение расчета времени удерживания, %			
800	1.7	-12	-8.1	
900	4.3	-6.1	-2.5	
1000	5.2	-3.2	-1.3	
1200	3.3	-0.2	0.3	
1300	2.2	0.3	0.5	
1400	1.2	–	–	
1500	0.5	0.8	0.7	
1600	-0.1	0.9	0.7	
1700	-0.6	1.0	0.8	
1800	-1.0	1.1	0.8	
1900	-1.4	1.2	0.8	
2000	-1.6	1.3	0.8	
2200	-2.1	1.4	0.9	
2400	-2.0	1.3	0.8	
2600	-1.5	0.8	0.6	
2800	-0.6	0.1	0.3	
3000	0.5	-0.7	0.0	
3200	1.7	-1.9	-0.4	
Дифениламин	–	1.1	1.0	
Параметры линейной аппроксимации (стандартные отклонения)				
a	0.584 (0.1)	0.979 (0.09)	1.045 (0.06)	
b	1.004 (0.008)	0.885 (0.007)	0.899 (0.005)	
R^2	0.9991	0.9990	0.9995	

Большие погрешности аппроксимации удерживания низших членов ряда обусловлены неудачными условиями их элюирования а, следовательно, высокой погрешностью измерения удерживания. Тем не менее, включение их в рассмотрение продиктовано необходимостью максимального расширения диапазона удерживания для обзорного анализа. Снижение отклонений аппроксимации для тяжелых алканов может быть получено добавлением квадратичного члена в уравнение (2.17):

$$t_{R,V} = a + b \cdot t_{R,P} + c \cdot t_{R,P}^2 \quad (2.18)$$

В этом случае погрешности аппроксимации снижаются в среднем примерно в 2-6 раз, коэффициенты детерминации (R^2) превышают 0.9999. Если использование времен удерживания (а не индексов) предпочтительнее, то для пересчета библиотек достаточно пересчитать времена удерживания, пользуясь зависимостью (2.17) и ее коэффициентами, вычисленными с помощью любого подходящего программного пакета.

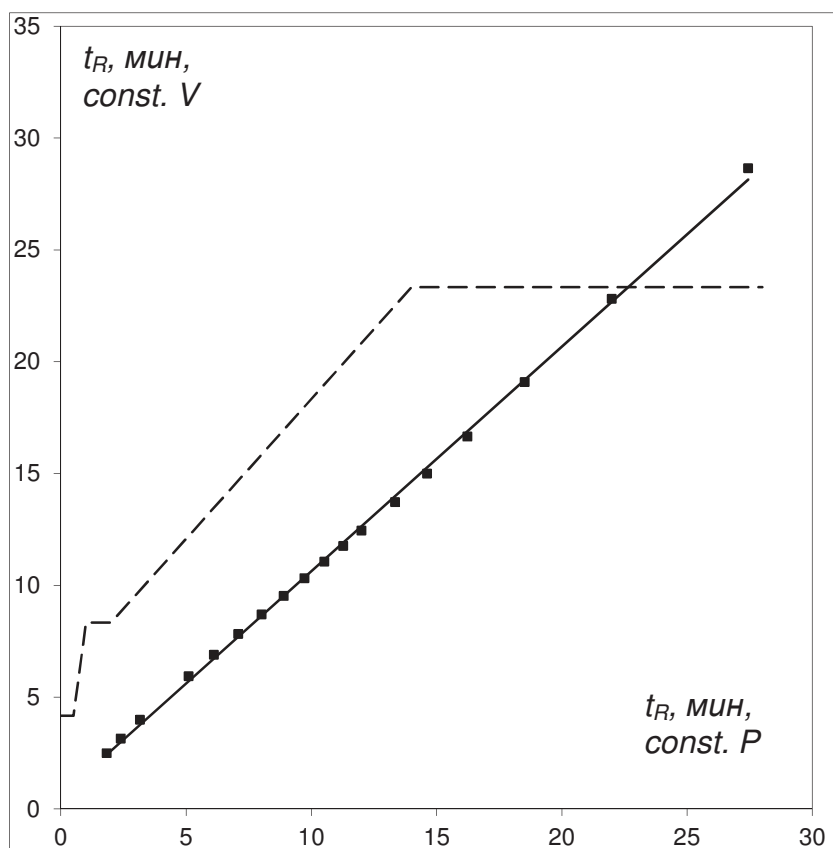


Рис. 2.6. Сравнение времен удерживания алканов при режимах $const P$ и $const V$ на колонке EVDX-5ms. Пунктир – профиль температурного градиента.

Полученный результат также говорит о возможной надежности пересчета библиотеки ФВУ ($const. P$, времена удерживания) в библиотеку $const. V$ (индексы). В Таблице 2.10 приведена выборка соединений из библиотеки ФВУ [91] и библиотеки, построенной на основе индексов в региональном отделении СМЭ, а также соответствующие значения удерживания (колонка НР-5ms).

Индексы удерживания в режиме постоянства потока газа-носителя рассчитаны из времен удерживания (ФВУ). Поскольку сравниваемые библиотеки сформированы в разных лабораториях, то полученные отклонения образованы как отклонениями расчета, так и

межлабораторной воспроизводимостью. В целом, полученные относительные отклонения невелики.

Таблица 2.10. Преобразование ФВУ-библиотеки [91] для колонки HP-5ms ($\beta = 249$)

Соединение	t_R , мин (ФВУ)	RI (выч.)	RI (эксп.)	Отклонение		
				RI	RI , %	t_R , мин
Амфетамин	4.600	1129	1135	5	0.5	0.025
Метамфетамин	5.153	1193	1195	2	0.2	0.010
Никотин	6.764	1362	1375	13	1.0	0.063
Котинин	10.080	1740	1730	-10	-0.6	-0.047
Меконин	10.300	1768	1769	2	0.1	0.009
Мепробамат	10.754	1826	1832	6	0.3	0.029
Норкетамин	11.100	1873	1889	16	0.8	0.077
Кофеин	11.103	1873	1870	-3	-0.1	-0.013
Промедол	11.160	1881	1882	1	0.1	0.005
Димедрол	11.360	1908	1908	0	0.0	0.002
Кетамин	11.404	1914	1904	-10	-0.5	-0.048
Лидокаин	11.478	1924	1924	0	0.0	0.000
Доксиламин	11.800	1969	1964	-6	-0.3	-0.027
Трамадол	12.076	2008	1999	-9	-0.5	-0.045
Фенобарбитал	12.152	2020	2016	-4	-0.2	-0.019
Аминоантипирин	12.336	2047	2059	12	0.6	0.057
Метадон	13.380	2203	2204	1	0.0	0.004
Амитриптилин	13.726	2258	2264	5	0.2	0.025
Кокаин	13.821	2273	2273	0	0.0	0.000
Имипрамин	13.910	2287	2296	8	0.4	0.039
Циклодол	14.210	2335	2324	-11	-0.5	-0.054
Нордимедрол АС	14.260	2343	2344	1	0.0	0.003
Дипразин	14.350	2357	2359	2	0.1	0.007
Карбамазепин	14.656	2405	2403	-2	-0.1	-0.010
Каннабидиол	14.990	2452	2449	-4	-0.2	-0.019
Кодеин	15.180	2479	2473	-6	-0.2	-0.029
Этилморфин	15.388	2509	2518	10	0.4	0.047
Диазепам	15.510	2526	2526	1	0.0	0.002
Морфин	15.600	2539	2531	-8	-0.3	-0.036
Аминазин	15.948	2588	2588	1	0.0	0.002
Кодеин АС	16.110	2608	2607	-2	-0.1	-0.008
3-Моноацетилморфин	16.130	2610	2606	-4	-0.1	-0.019
Каннабинол	16.200	2618	2618	0	0.0	-0.002
Тебаин	16.220	2620	2615	-5	-0.2	-0.025
6-Моноацетилморфин	16.230	2621	2618	-3	-0.1	-0.016
Морфин 2АС	17.320	2739	2731	-8	-0.3	-0.039
Трифтазин	17.552	2764	2760	-4	-0.1	-0.018
Хинин	19.469	2920	2918	-2	-0.1	-0.009
Папаверин	19.65	2934	2917	-17	-0.6	-0.079
Азалептин	20.462	2996	2970	-25	-0.9	-0.122

Следует учесть, что на практике библиотека не может быть набрана на основании только чистых соединений, присутствующих в точно определенных концентрациях; к тому же ценность таких данных также неочевидна. По мере загрязнения колонки удерживание полярных соединений меняется (растет). Особенность газохроматографического метода такова, что даже для хорошо изготовленных колонок и при весьма чистых газовых путях всегда найдутся зоны, обладающие специфическими адсорбционными свойствами, что может стать заметным при элюировании небольших количеств полярных соединений. Наибольшие отклонения удерживания (Таблица. 2.10) относятся к подобным соединениям. Это амфетамин, никотин, котинин, норкетамин, кетамин, аминоантипирин, циклодол. Отклонения расчета для папаверина и азалептина могут быть вызваны аналогичными причинами, хотя следует учесть возможный рост погрешностей на изократическом температурном участке. Остальные отклонения не превышают 0.3-0.4%.

Переход const. P (измерение ФВУ) → const. V (измерение индексов) при одновременной смене колонки и фазовых отношений. Данный пример является более сложным. Пользуясь рассмотренным выше приемом, мы сравнили колонку с большим фазовым отношением (HP-5) с колонками малых фазовых отношений (HP-5ms и EVDX-5ms), результаты приведены в Таблице. 2.11.

Для всех сравнений использовали один газ-носитель – гелий. Из Таблицы 2.11 видно, что нет никаких затруднений при смене фазового отношения $319 \leftrightarrow 249$ (факторы емкости для алкана C_{20} при $180^\circ C$ близки и примерно равны 6.7 и 8.9 для HP-5 и HP-5ms, соответственно. Отклонения от расчета невелики и для этого случая применимо все, что было сказано в предыдущем разделе. С другой стороны, для толстофазной колонки EVDX-5ms можно отметить значительные положительные отклонения расчета, начинающиеся сразу после окончания температурного градиента (Рисунок 2.7).

Такое поведение также является следствием значительного изменения величин фактора емкости (k') для разных колонок. В этом случае аппроксимация значений (Рис. 2.7) квадратичной зависимостью также приводит к значительным погрешностям и не может быть рекомендована. Добиться лучшей линейзации можно изменением профиля градиента (для приближенных оценок удобен, например, калькулятор «GC Method Translator», Hewlett-Packard). Применение линейных логарифмических аппроксимаций значительно осложняет метод.

Однако, несмотря на значительную нелинейность времен удерживания, индексы – как относительные величины – еще могут быть рассчитаны с приемлемой точностью. В Таблице 2.12 приведены результаты расчета индексов для колонки EVDX-5ms по временам

удерживания ФВУ (НР-5). К этим данным применимы все рассуждения, сделанные в предыдущем разделе для колонки НР-5ms.

Таблица 2.11. Параметры аппроксимации удерживания алканов при одновременном изменении пневматического режима и геометрических характеристик колонки

Колонка 1 (const P)	НР-5 30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм	
β	319	
$P_{ВХ}$, psi	12.19	
$P_{ВЫХ}$, psi	2.5	
Колонка 2 (const V)	НР-5ms 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм	EVDX-5ms 25 м × 0.2 мм × 0.33 мкм
β	249	151
$V_{ВЫХ}$, мл/мин	1	0.8
$P_{ВЫХ}$	вакуум	
Индекс	Относительное отклонение расчета времени удерживания, %	
800	-12	12
900	-12	10
1000	-6.6	12
1200	-1.1	8.5
1300	0.0	5.6
1500	–	3.3
1600	1.0	1.2
1700	1.2	-0.5
1800	1.4	-1.8
1900	1.6	-2.8
2000	1.7	-3.7
2200	1.8	-4.5
2400	2.1	-5.7
2600	2.0	-6.1
2800	1.2	-4.9
3000	0.1	-2.3
3200	-1.1	1.5
Параметры линейной аппроксимации (стандартные отклонения)		
a	0.495 (0.12)	-0.384 (0.3)
b	0.889 (0.01)	1.112 (0.03)
R^2	0.998	0.991

Смена вида газа-носителя и давления на выходе из колонки. Как и следовало ожидать, смена газа-носителя (гелий, давление на входе в колонку, $P_{ВХ}$, 12.19 psi или азот, 11.03 psi) не привела к сколько-нибудь значительным изменениям характеристик удерживания алканов (колонка НР-5, Таблица 2.9). То же самое можно сказать и об изменении $P_{ВЫХ}$ (сравнивали колонку НР-5 при избыточном давлении на выходе $P_{ВЫХ} = 2.5$ psi и НР-5ms при $P_{ВЫХ} \sim 0$, газ-носитель гелий, 1.3 и 1 мл/мин соответственно). Наклоны аппроксимирующих линейных

зависимостей близки к 1, их стандартные отклонения невелики (около 0.003), коэффициенты детерминации (R^2) больше 0.9998.

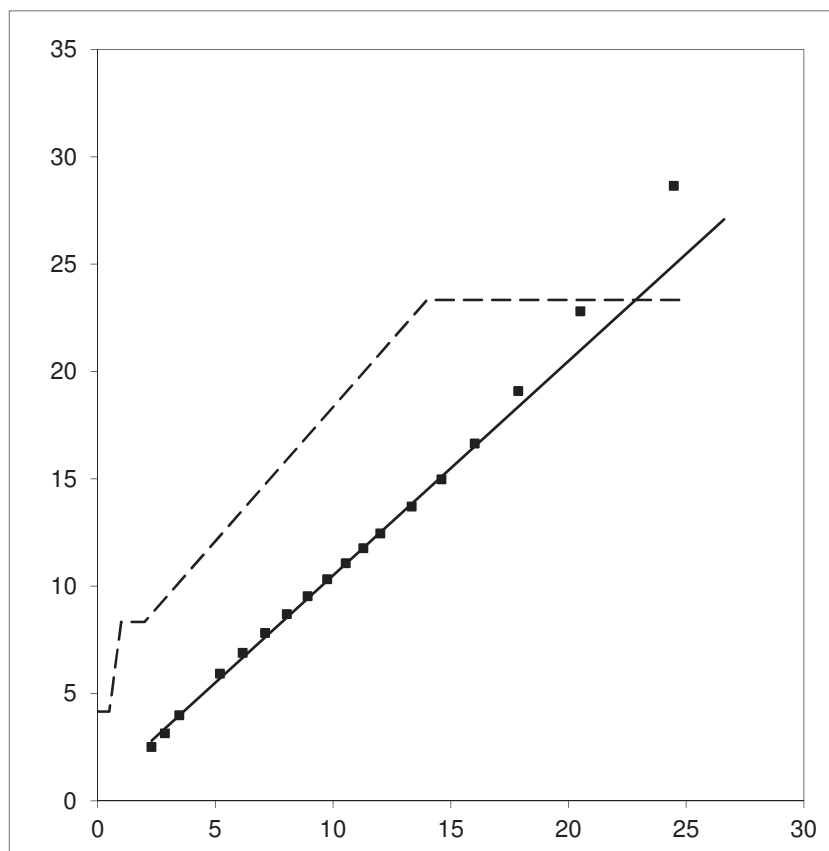


Рис. 2.7. Сравнение времен удерживания алканов при режимах *const P* и *const V* на колонке EVDX-5ms. Пунктир – профиль температурного градиента.

Переход const. P (измерение ФВУ) → const. V (измерение индексов) для среднеполярных фаз и пересчет соответствующих библиотек. Среднеполярные фенилметилполисилоксановые фазы также часто используют в обзорном анализе, в частности, благодаря высокой термической и химической стабильности. Эти свойства делают их удобными для проведения подтверждающих анализов, поскольку удерживание подавляющего большинства биологически активных соединений на среднеполярных фазах значительно выше, чем на слабополярных (например, в среднем диапазоне удерживания различие индексов составляет около 300-500 ед. *RI*).

Мы рассмотрели возможность пересчета библиотек и для этого случая. За основу взяли базу ФВУ «Forensic Toxicology» (Agilent Technology) [99], сформированную с использованием колонки DB-17ms, причем использовали такую же колонку. Температурные условия работы колонки весьма близки к тем условиям, при которых была сформирована исходная библиотека. Пересчет времен ФВУ в индексы приведен в Таблице 2.13.

Таблица 2.12. Преобразование ФВУ библиотеки [91] (фрагмент) для колонки EVDX-5ms ($\beta = 151$).

Соединение	t_R , мин (ФВУ)	RI (выч.)	RI (эксп.)	Отклонение		
				RI	RI , %	t_R , мин
Амфетамин	4.600	1147	1145	-2	-0.2	-0.014
Метамфетамин	5.153	1204	1196	-8	-0.6	-0.060
Никотин	6.764	1366	1377	10	0.7	0.082
Котинин	10.080	1743	1727	-16	-0.9	-0.129
Меконин	10.300	1771	1763	-8	-0.4	-0.061
Норкетамин	11.100	1875	1880	5	0.2	0.036
Кофеин	11.103	1876	1868	-8	-0.4	-0.061
Димедрол	11.360	1910	1903	-8	-0.4	-0.061
Кетамин	11.404	1916	1911	-6	-0.3	-0.046
Лидокаин	11.478	1927	1912	-15	-0.8	-0.118
Доксиламин	11.800	1971	1952	-20	-1.0	-0.158
Трамадол	12.076	2010	1995	-15	-0.8	-0.120
Фенобарбитал	12.152	2022	2014	-7	-0.4	-0.059
Хлорфенирамин	12.407	2059	2064	4	0.2	0.035
EDDP (Метадон-М)	12.674	2099	2081	-18	-0.9	-0.145
Метадон	13.380	2204	2188	-16	-0.7	-0.128
Аминоантипирин АС	14.171	2328	2317	-11	-0.5	-0.086
Нордимедрол АС	14.260	2342	2332	-10	-0.4	-0.076
Каннабидиол	14.990	2444	2438	-7	-0.3	-0.053
Кодеин	15.180	2468	2472	4	0.2	0.034
Диазепам	15.510	2509	2515	6	0.2	0.046
Морфин	15.600	2521	2530	10	0.4	0.076
Гидрокодон	15.650	2527	2542	15	0.6	0.118
Каннабигерол	16.000	2571	2589	18	0.7	0.146
Кодеин АС	16.110	2584	2588	4	0.2	0.031
3-Моноацетилморфин	16.130	2587	2604	18	0.7	0.142
Каннабинол	16.200	2595	2606	11	0.4	0.085
Тебаин	16.220	2598	2603	5	0.2	0.037
6-Моноацетилморфин	16.230	2599	2608	9	0.3	0.070
Морфин 2АС	17.320	2695	2697	2	0.1	0.018
Папаверин	19.65	2865	2890	25	0.9	0.202

Рассчитанные значения сравнивали с индексами библиотеки, сформированной в региональном отделении СМЭ. Наибольшие отклонения (до 0.7%) зафиксированы для миристиновой кислоты, барбамила, мепробамата. Для остальных соединений они не превышают 0.5%.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [100-103].

Таблица 2.13. Пересчет библиотеки ФВУ «Forensic Toxicology» (фрагмент) для колонки DB-17ms

Соединение	t_R , мин (ФВУ)	RI (выч.)	RI (эксп.)	Отклонение		
				RI	RI , %	t_R , мин
Никотин	3.484	1574	1579	-5	-0.3	-0.024
Веронал	4.890	1817	1822	-6	-0.3	-0.028
Ибупрофен	5.140	1863	1855	8	0.4	0.037
Миристиновая к-та	5.342	1900	1890	10	0.5	0.048
Метамфетамин АСт	5.460	1922	1923	-1	-0.1	-0.006
Барбамил	6.050	2037	2025	12	0.6	0.058
Нембутал	6.258	2079	2074	5	0.2	0.023
Парацетамол	6.627	2154	2161	-7	-0.3	-0.036
Котинин	6.683	2165	2170	-5	-0.2	-0.023
Димедрол	6.898	2209	2214	-5	-0.2	-0.023
Тиопентал	6.909	2212	2211	1	0.1	0.007
Лидокаин	6.970	2225	2229	-4	-0.2	-0.018
Мепробамат	7.110	2256	2240	16	0.7	0.075
Кетамин	7.222	2281	2290	-10	-0.4	-0.047
Гексенал	7.233	2283	2283	0	0.0	-0.001
Доксиламин	7.285	2294	2289	5	0.2	0.025
Трамадол	7.347	2308	2314	-6	-0.3	-0.030
Кофеин	7.540	2350	2352	-1	-0.1	-0.006
Хлорфенирамин	7.666	2378	2390	-12	-0.5	-0.057
Теобромин	7.857	2422	2419	3	0.1	0.012
Фенобарбитал	8.052	2468	2468	-1	0.0	-0.003
Новокаин	8.139	2488	2491	-3	-0.1	-0.013
Метадон	8.256	2516	2524	-8	-0.3	-0.040
Теofilлин	8.575	2592	2578	13	0.5	0.064
Амитриптилин	8.668	2615	2625	-10	-0.4	-0.048
Кокаин	9.042	2710	2722	-13	-0.5	-0.060
Промазин	9.592	2853	2861	-7	-0.2	-0.034
Примидон	10.144	3004	3020	-16	-0.5	-0.078
Аминазин	10.308	3051	3056	-4	-0.1	-0.021
Карбамазепин	10.369	3069	3079	-10	-0.3	-0.049
Диазепам	10.465	3097	3109	-13	-0.4	-0.060
Гидрокодон	10.65	3150	3161	-11	-0.3	-0.050
Трифтазин	10.713	3169	3173	-5	-0.2	-0.023
Морфин-бАС	10.785	3189	3202	-13	-0.4	-0.063
Нордiazепам	11.001	3252	3260	-8	-0.2	-0.038

Заключение

Для автоматизированной обработки ион-хроматограмм требуются постоянно пополняемые поисковые библиотеки, содержащие ХМС характеристики аналитов и, в том числе, относительные величины удерживания, предпочтительно, линейные индексы. Формирование таких библиотек возможно при наличии методов пересчета или адаптации

величин удерживания к ГХ условиям, для которых библиотека была сформирована, включая вид фазы, температурные и пневматические режимы работы колонки.

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 более полярных фаз по сравнению с менее полярными. 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.

С помощью линейных корреляционных зависимостей индексы удерживания, по крайней мере, 60-70 % тематических соединений могут быть пересчитаны для использования в других температурных режимах или для фазы иной полярности. Библиотеки ФВУ с высокой достоверностью преобразуются в библиотеки индексов при смене пневматического режима работы колонки, причем ошибки пересчета не превышают отклонений практически измеряемых значений удерживания. Это преобразование несколько ограничено различиями общего удерживания колонок. Подобный пересчет был выполнен как для слабополярной, так и для среднеполярной фаз.

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

В данной главе представлены решения частных задач, возникавших при выполнении химико-токсикологических экспертиз и не имеющих описанных ГХ-МС решений в известных нам публикациях, или же эти решения представлялись далеко не полными. В основном, задачи касаются определения соединений, характеризующихся малой химической или температурной стабильностью, а также подверженных интенсивному метаболизму. Большинство соединений, описанных в данной главе, выявляли или идентифицировали на основании частичных (и реже – достаточно полных) сведений, которые получали из доступных печатных или электронных источников. Решения, приводимые в данной главе, различны, а их обобщение затруднительно. Тем не менее, они вынесены по итогам работ, имеющих непосредственный и бесспорный практический смысл.

3.1. Нерейстоксин

Данная часть работы выполнена как теоретическое и практическое обоснование определения производных инсектицида нерейстоксина (4-диметиламино-1,3-дитиолан), **III**, в биологических объектах. Ряд субстанций, называемых аналогами (прекурсорами) нерейстоксина (бенсультап, картап, тиоциклам, тиосультап) характеризуются легкой гидролизуемостью [104], приводя к образованию действующего компонента – нерейстоксина. Бенсультап (*S,S'*-[2-(диметиламино)-1,3-пропанедил] ди-бензолтиосульфонат), **I**, является распространенным средством борьбы с колорадским жуком (*Leptinotarsa decemlineata*) и используется в виде 50%-ного смачивающегося водой порошка под торговым названием «банкол» (bancol, TI-1671, ruban, victenon, TI-78, ZZ-doricida).

Бенсультап (а, следовательно, и сам нерейстоксин) проявляют относительно низкую токсичность для млекопитающих. Например, для крыс, доза, приводящая к смерти в 50% случаев (LD_{50}) составляет около 1105 мг/кг при оральном употреблении [105].

Тем не менее, принадлежность перечисленных соединений к группе пестицидов, а также требования химико-токсикологических исследований приводят к необходимости определения соединений этой группы в биообъектах. Метод ГЖХ-определения нерейстоксина (как продукта гидролиза картапа) с использованием набивных колонок и пламенно-ионизационного детектора приведен в работе [106], определение нерейстоксина и его метаболитов в плазме крови с применением ГЖХ-МС и варианта твердофазной экстракции рассмотрен авторами [107]. Известное нам русскоязычное руководство [108] по определению бенсультапа (банкола) в агрообъектах никак нельзя считать приемлемым как из-за физико-химических свойств

бенсультапа (легкая гидролизуемость и очень низкая растворимость в воде) [104, 105], так и из-за выбранного способа анализа (тонкослойная хроматография, ТСХ). Хотя в данной работе мы рассмотрели и этот вопрос, но основные направления исследований сосредоточили на определении продукта гидролиза бенсультапа (нереистоксина), сопутствующих ему соединений и метаболитов методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и ГЖХ-МС.

Масс-спектры всех рассматриваемых соединений труднодоступны и отсутствуют в библиотеках NIST11 и MPW2011, и поэтому мы предприняли ряд попыток по их идентификации и определению структурных характеристик. Нереистоксин и тиоциклам (V, обнаружен в торговом образце банккола) идентифицированы по масс-спектрам, приведенным в базе MPW2011.

Также на основании полученной информации мы разработали способы выделения рассматриваемых соединений из биообъектов методом твердофазной экстракции (ТФЭ).

Для выявления и определения структурных характеристик метаболитов нереистоксина использовали образцы мочи, собранные у двух персон, случайно принявших банккол внутрь. Всего обнаружили 6 метаболитов, а также два продукта окисления нереистоксина.

Синтез нереистоксина. Способ синтеза 1,2-дитиолонов посредством гидролиза ди-(бензотиосульфонов) при участии межфазного катализатора описан в [109]. Поскольку мы не нуждались в высоких выходах целевого соединения, то использовали упрощенный способ синтеза. К примерно 700 мг банккола добавляли 3 мл ацетона, энергично взбалтывали до полного смачивания порошка и обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин. Затем центрифугировали, полученный раствор отделяли от осадка, фильтровали и упаривали в токе воздуха при температуре не выше 45°C. Выход полученного бенсультапа (желто-бурое легко кристаллизующееся масло) составляет примерно 50% от массы банккола, что соответствует декларированному содержанию. К выделенной субстанции добавляли 2 мл метанола и 2 мл водного раствора аммиака (1:1). Смесь перемешивали и нагревали при 50°C до полного растворения субстанции, затем охлаждали и выдерживали 1 сутки при комнатной температуре. Далее упаривали при 50°C в токе воздуха примерно до половины исходного объема, добавляли 2 мл воды и разделяли экстракцией:

- подкисляли ортофосфорной кислотой до $pH \sim 2$ и экстрагировали этилацетатом. При этом, в основном, экстрагируется непрореагировавший бенсультап;

- подщелачивали водную фазу до $pH \sim 9$ и также экстрагировали этилацетатом. После упаривания этилацетата получили около 50 мг желто-бурого масла, которое растворяли в небольшом количестве этилацетата и хранили при 4°C.

Обработка образцов мочи. Образцы мочи экстрагировали жидкостно-жидкостным методом (ЖЖЭ) по следующей методике: подщелачивали водную фазу раствором аммиака до

$pH \sim 10$ и дважды экстрагировали в хлороформ (соотношение фаз 1:1 об.). Органические экстракты объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия, упаривали в токе воздуха при температуре не выше 45°C и растворяли сухой остаток в этаноле.

Выделение компонентов и ИК-спектрометрический анализ. Сопоставление компонентов, наблюдаемых в условиях ВЭЖХ и ГХ-МС, проводили с помощью отбора водных ВЭЖХ фракций и экстракции компонентов, содержащихся в них, в хлороформ или этилацетат после подщелачивания водных фаз аммиаком до $pH \sim 9$ (при необходимости).

ИК-спектры (область $4000\text{-}400\text{ см}^{-1}$) регистрировали на спектрометре FTS Scimitar 2000 (Digilab) в таблетках KBr. В случае работы с соединениями, очищенными методом ВЭЖХ, применяли следующую методику: выделенную ВЭЖХ фракцию разбавляли водой в 3 раза и экстрагировали в хлороформ. После полного упаривания растворителя в струе воздуха при температуре не выше 45°C сухой остаток растворяли в 100-200 мкл хлороформа и наносили на порошок KBr, после чего упаривали без нагревания при перемешивании и готовили таблетку.

Бенсультап. Как указано выше, это соединение легко гидролизуеться в водной среде в присутствии оснований согласно схеме на Рисунке 3.1.

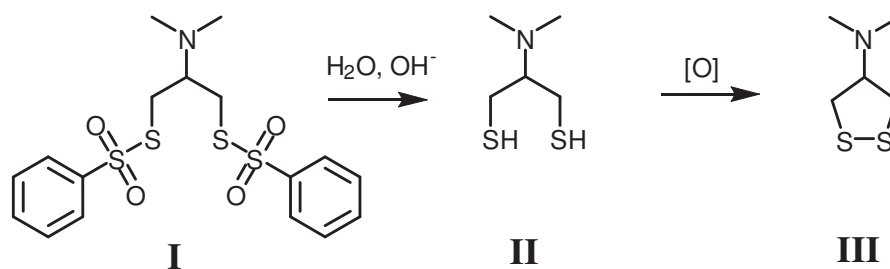


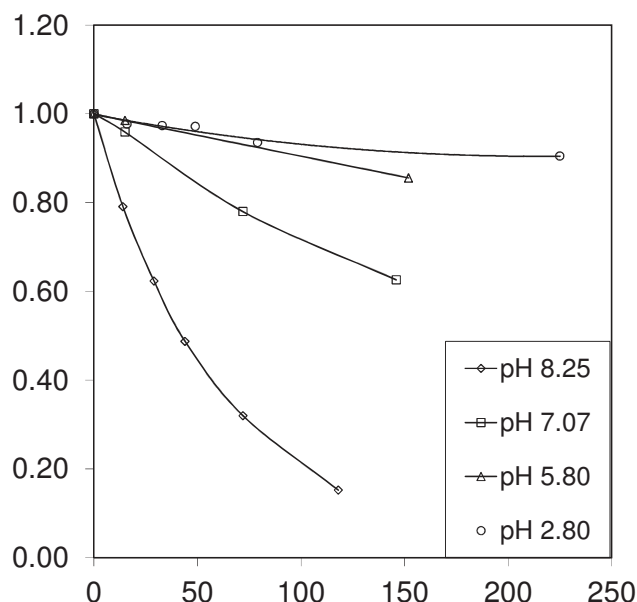
Рис. 3.1. Схема гидролиза бенсультапа.

Вторая стадия процесса (окисление) проходит очень быстро уже в присутствии кислорода воздуха, [110]. Более того, согласно нашим оценкам, гидролиз идет с заметной скоростью также и в кислых средах. При анализе методом ВЭЖХ-ДМД установлено, что в смесях, содержащих 10 мМ фосфатного буфера в воде и ацетонитрил (1:1 об.) степень конверсии бенсультапа, измеренная по исчезновению его из смеси, составляет 6, 11, 32 и 85% за 2 часа при комнатной температуре и pH 2.80, 5.80, 7.07 и 8.25, соответственно (Рисунок 3.2).

Бенсультап – термолабильное соединение, и потому использование метода ГЖХ для его определения затруднительно. Возможно, нормально-фазовые варианты жидкостной хроматографии бенсультапа следовало бы признать наиболее разумными. Но в условиях доминирования обращенно-фазового варианта необходимость перестройки хроматографической системы (а при использовании насосов Agilent 1200 еще и смена манжет)

делает их весьма накладными. При работе с кислыми элюентами гидролиз бенсультапа никак не отражается на виде хроматограммы; следует лишь заботиться о достаточно оперативной обработке растворов, содержащих бенсультап. Метод ВЭЖХ вполне пригоден для идентификации бенсультапа при необходимости подтверждения предварительных результатов, полученных методом ТСХ.

Рис. 3.2. Гидролиз бенсультапа в водных растворах при разных pH .



На Рисунке 3.3 приведена хроматограмма торгового образца бенсультапа и его УФ-спектр в условиях элюирования (описание хроматографической системы приведено в Приложении 1). Состав подвижной фазы – линейный градиент от 50 до 90 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере pH 3, 15 мин. Градуировочный график линеен, по крайней мере, в диапазоне 0.3-300 мкг/мл. Предел обнаружения 0.05 мкг/мл.

ТФЭ бенсультапа из модельных образцов. Вследствие гидролизуемости бенсультапа в основной среде, использование ионообменного механизма для его выделения не представляется разумным. Возможно применение нормально-фазовых режимов, хотя такой вариант непрактичен как по причине меньшей распространенности подобных способов очистки, так и вследствие меньшей нагрузочной способности нормально-фазовых патронов. Поэтому использовали гидрофобный вариант на патроне AccuBOND II ODS-C18 (200мг × 3 мл, Agilent Technologies). По причинам, описанным выше, мы ограничились выделением бенсультапа из простых модельных растворов. Тем не менее (вследствие характеристик удерживания бенсультапа на октадецильной фазе и режима использования сорбента), описанный способ вполне пригоден для реальных биообъектов (например, промывных вод).

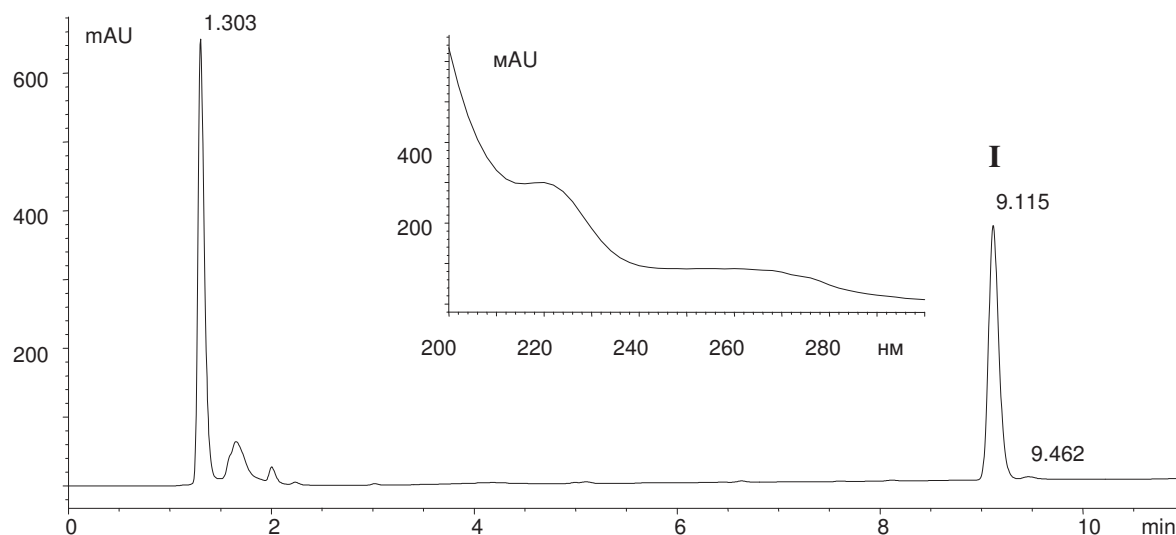


Рис. 3.3. ВЭЖХ-ДМД хроматограмма продажного образца бенсультапа (I) и его УФ-спектр в условиях элюирования. Колонка Eclipse XDB-C18 (4.6 мм × 150 мм, 5 мкм), 40°C. Состав подвижной фазы – линейный градиент от 50 до 90 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере pH 3, 15 мин.

Образец (5 мл раствора бенсультапа в 30 об.% ацетонитрила в воде с добавкой 3 мл фосфатного буфера 50 мМ, pH 5) загружали на патрон, предварительно промытый 6 мл ацетонитрила и 6 мл фосфатного буфера того же состава. Затем патрон промывали 3 мл раствора 30 об.% ацетонитрила в воде, сушили в течение 5 мин и элюировали этилацетатом. Элюат упаривали в токе воздуха при температуре не выше 45°C, растворяли остаток в стартовом элюенте и определяли содержание методом ВЭЖХ. Выход составил 96 % (S_r , % = 2, $n=3$). Данная методика достаточно надежна: мы не нашли бенсультап ни в одной порции раствора, прошедшего через патрон (кроме элюата), в том числе и при увеличении числа промывок до 4.

Нереистоксин. *Производные нереистоксина и их масс-спектры (ЭИ).* Дисульфиды легко окисляются [111]. Предварительные исследования показали, что нереистоксин нестабилен: в его растворах при стоянии образуются, по крайней мере, 3 дополнительных компонента (IV, IV' и V), Рисунки 3.4 и 3.5. Эти же соединения, наблюдаемые как методом ГХ-МС, так и ВЭЖХ-ДМД, присутствуют в синтетической смеси. Индексы удерживания приведены в Таблице 3.1. Поскольку очевидно, что данные компоненты могут присутствовать в биоматериале – и, в первую очередь, в гнилостно измененных образцах – мы предприняли ряд попыток по определению их структур.

Заметные количества IV образуются в кислых растворах нереистоксина (III) в присутствии небольших количеств перекиси водорода. Кроме того, можно отметить следующее. Нереистоксин не имеет хиральных атомов. Но при переходе III→IV образуется

сразу 2 оптических центра; таким образом, следует ожидать образования смеси диастереомеров. Как на ВЭЖХ-ДМД, так и на ГХ-МС хроматограммах заметны 2 компонента, обладающие очень близкими УФ- и масс-спектрометрическими характеристиками (см. далее). Хроматографическое поведение этих компонентов также подобно.

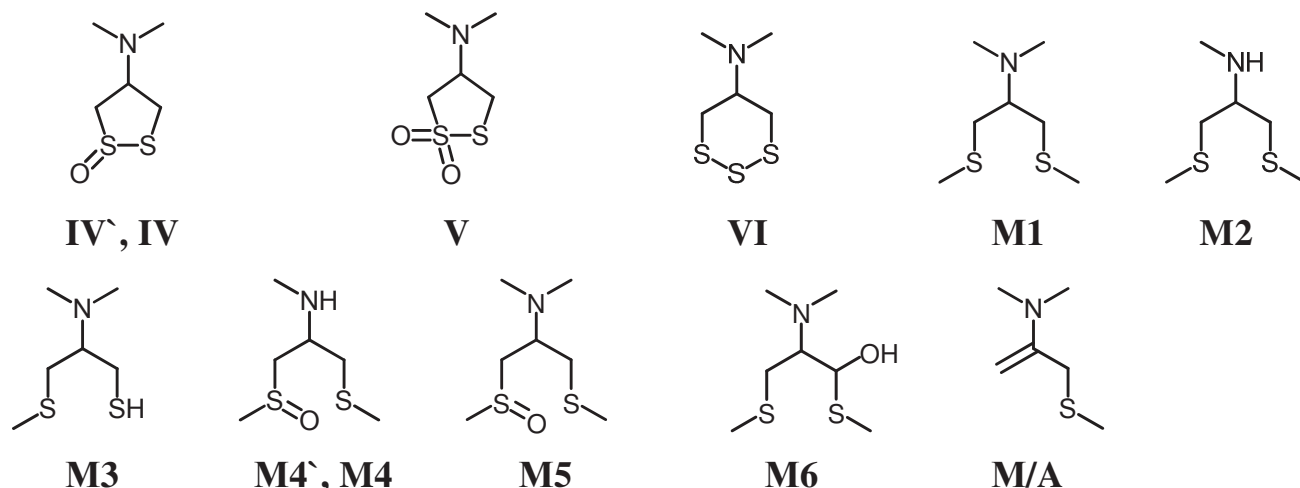


Рис. 3.4. Структуры метаболитов и производных нерейстокина.

ЭИ спектры некоторых рассматриваемых соединений приведены на Рисунке 3.6. Пики молекулярных ионов соединений **IV-VI** весьма малоинтенсивны (~1-3%). Тем не менее, изотопные распределения молекулярных ионов (Рисунок 3.7) ясно указывают на наличие серы (относительные интенсивности пиков ионов несколько искажены вследствие их измерения вблизи предельных значений). Также можно отметить наличие ионов $[M-H]^+$, что свидетельствует о вероятной енолизации молекулярных ионов, характерной для сульфоксидов [112] и сульфонов (например, для 1,2-дитиолана-1,1-диоксида, библиотека NIST11). Спектры всех рассматриваемых соединений характеризуются интенсивными сигналами ионов $[C_4H_9N]^+$ (m/z 71, Рисунок 3.6). Предполагаемые фрагментные ионы (ЭИ) приведены на Рисунке 3.8.

Спектры соединений **III, IV, IV', VI** имеют интенсивные пики ионов $[M-CH_2S]^+$, (у **V** этот пик также существует, хотя малоинтенсивен) что говорит о подобии их структур; спектр соединения **IV, IV'** характеризуются наличием $[M-OH]^+$ (m/z 148) – одним из характеристичных ионов S-оксидов тиоцикланов [112, 113].

ИК- и УФ-спектры. В ИК-спектре соединения **IV** можно отметить наличие интенсивной полосы при 1071 см^{-1} , а в спектре **V** – двух полос 1310 и 1132 см^{-1} . Эти наблюдения не противоречат указанием на наличие полосы 1132 см^{-1} у сульфоксидов вида $RS(O)R$ и двух полос 1324 и 1151 см^{-1} у сульфонов $RS(O)_2R$ [111], где отмечается, что все полосы

(предположительно обусловленные вибрационными колебаниями связи S-O) интенсивны. Для соединения **V** также можно отметить подобие положения полос с данными работы [111].

Таблица 3.1. Индексы удерживания нереистоксина, его производных и метаболитов для трех двух фаз при двух температурных режимах.

Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	EVDX-5ms		HP-5		DB-17ms	
			Реж. I	Реж. II	Реж. I	Реж. II	Реж. I	Реж. II
III (нереистоксин)	C ₅ H ₁₁ NS ₂	149	1309	1297	1300	1290	1527	1516
IV	C ₅ H ₁₁ NOS ₂	165	1551	1529	1539	1518	1892	1867
IV	C ₅ H ₁₁ NOS ₂	165	1580	1558	1563	1544	1927	1903
V	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S ₂	181	1637	1615	1632	1613	2028	2003
VI (тиоциклам)	C ₅ H ₁₁ NS ₃	181	1554	1532	-	-	1803	1780
M1	C ₇ H ₁₇ NS ₂	179	1396	1387	-	-	1602	1594
M2	C ₆ H ₁₅ NS ₂	165	1341	-	-	-	1544	-
M2 AC	C ₈ H ₁₇ NOS ₂	207	1719	1702	-	-	2070	2049
M3 AC	C ₈ H ₁₇ NOS ₂	207	1595	1587	-	-	1850	1840
M3 TMS	C ₉ H ₂₃ NS ₂ Si	237	1548	-	-	-	-	-
M4	C ₆ H ₁₅ NOS ₂	181	1633	1615	-	-	1996	-
M4 AC	C ₈ H ₁₇ NO ₂ S ₂	223	-	1929	-	-	2450	2418
M4	C ₆ H ₁₅ NOS ₂	181	1639	1621	-	-	2008	-
M4 AC	C ₈ H ₁₇ NO ₂ S ₂	223	-	1953	-	-	2488	2457
M5	C ₇ H ₁₇ NOS ₂	195	1696	1681	-	-	2064	2042
M5	C ₇ H ₁₇ NOS ₂	195	1696	1681	-	-	2067	2046
M6 AC	C ₉ H ₁₉ NO ₂ S ₂	237	1713	1702	-	-	1999	1986
M6 TMS	C ₁₀ H ₂₅ NOS ₂ Si	267	1685	-	-	-	-	-

УФ-спектры компонентов **III-V** зарегистрированы в элюенте 10 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере 10 мМ, *pH* 3 с добавкой 5 мМ гексансульфоната. Величины λ_{MAX} для нереистоксина – 207 и 321 нм (вторая полоса соответствует поглощению дисульфидной группе в пятичленном цикле [110]); для компонента **III** – 241 нм и плечо ~204 нм. Компонент **V** характеризуется только концевым поглощением и очень слабой полосой 254 нм.

Величины pK_a нереистоксина и продуктов его окисления. Величины pK_a определяли для разработки метода экстракции и подтверждения предполагаемых структурных характеристик. Известно, что для третичного азота с алкильными заместителями (подобно части молекулы нереистоксина) примерная величина $pK_a \sim 10$. Однако, измерение pK_a хроматографическим методом в элюентах 30 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере привело к величине 6.20 (Таблица 3.2, доверительный интервал указан для доверительной вероятности 95%), что более соответствует наличию арильного заместителя и делокализации неподеленной пары электронов атома азота. Причиной такой делокализации разумеется, является близость сопряженного

дисульфидного фрагмента. Катионы соединений **IV** (**IV'**) и **V** депротонируются еще легче. Величины pK_a располагаются в ряду **III** > **IV** > **V**, что может свидетельствовать о последовательном изменении структур.

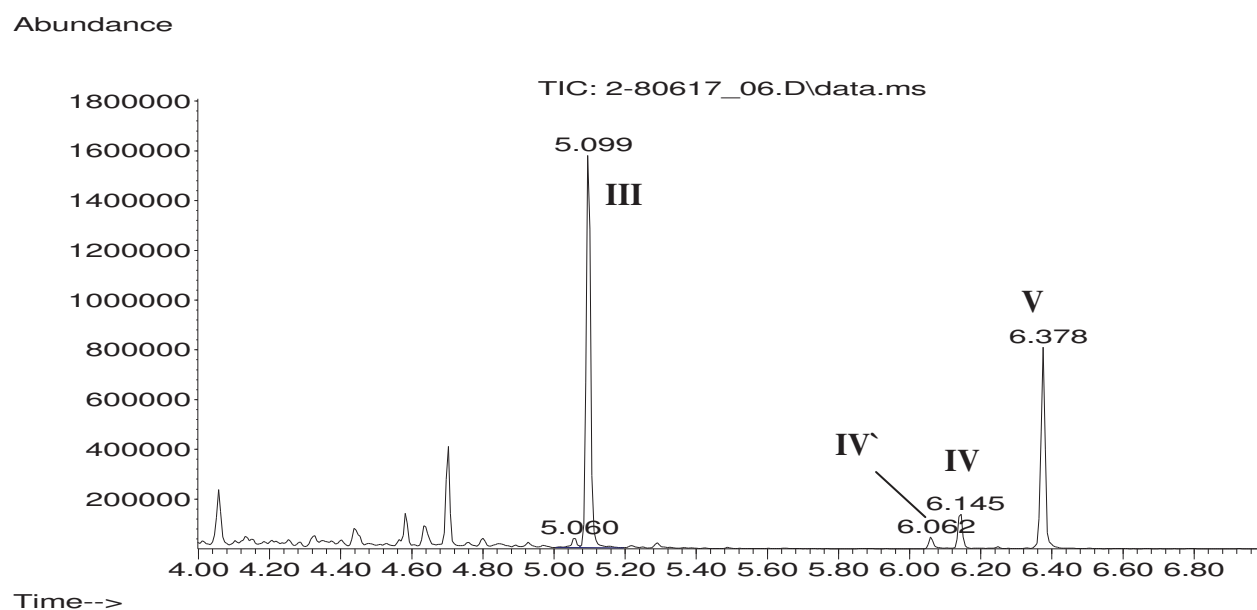


Рис. 3.5. ГХ-МС (ЭИ) хроматограмма компонентов гидролизной смеси. Колонка EVDX-5ms, режим I.

Следует также отметить, что при переходе в молекулярные формы, УФ-спектры компонентов **III-V** несколько изменяются: в частности, для **V** исчезает слабая полоса 254 нм; для компонента **IV** полоса 241 нм почти не выражена (плечо).

Влияние концентрации ион-модифицирующего реагента (гексансульфоната натрия) на ВЭЖХ удерживание нереистоксина и продуктов его окисления в кислом элюенте. Как предыдущее, так и данное наблюдение свидетельствует о том, что в кислых элюентах ($pH \leq 3$) все 3 соединения находятся в катионной форме. Варьирование содержания гексансульфоната в элюенте приводит к выводу об однозарядности катионов **IV** и **V**. Поскольку катион нереистоксина также однозаряден, то основанием для такого вывода служит близость к 1 коэффициентов b_i (наклонов линейной зависимости) уравнения 3.1, выражающего в логарифмической форме удерживание **IV**, **V** относительно **III** (Таблица 3.2, состав элюента 8 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере pH 3). Как соединение **IV**, так и **V** проявляют свойства однозарядных катионов.

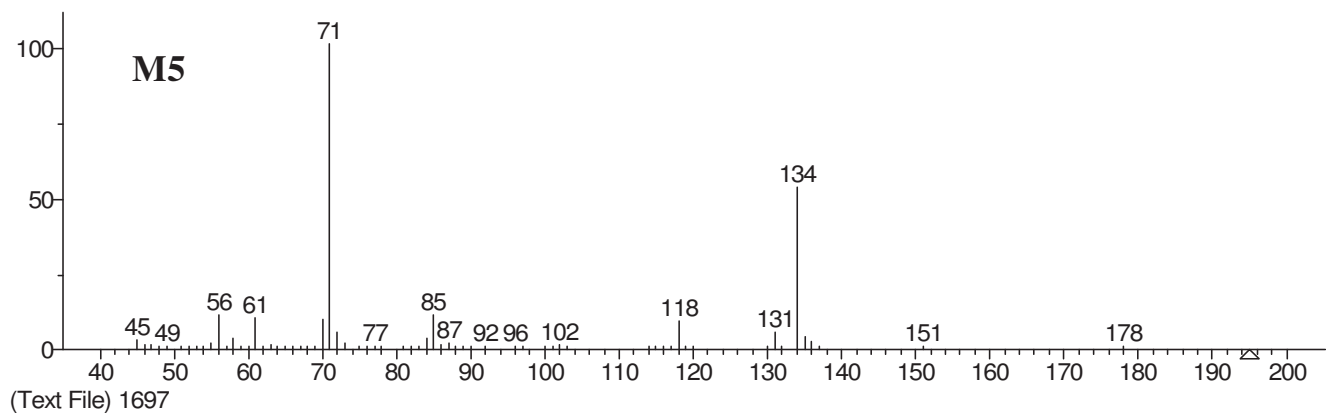
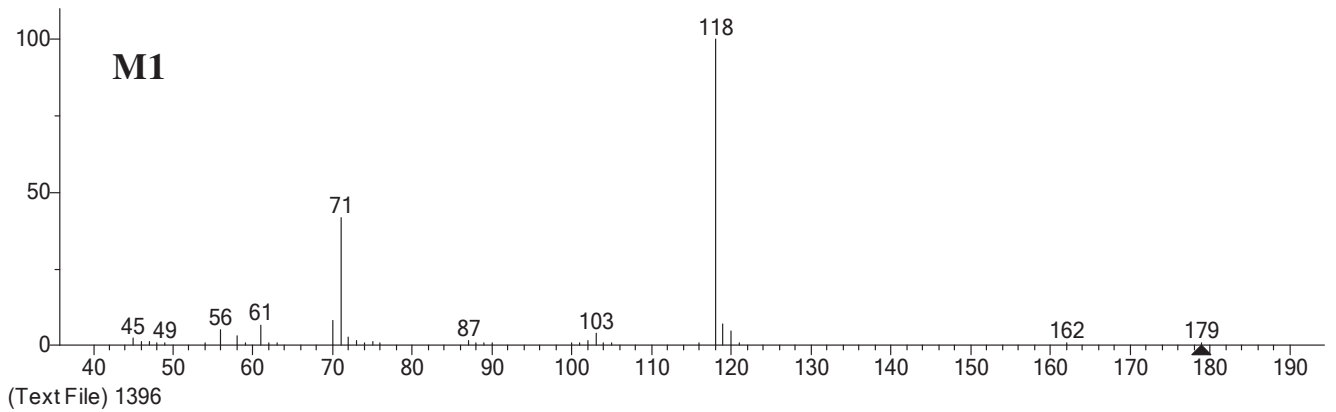
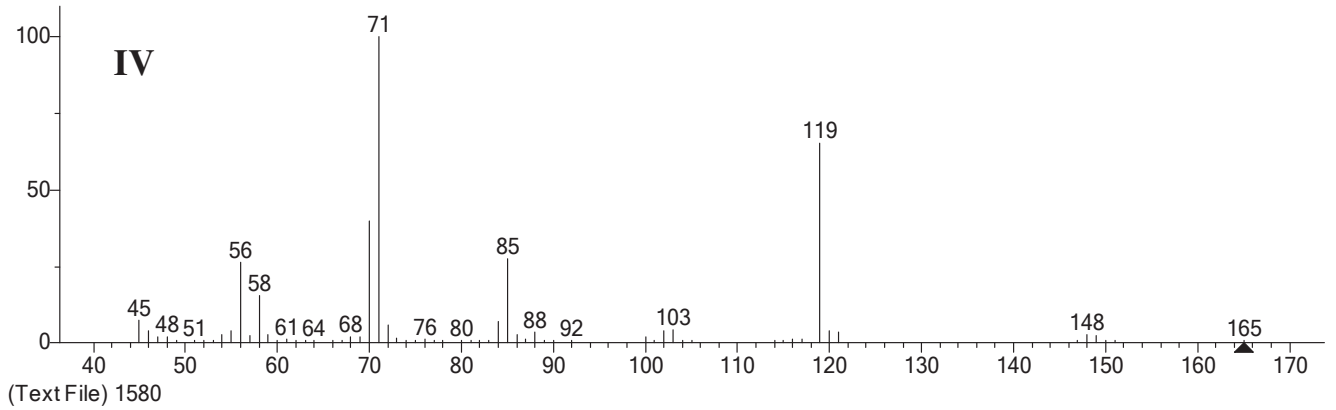
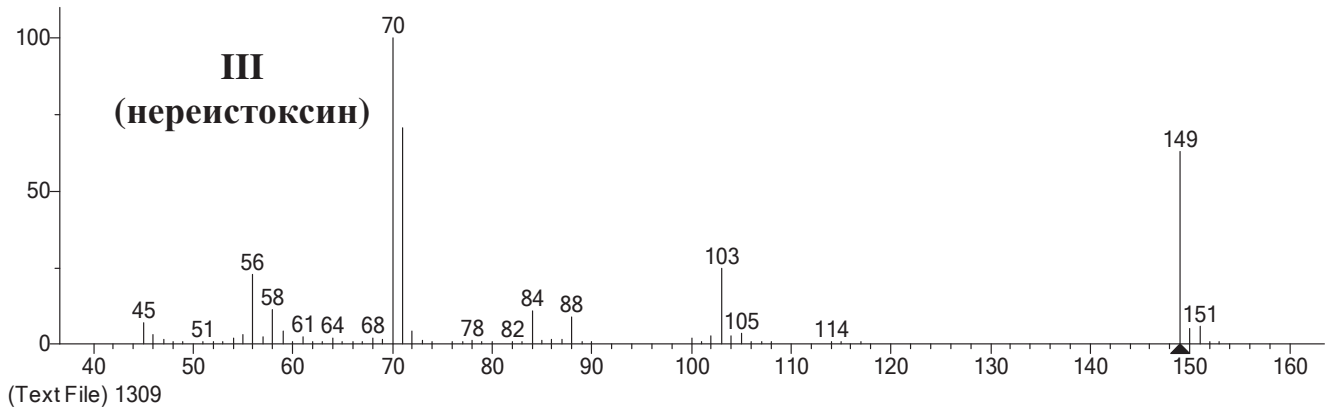


Рис. 3.6. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) нереистоксина, его производных и метаболитов.

Таблица 3.2. Наклоны линейных логарифмических зависимостей относительного удерживания. В скобках указаны значения коэффициента детерминации (R^2).

Соединение	Добавки		pK_a
	Гексансульфонат	Ацетонитрил	
III (нереистоксин)	-	-	6.20 ± 0.09
IV	1.213 (0.994)	1.009 (0.999)	5.1 ± 0.3
V	0.997 (0.999)	0.790 (0.999)	4.03 ± 0.07

Влияние концентрации ацетонитрила на ВЭЖХ удерживание *нереистоксина* и продуктов его окисления в кислом элюенте. Эту характеристику исследовали в слабоосновных элюентах (pH 8.2), в которых все 3 соединения находятся в молекулярной форме. Также для определения относительного удерживания использовали линейную логарифмическую зависимость (3.1). Рассчитанные коэффициенты b_i приведены в Таблице 3.2. В то время, как изменение удерживания **IV** полностью подобно изменению удерживания *нереистоксина*, соединение **V** демонстрирует очевидное отличие (наклон b_i значительно ниже), что может говорить о меньшем числе молекул ацетонитрила, необходимых для замещения молекулы **V** в неподвижной фазе [114].

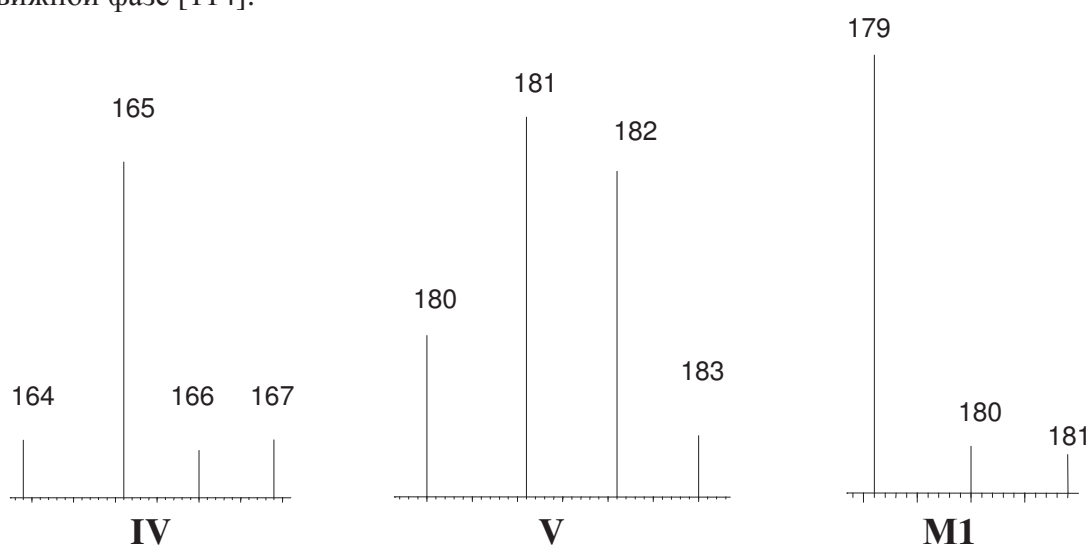


Рис. 3.7. Изотопные распределения молекулярных ионов соединений **IV**, **V** и **M1**.

$$\lg k'_i = a_i + b_i * \lg k'_{III} \quad (3.1)$$

ТФЭ *нереистоксина* и продуктов его окисления. Соединения **III-V** являются катионами при $pH \leq 3$ и неплохо растворимы в воде. Однако, к сожалению, для их выделения неприменимы ионообменные методы.

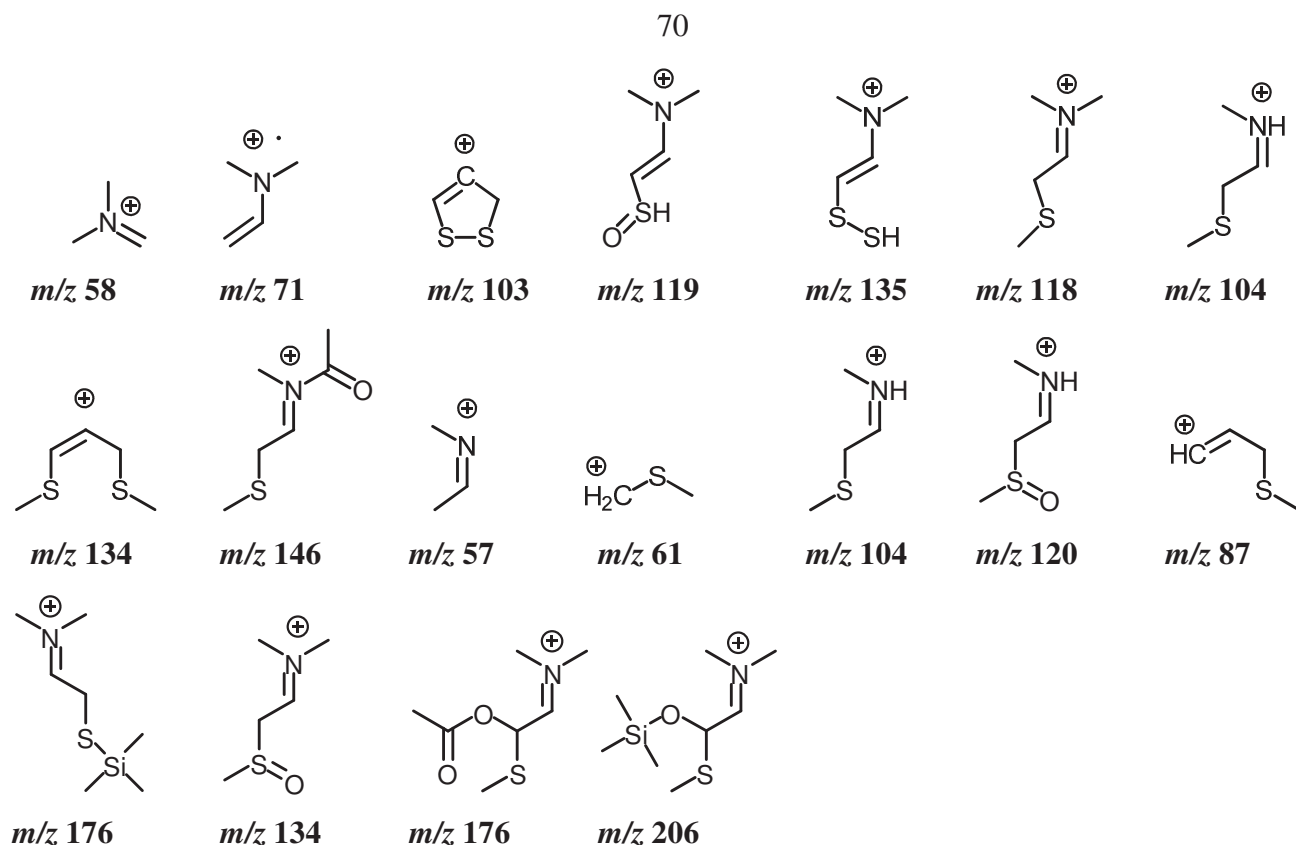


Рис. 3.8. Предполагаемая ЭИ фрагментация и величины m/z фрагментарных ионов неристоксина, его производных и метаболитов.

Попытки их сорбирования на патронах AccuBOND II EVIDEX (200мг × 3 мл, Agilent), заполненных смешанным гидрофобно-катионообменным сорбентом, приводили к относительно высоким выходам только при низкой ионной силе загружаемого раствора. При переходе к реальным образцам (моча, экстракты биологических тканей) выход аналитов резко снижался (~15%) что, скорее всего, обусловлено малыми константами обмена. Эти соединения могут быть экстрагированы с применением гидрофобного механизма, но подобный подход неизбежно расширит круг соэлюируемых соединений а, следовательно, значительно снизит чистоту экстрактов.

В таком случае можно воспользоваться различием гидрофобного удерживания ионных и молекулярных форм **III-V**, Таблица 3.2. Действительно, такой подход не является стандартным способом использования обращенно-фазовых патронов. Но различие в удерживании форм (в 30-50 раз) делает его вполне применимым.

5 мл водного раствора образца доводили до pH 9 добавками водного раствора аммиака, добавляли 3 мл 100 мМ водного раствора K_2HPO_4 (pH ~8.3) и загружали на патрон, предварительно промытый 6 мл ацетонитрила и 6 мл раствора гидрофосфата калия. Затем патрон промывали 3 мл раствора того же буфера и элюировали 3 мл фосфатного буфера 100 мМ pH 2. Полученный элюат подщелачивали водным раствором аммиака до pH 9 и

экстрагировали в этилацетат или хлороформ (измеренные коэффициенты распределения для нереистоксина больше 9). Органический растворитель упаривали в токе воздуха при температуре не выше 45°C, растворяли остаток в подходящем растворителе и определяли содержание методом ВЭЖХ или ГХ-МС.

Выход соединений **III-V** составил 88, 74, 86% соответственно на модельных (водных) растворах; приведенные значения усреднены по измерениям выходов на двух патронах.

Надежность сорбции соединений **III-V** исследовали методом ВЭЖХ с помощью последовательных промывок патрона раствором гидрофосфата калия после загрузки образца. В основном, элюируется соединение **V**; остальные соединения в промывочных растворах не обнаружены.

Потери нереистоксина обусловлены в основном, затяжкой его концентрационного профиля при элюировании. Эта затяжка вызвана катионной активностью сорбента и при необходимости может быть снижена увеличением количества элюента (например, при двукратном элюировании выход увеличивается до 92-95%), либо добавками азотистого основания (триэтиламина). Тем не менее, важного практического значения подобные осложнения не имеют.

Выход нереистоксина при извлечении его из мочи составил 93% (расхождение между двумя параллельными определениями 0.6%). Следует отметить, что ввиду интенсивного метаболизма нереистоксина – и, следовательно, малого его содержания в моче (по сравнению с метаболитами), описанный метод имеет лишь иллюстративный характер.

Водные извлечения, полученные из биологических тканей с добавками бенсультапа, обрабатывали по такой же методике, но количественных измерений не проводили. Основным компонентом выделенной смеси является нереистоксин.

Для увеличения концентрации нереистоксина в экстрактах биообразцов схема анализа может быть дополнена стадией основного гидролиза остаточного бенсультапа. Но, учитывая его быстрый гидролиз, мы полагаем эту стадию необязательной, по крайней мере, в большинстве практических случаев. Предел обнаружения нереистоксина при использовании колонки EVDX-5ms и температурного режима I примерно равен 0.1 мкг/мл (регистрация общего ионного тока).

Продукты окисления нереистоксина были обнаружены впоследствии в биообразцах при проведении экспертиз.

Мочевые метаболиты нереистоксина. Согласно [115], основными путями метаболизма **III** у млекопитающих являются S-метилирование, окисление и N-дезметилирование, проходящие через стадию образования дигидронереистоксина **II**. В моче персон, случайно

принявших банкол внутрь нами обнаружено методом ГХ-МС 6 метаболитов нереистоксина (Рисунок 3.9). Неизмененный нереистоксин присутствовал в следовых концентрациях.

Предположения о структурах метаболитов, сделанные нами, учитывали данные работ [106, 115]. Существенным затруднением для ГХ-МС выявления и идентификации метаболитов нереистоксина является отсутствие или весьма малая интенсивность пиков молекулярных ионов. Тем не менее, фрагментация этих соединений в целом, несложна и заключается в разрыве связи между метиленовой группой и остальной (азотосодержащей) частью молекулы, причем заряд остается на последней.

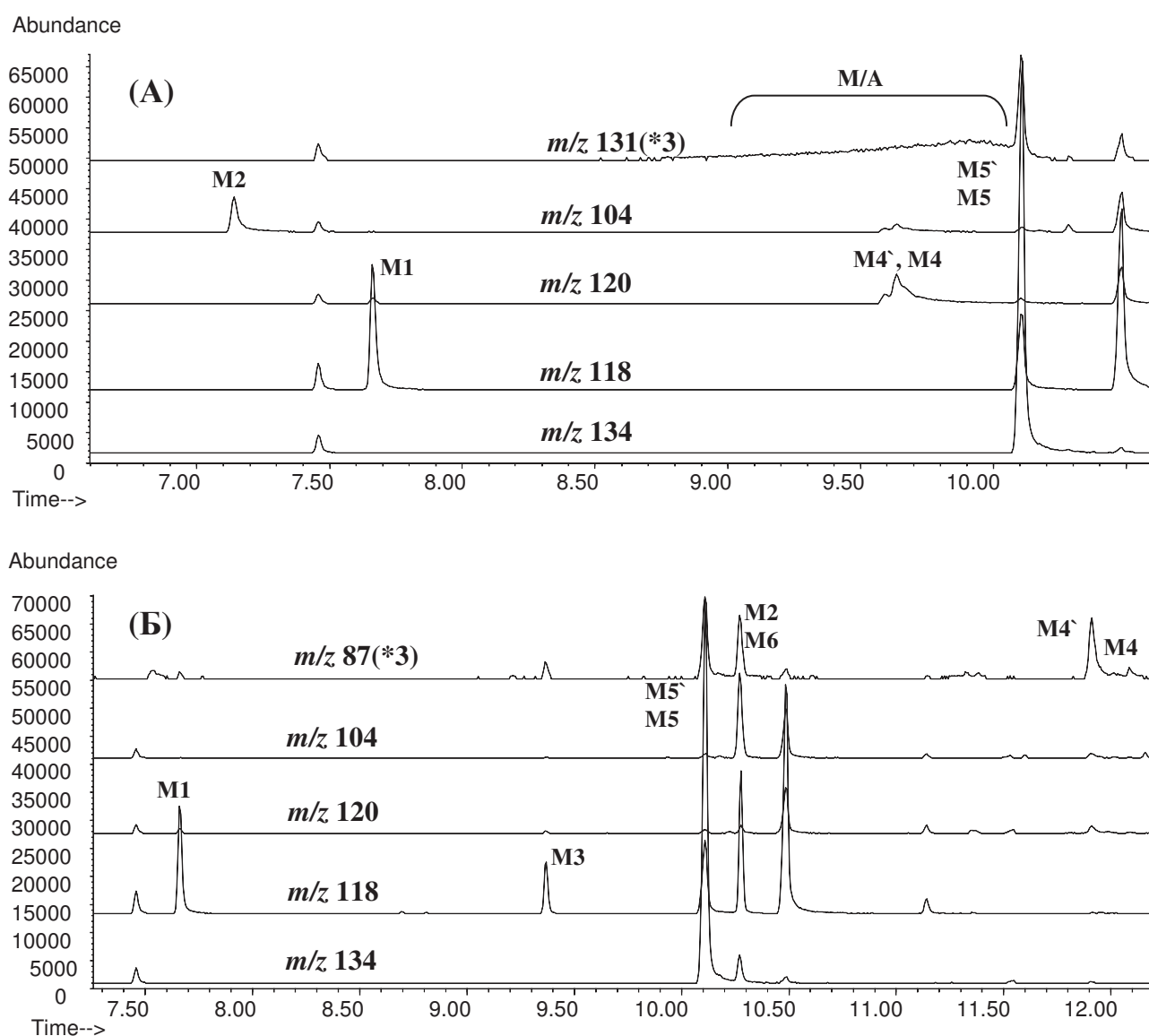


Рис. 3.9. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Свободные формы (А) и АС дериваты (Б). Колонка EVDX-5ms, режим II.

Изотопное распределение молекулярного иона метаболита **M1** указывает на наличие серы (Рисунок 3.7). Симметричная структура **M1** фрагментируется с образованием интенсивного пика иона, m/z 118, в спектре при элиминировании радикала $C_2H_5S^\bullet$.

Молекулярный ион N-дезметилированного метаболита **M2** элиминирует этот же радикал, что выражается в появлении интенсивного пика иона, m/z 104. Спектр АС деривата метаболита **M2** также имеет ион, m/z 104, но он образуется в результате элиминирования молекулы кетена (C_2H_2O) от иона, m/z 146. Данный процесс типичен для ацетилированных дериватов. Ион-радикал, m/z 134, наблюдаемый в спектре АС деривата **M2** образуется при элиминировании кетена и диэтиламина от молекулярного иона, присутствующего в спектре.

Тиольный метаболит **M3** обнаружили только после дериватизации. Интенсивный пик иона, m/z 118 и менее интенсивный, m/z 71, указывают на наличие диметилированного атома азота и метилированного – серы. Ион, m/z 176 соответствует триметилсилилированному фрагменту, образуемому при элиминировании радикала $C_2H_5S^\bullet$ от молекулярного иона.

Хроматографические пики, отнесенные к метаболитам **M4'** и **M4** (равно как и их АС дериваты) образованы диастереомерами, и их спектры попарно подобны. Ионы, m/z 104 и 120, в спектрах свободных форм, также образуются при разрыве связей между метиленовыми группами и азотосодержащей частью структур, причем положительный заряд с большей вероятностью сохраняется на фрагменте с кратной связью. В спектрах ацетатов эти ионы имеют ацетилированные аналоги (m/z 146 и 162), причем ионы, m/z 104 и 120, соответственно, образуются при элиминировании кетена. Объяснить природу существования интенсивного пика иона, m/z 87, на основании имеющихся данных затруднительно; по-видимому, он образуется в результате последовательной фрагментации.

Метаболит **M5** (возможно, его пик соответствует неразделенной смеси диастереомеров) содержит сульфоксидную группу, что проявляется в спектре наличием иона, m/z 134. Ионы, m/z 71 и 118 (малоинтенсивный пик) указывают на наличие диметилированного азота и метилированного атома серы.

Метаболит **M6** (заметный только после дериватизации) предположительно идентифицирован как продукт гидроксирования **M1**. В спектре TMS деривата присутствует ион, m/z 206, являющийся продуктом триметилсилилирования гидроксильной группы, а в спектре АС деривата ему соответствует ион, m/z 176 и малоинтенсивный пик иона, m/z 132 (продукт элиминирования кетена).

Оба метаболита, структуры которых содержат сульфоксидные группы, характеризуются малой термической стабильностью. Термолиз **M5** (**M5'**) в ГХ колонке сопровождается появлением продукта **M/A**, предположительно идентифицированного как N,N-диметил-3-(метилтио)проп-1-ен-2-амин (Рисунки 3.4 и 3.9). Этот процесс существенно замедляется при

снижении температуры разделения (хроматограммы на Рисунке 3.9 получены в более мягком режиме II).

ТФЭ метаболитов нереистоксина. К сожалению, перечисленные метаболиты плохо удерживаются на обращенно-фазовых патронах AccuBOND II ODS-C18 в их рабочем диапазоне pH , что связано с гидрофильностью этих соединений и высокими величинами pK_a .

Патроны AccuBOND II EVIDEX со смешанной фазой могут быть использованы для выделения диметилдигидронереистоксина (**M1**) из экстрактов биообразцов. По крайней мере, в наших измерениях это соединение является одним из основных наблюдаемых метаболитов. Тем не менее, нам не удалось добиться высоких значений выхода. Причины этого затруднения, по-видимому, аналогичны причинам низкого выхода, получаемого при выделении нереистоксина с использованием этих же патронов.

Количественные измерения проводили на образцах мочи с добавками смеси метаболитов по следующей методике. 5 мл мочи подкисляли до $pH \sim 2$ ортофосфорной кислотой и добавляли 3 мл водного раствора ортофосфорной кислоты ($pH \ 2$). Полученную смесь фильтровали и наносили на патрон, предварительно промытый 6 мл ацетонитрила и кондиционированный 6 мл водного раствора ортофосфорной кислоты ($pH \ 2$). Затем патрон промывали 3 мл этого же раствора кислоты, 3 мл ацетонитрила и сушили потоком воздуха в течение 1 мин. Адсорбаты элюировали 3 мл смеси 78:20:2 (об., дихлорметан:изопропанол:водный раствор аммиака, конц.). Элюат упаривали при температуре не выше $45^\circ C$ в токе воздуха, полученный сухой остаток растворяли в необходимом количестве этанола и анализировали методом ГХ-МС. Выход метаболита **M1** составил 52% (при усреднении результатов, полученных при использовании двух патронов), расхождение 0.5%. Выход метаболитов **M5'** и **M5** очень низок (менее 5 %); выход дезметилированных продуктов не измеряли количественно, тем не менее, он также невысок (около 10-20 %).

Данная методика является общей для определения основных соединений в экстрактах биообразцов. Из-за необходимости применения широкого диапазона pH , и малоселективного гидрофобного механизма получаемые элюаты не могут быть очень чистыми, однако наблюдаемое содержание в них посторонних примесей значительно ниже, чем растворах, получаемых при обычной процедуре экстракции.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [116-118].

3.2. Дроптаверин

Дроптаверин (но-шпа, 1-(3,4-диэтоксibenзил)-6,7-диэтокси-3,4-дигидроизохинолин гидрохлорид) – синтетический аналог папаверина, широко распространенное в

фармакологической практике соединение, обладающее миотропным спазмолитическим действием [118].

География публикаций, посвященных определению дротаверина (и, следовательно, области его лицензирования) ограничена; он не популярен в США и ряде стран Западной Европы. Этим объясняется отсутствие характеристик дротаверина и его производных в известном справочнике «Clarke's Analysis of Drugs and Poisons» [49], а также в основных хроматомакс-спектрометрических библиотеках.

Экспресс-определение дротаверина может быть выполнено электрохимическими способами [120, 121], в работе [121] представлен вариант дротаверин-селективного электрода. Можно сказать, что основными и наиболее надежными способами определения являются различные варианты спектрофотометрических и хроматографических методик [122-131]. Тонкослойная хроматография со спектроденситометрическим детектированием, методы расчета УФ-спектроскопических производных и отношений [122-125] более пригодны для определения дротаверина в достаточно свежих фармацевтических препаратах. Легкая окисляемость дротаверина, приводящая к образованию ряда соединений, подобных как по спектрофотометрическим характеристикам, так и по хроматографическому поведению в условиях ТСХ ограничивает область применимости этих методов.

ВЭЖХ – естественный и достаточно надежный способ определения дротаверина. Предложен нормально-фазовый [126], обращено-фазовые [127, 128], ион-парный [129] варианты. Представленный подбор хроматографических условий может вызывать некоторые сомнения вследствие зависимости состояния хромофоров дротаверина и ряда его производных от кислотности среды.

Применение ГХ-МС представляет ряд неоспоримых преимуществ, позволяя сводить частные методики определения к более общим, что приобретает особую ценность при обзорном анализе образцов с неизвестным содержанием лекарственных и наркотических соединений. Основная цель данной части - разработка ГХ-МС метода определения дротаверина, выявление и определение структурных характеристик его производных (продуктов окисления и гидролиза) и метаболитов в биообразцах, включая подготовку проб методами ЖЖЭ и ТФЭ. Также мы предлагаем откорректированную ВЭЖХ-методику определения указанных соединений.

Для поиска и определения продуктов деградации дротаверина применяли доступные ампулированные и таблетированные фармацевтические препараты, с разными сроками хранения или же состаренные искусственно добавками пероксида водорода или пиридина при доступе воздуха. Для определения этих же соединений и обнаружения метаболитов использовали следующие биоматериалы:

- образцы мочи, собранные у живых лиц, принимавших дротаверин;

- посмертные образцы мочи людей;
- образцы экстрактов тканей (печень, почки, мочевого пузыря), собираемые при проведении судебно-медицинских экспертиз.

Окислительная деградация дротаверина. Важнейшей структурными особенностями дротаверина (IV) являются наличие азометиновой группы в изохинолиновом цикле, связанной с диэтоксibenзильным фрагментом. Эта особенность (подтвержденная методом ЯМР [130]) определяет низкую стабильность, что особенно характерно для дротаверина в форме основания. Окисление (и последующая окислительная деградация) дротаверина приводит к образованию многочисленных продуктов, хорошо заметных при проведении ВЭЖХ растворов, содержащих дротаверин и подвергавшихся сколько-то длительному воздействию кислорода воздуха или неверной обработке. На Рисунке 3.10 приведены структуры тех соединений, которые могут наблюдаться в условиях ГХ-МС.

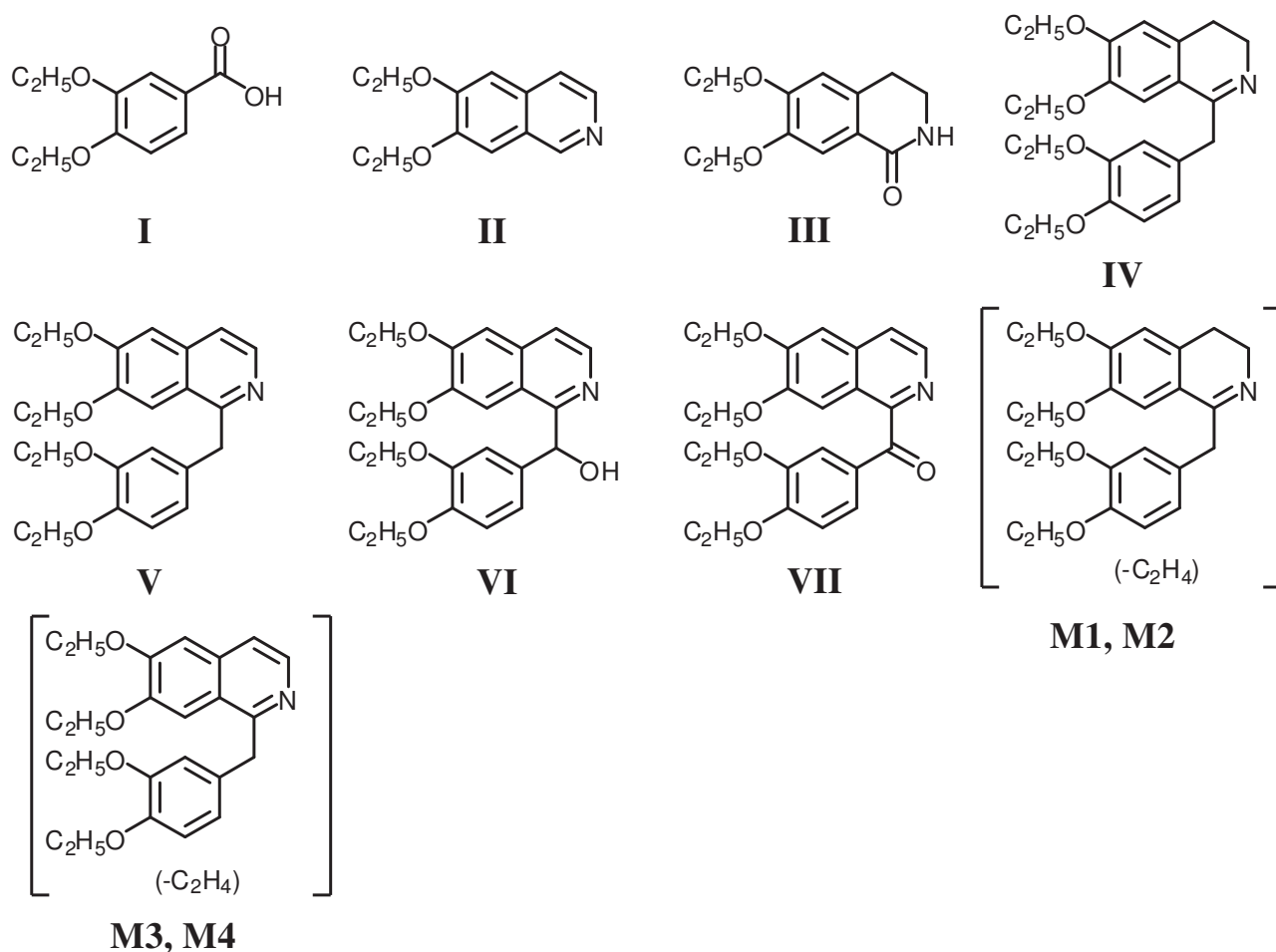


Рис. 3.10. Структуры дротаверина, продуктов его деградации и метаболитов.

Окисление дротаверина может протекать (последовательно или параллельно) как с участием мостиковой метиленовой группы, соединяющей циклические фрагменты, так и с участием метиленовых групп, принадлежащих к изохинолиновому циклу [130, 131]. В первом

случае образуется этаверин (V) - спазмолитик, входящий в ряд фармацевтических композиций и постоянный спутник дротаверина в образцах. Соединение VII весьма стабильно и (подобно этаверину) также почти всегда присутствует в дротаверин-содержащих смесях; соединение VI напротив, весьма неустойчиво. Дальнейшая деградация приводит к разделению бензильного и изохинолинового остатков и образованию (в частности) диэтоксильного производных бензойной кислоты (I), изохинолина (II) и дигидроизохинолинона (III).

ГХ-МС (ЭИ) идентификация продуктов деградации дротаверина. Масс-спектры (ЭИ) части обсуждаемых соединений приведены на Рисунке 3.11, а линейные индексы удерживания (в алкановой шкале) – в Таблице 3.3. ЭИ фрагментация всех соединений характеризуются хорошо заметными молекулярными ионами. На Рисунке 3.12 изображены ион-хроматограммы образца посмертной мочи человека, принимавшего дротаверин.

Таблица 3.3. Индексы удерживания дротаверина, его производных и метаболитов для двух фаз (ГХ, режим I).

Соединение	Брутто-формула	Индексы	
		EVDX-5ms	DB-17ms
I Et	$C_{13}H_{18}O_4$	1754	2056
I TMS	$C_{14}H_{22}O_4Si$	1792	-
II	$C_{13}H_{15}NO_2$	1971	2327
III	$C_{13}H_{17}NO_3$	2271	2819
III AC	$C_{15}H_{19}NO_4$	2306	2767
IV	$C_{24}H_{31}NO_4$	2917	3518
V	$C_{24}H_{29}NO_4$	3010	3644
VI	$C_{24}H_{29}NO_5$	3203	3903
VII	$C_{24}H_{27}NO_5$	3299	4034
M1	$C_{22}H_{27}NO_4$	2878	3482
M2	$C_{22}H_{27}NO_4$	2892	3503
M3	$C_{22}H_{25}NO_4$	2951	3582
M4	$C_{22}H_{25}NO_4$	2978	3622

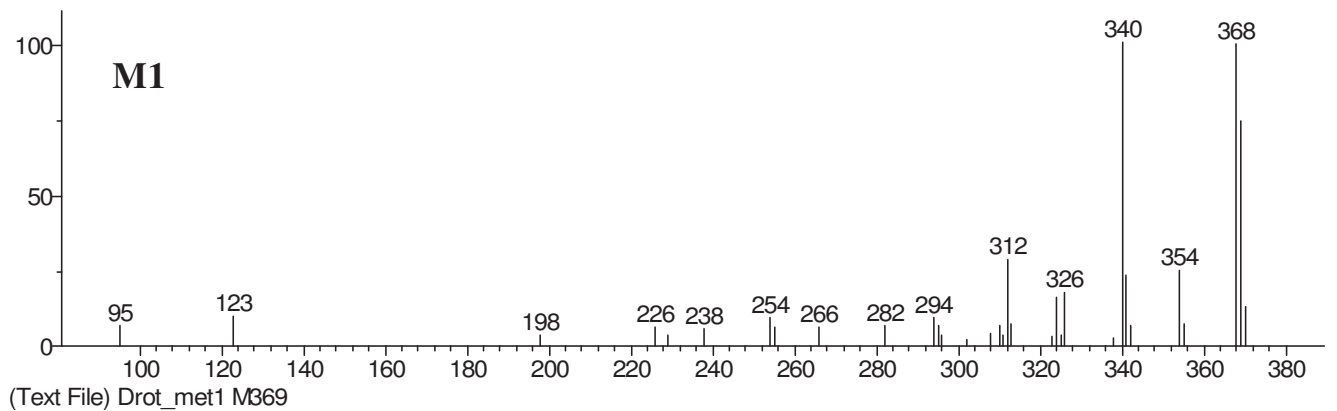
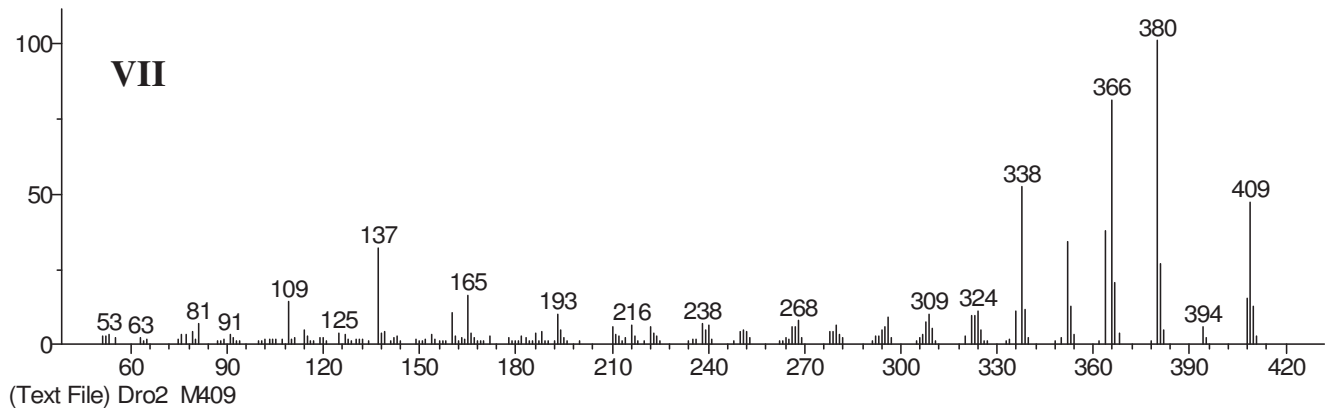
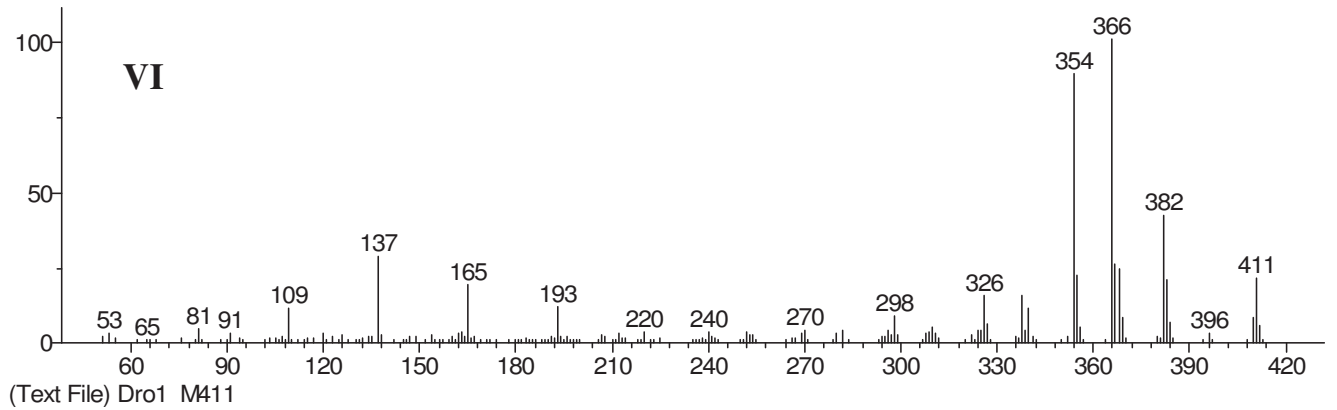
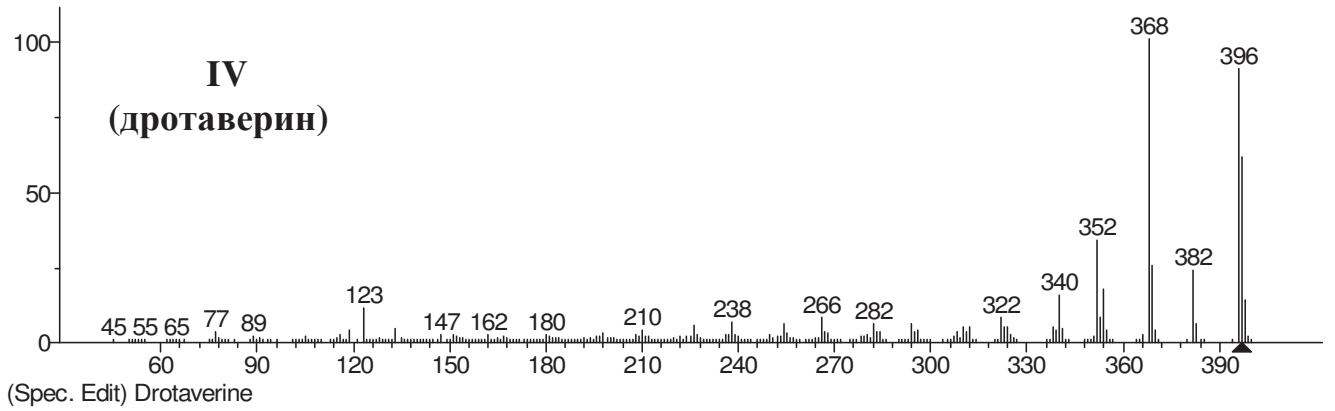


Рис. 3.11. Масс-спектры дротаверина, продуктов его деградации и метаболита.

Соединение **I** в форме этилата (3,4-диэтоксibenзойная кислота, этиловый эфир) **V** (этаверин) идентифицировали с помощью масс-спектральной библиотеки NIST11. Для определения масс-спектрометрических характеристик **IV** (дротаверина) использовали одноименный таблетированный фармацевтический препарат «Дротаверин». Характеристики **M3** и **M4** – как метаболитов этаверина, а не дротаверина - представлены в библиотеке MPW2011. Структурные характеристики остальных соединений определяли методами ГХ-МС, ВЭЖХ-ДМД и УФ-спектроскопии.

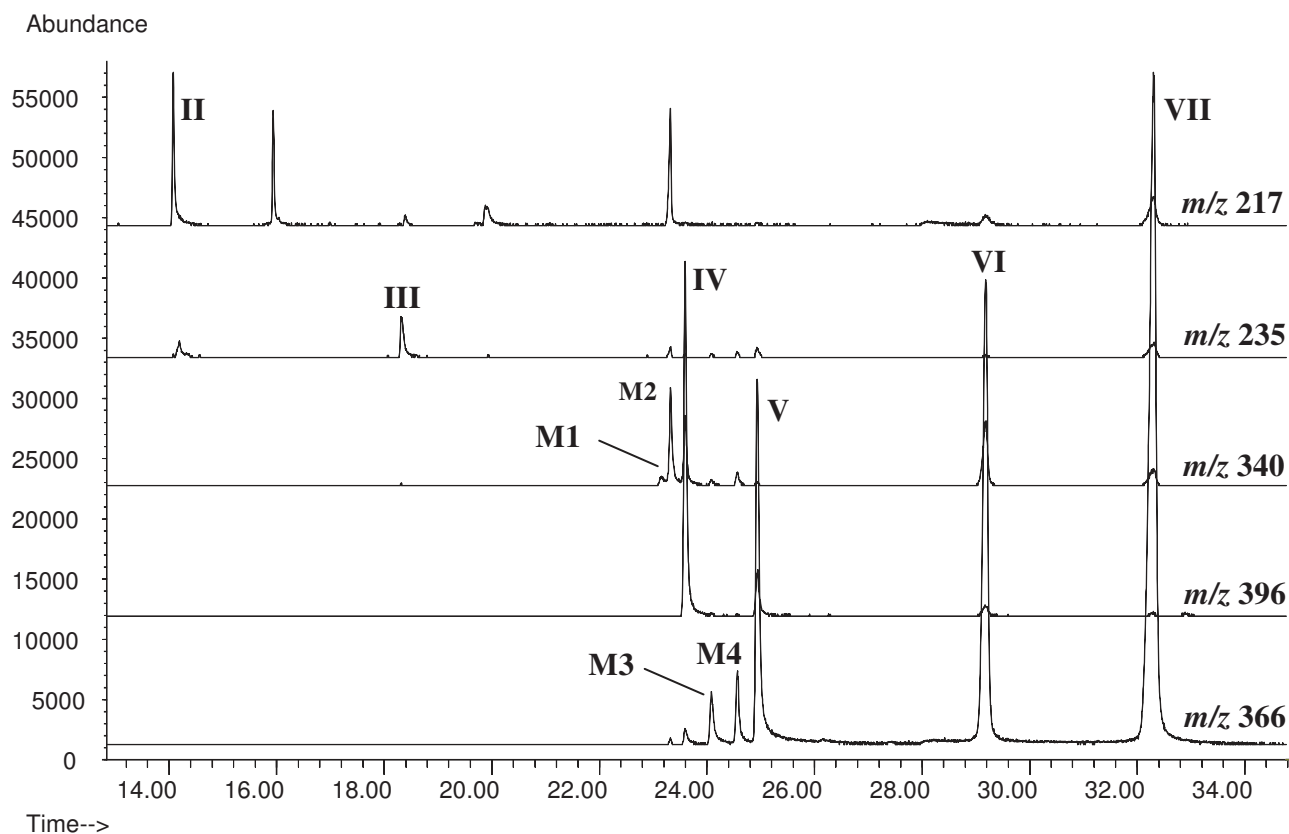


Рис. 3.12. ГХ-МС (ЭИ) хроматограмма образца посмертной мочи человека. Колонка DB-17ms, режим II.

Наиболее интенсивные пики тяжелых ионов в спектре TMS деривата **I** образуются при элиминировании метильной группы и молекул этилена; ион, m/z 165 соответствует диэтоксифенильному остатку.

Для фрагментации диэтоксихинолина **II** также характерно элиминирование молекул этилена от молекулярного иона, что сопровождается появлением в спектре интенсивного пика ион-радикала, m/z 161 и менее интенсивного, m/z 189.

Соединение **III** образует АС дериват, в спектре которого присутствует интенсивный пик иона-радикала $[M-C_2H_2O]^+$, характерного для ацетатов. Дальнейшая фрагментация **III** АС

(равно как и общая для свободного **III**) в основном, заключается в элиминировании протона и – последовательно – молекул этилена. В отличие от **II**, основные ионы спектров **III** и **III** АС четные, что свидетельствует о наличии легко элиминируемых протонов, и, следовательно – о присутствии алифатических остатков.

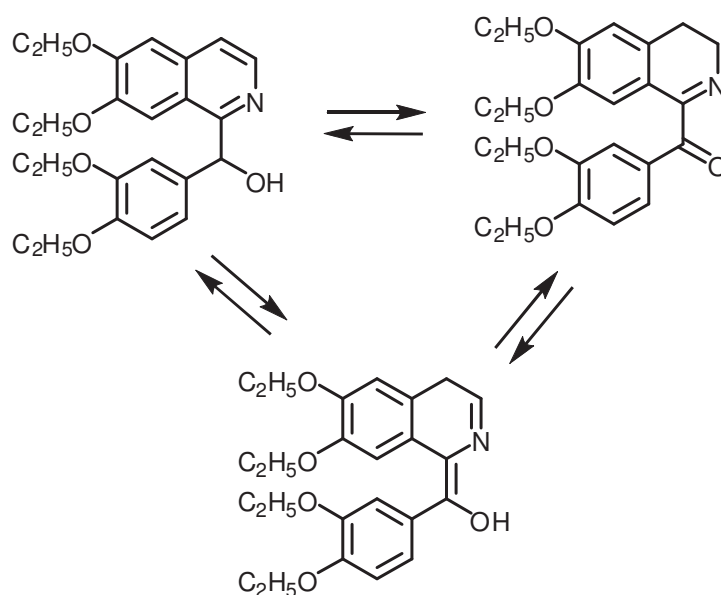
То же самое можно сказать и о спектрах самого дротаверина (**IV**) и этаверина (**V**), которые свидетельствуют в основном, о фрагментации этоксильных групп, а пики ионов, образуемые при фрагментации ароматического скелета, малоинтенсивны.

Структура соединения **VI** предполагает возможность существования трех таутомерных форм, Рисунок 3.13. Его фрагментация, сопровождающейся образованием иона диэтоксифенил(оксо)метиума (m/z 193, $C_{11}H_{13}O_3^+$) и продукта элиминирования от него молекул этана (m/z 137 и 165), подобна кетопроизводному **VII**, что позволяет предположить существование молекулярного иона **VI** в кето-форме. Соединение **VI** химически малостабильно.

Спектр кетона **VII** имеет эти же три иона, а основные пути его фрагментации заключаются в элиминировании метильной группы и молекул этилена.

Соединения **M1** и **M2** являются моно-дезэтилированными метаболитами дротаверина; соединения **M3** и **M4** (также являющиеся моно-дезэтилированными структурами) могут являться как продуктами метаболизма дротаверина (окисление и дезэтилирование), так и неметаболического окисления дезэтилированных метаболитов. На основании выполненных измерений невозможно определить положения дезэтилированных групп; можно лишь сказать, что этих положений как минимум, два. Фрагментация метаболитов подчиняется тем же закономерностям, что и для исходных соединений.

Рис. 3.13. Предполагаемые таутомеры соединения **VI**.



УФ-спектры некоторых производных дротаверина, были зарегистрированные методом ВЭЖХ. Спектр этаверина практически подобен спектру папаверина.

Дериватизация для ГХ-МС. При ацетилировании дротаверин образует ряд продуктов, из которых основным по-видимому, является ацетат енаминовой формы. Как и многие производные дротаверина, это соединение термоллабильно но, тем не менее, хорошо заметно на газожидкостных хроматограммах как пик с затянутым фронтом (индексы удерживания примерно равны 3381 для колонки EVDX-5ms и 4050 для DB-17ms). В его масс-спектре наиболее интенсивны пики ионов с m/z 368, 396 и 439. С другой стороны, при проведении силилирования, дротаверин почти полностью сохраняется в исходной форме. Следовательно, если определение исходного дротаверина методом ГХ является обязательной целью анализа, то стадию дериватизации необходимо исключить из процесса пробоподготовки. С другой стороны, при определении производных этаверина дериватизация желательна.

Количественные аспекты определения дротаверина. Вопрос о том, концентрацию какого соединения следует определять в биообразцах в случае образования им многочисленных производных, следует считать дискуссионным. Учитывая, что дротаверин – единственное соединение, стандартный образец которого является доступным в виде фармацевтического препарата, мы разработали метод его количественного определения. Концентрацию дротаверина в препарате определяли методом [132].

Жидкостно-жидкостная экстракция. Экстрагируемость дротаверина из водных растворов в хлороформ измеряли методом ВЭЖХ. Величину pH водной фазы в диапазоне 1-9 регулировали фосфатным буфером, а также водными растворами соляной кислоты и аммиака. Объемы водной и органической фаз всегда были одинаковы, время экстракции 2 мин. В сильноокислой области (pH 1-2) концентрационный коэффициент распределения дротаверина между органической и водной фазами примерно равен 9; в более основной области экстракция протекает практически нацело. Таким образом, способы очистки образцов методом реэкстракции или варьирования pH водной фазы представляется весьма сомнительными. Вследствие легкой окисляемости дротаверина при средних и высоких pH рекомендуется следующая схема: водную фазу подкислить до pH 1-2, двукратно экстрагировать равным объемом хлороформа или смесью хлороформ-бутанол (9:1 об., время экстракции не менее 2 мин). Объединенные экстракты высушить пропусканием через слой сульфата натрия, добавить 1 об.% уксусной кислоты и упарить при температуре не выше 45°C. Остаток растворить в подходящем растворителе (элюент для ВЭЖХ и метанол или этанол для ГХ-МС).

Метод ЖЖЭ пригоден для определения дротаверина в моче.

Твердофазная экстракция. Дротаверин экстрагировали по ионообменному механизму с помощью патронов AccuBond II EVIDEX (3 мл × 200 мг, Agilent Technologies), содержащих

смешанный катионообменный и обращенно-фазовый сорбент. Эффективность экстракции проверяли методом ВЭЖХ на модельных растворах дротаверина в моче и в воде.

Условия экстракции. Патрон промывали и кондиционировали порциями по 6 мл ацетонитрила и водного раствора ортофосфорной кислоты (4 об.%) и загружали 8 мл подготовленного образца (5 мл мочи, подкисленной до pH 2 с добавкой 3 мл раствора ортофосфорной кислоты). Затем промывали последовательно 3 мл раствора ортофосфорной кислоты, 5 мл ацетонитрила и сушили патрон в токе воздуха в течение нескольких секунд для удаления основного количества ацетонитрила, остающегося в набивке. Адсорбаты элюировали 4 мл смеси дихлорметан-изопропанол-водный раствор аммиака (конц.) в соотношениях 78:20:2 по объему. К элюату добавляли 0.1 мл ледяной уксусной кислоты, упаривали в токе воздуха при температуре не выше $45^{\circ}C$, сразу растворяли в подходящем растворителе и вводили в хроматограф.

Эффективность экстракции рассчитывали усреднением двух измерений, полученных при использовании двух патронов. Она составила 93.0 % (расхождение 4%) при экстракции из водных модельных растворов и 94.8 % (при расхождении 3%) при экстракции из мочи. При использовании водных модельных растворов дротаверин не нашли ни в одной порции промывных растворов, прошедших через патрон. Метод ТФЭ пригоден для определения дротаверина как в моче, так и в тканевых экстрактах.

ВЭЖХ, количественный метод (абсолютная градуировка). УФ-спектры и удерживание протонированной и молекулярной форм дротаверина различны. Учитывая этот факт, а также практические преимущества применения кислого элюента при определении смесей протонируемых азотсодержащих соединений, величина его pH должна быть значительно ниже величины pK_A дротаверина в элюенте. Эту величину оценивали методом ВЭЖХ. В элюентах состава 40 об. % ацетонитрила в фосфатном буфере при $25^{\circ}C$ pK_A дротаверина примерно равна 4.6 и, следовательно, pH водной части элюента должна быть не выше 3. Однако, при снижении pH водной части ниже 2, ухудшается разделение компонентов **IV**, **V** и **VII**.

Мы предлагаем два варианта элюирования: градиентный и изократический, ориентированные на разные потребности и техническую оснащенность. Колонка Eclipse SB-C18 (4.6 мм × 150 мм, 5 мкм), составы элюентов:

- градиентный режим (1): линейное изменение от 30 до 70 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере pH 2.2 за 15 мин;
- изократический режим (2): 45 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере pH 2.5 с добавкой 30 мМ перхлората лития (эффективность по дротаверину 8500 т.т.).

Добавка перхлората лития в элюенте для изократического режима необходима для повышения нагрузочной емкости колонки по ионогенным соединениям, что позволяет

поддерживать высокую эффективность по ним; для градиентного режима в ней нет необходимости. В Таблице 3.4 приведены относительные характеристики удерживания дротаверина и продуктов его окисления для обоих режимов, а также величины λ_{MAX} в соответствующих элюентах. В качестве относительных характеристик использованы отношения кажущихся величин факторов емкости k' компонентов к кажущейся k' папаверина для градиентного и соответствующих истинных величин для изократического режимов (мертвый объем системы оценивали нитратом натрия).

При объеме ввода 10 мкл и длине волны детектирования 202 нм градуировочный график практически линеен ($R^2 = 0.9998$) по крайней мере, в диапазоне концентраций 0.02-100 мкг/мл. Предел обнаружения 2 нг/мл. Для определения площади пика дротаверина при абсолютной градуировке $S_r, \% = 0.8$.

ГХ-МС, количественный метод (метод внутреннего стандарта). В качестве внутреннего стандарта использовали цетиллаурат. Образцы мочи обрабатывали согласно методике, указанной выше. Сухой остаток растворяли в 300 мкл этилацетата, содержащего 50 мкг/мл цетиллаурата и анализировали методом ГХ-МС (колонка EVDX-5ms, режим I). В режиме SCAN для широкого диапазона концентраций дротаверина (2-950 мкг/мл) градуировочный график хорошо описывается квадратичной зависимостью (коэффициент детерминации $R^2 = 0.9999$), предел обнаружения 470 нг/мл.

Таблица 3.4. Относительные характеристики удерживания (ВЭЖХ) и величины R_f

Соединение	Режим 1	Режим 2	λ_{max} , нм	R_f
I	1.71	1.38	206, 220, 262, 292	старт
III	1.42	0.94	222, 262, 300	0.50
IV (дротаверин)	1.90	4.60	202, 244, 304, 356	0.75
V (этаверин)	2.01	5.34	252, 314, 330 (плечо)	0.84
VII	2.19	5.85	238, 314, 365 (плечо)	0.84

В режиме SIM по ионам 368, 382 и 396 (область малых концентраций, 0.1–2 нг/мл) градуировочный график практически линеен, $R^2 = 0.9999$, предел обнаружения 9 нг/мл.

Для определения относительной площади пика дротаверина величина $S_r, \% = 2.2$.

Тонкослойная хроматография. Удобной системой для экспресс-обнаружения дротаверина и продуктов его деградации методом ТСХ на пластинках «Сорбфил» является смесь этилацетата, хлороформа и водного раствора аммиака (конц.) в соотношении 85:10:5. Величины R_f для данной системы приведены в Таблице 3.4. Указанные компоненты могут быть обнаружены при освещении пластинки ультрафиолетом (для возбуждения при $\lambda = 365$ нм зоны

соединений **III**, **IV**, **VII** выглядят как пятна тускло-желтого, тускло-синего и оранжевого цветов соответственно). Соединения **IV**, **VII** образуют оранжевые производные при обработке пластинки реактивом Драгендорфа или 10% водным раствором хлорида железа (III), причем во втором случае интенсивность окраски выше.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [133-135].

3.3. Кветиапин

Кветиапин (quetiapine, сероквель, seroquel, 2-[2-(4-добензо[b,f][1,4]тиазепин-11-ил-1-пиперазинил)этокси]-этанол) – атипичный нейролептик, сравнительно новое антипсихотическое средство, применяемое для лечения острых антипсихотических состояний, и, в частности – для лечения шизофрении [119].

Варианты метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии [136] вполне применимы для быстрого определения кветиапина в простых фармацевтических смесях и субстанциях. Тем не менее, основным способом определения кветиапина (как в фармацевтических формах, так и в биообъектах) является ВЭЖХ. Как правило, это обращенно-фазовый режим с детектированием в ультрафиолетовой области [137-139] или с применением МС [140, 141], предложено также использование монокристаллической колонки [142]. К сожалению, МС для ВЭЖХ пока остаются дорогими как в изготовлении, так и в эксплуатации.

С точки зрения хроматографиста, специализирующегося в ГХ, кветиапин является достаточно неудобным объектом для определения. Сравнительно высокая молекулярная масса (383 Да), наличие трех атомов азота и алифатической гидроксильной группы приводит к тому, что кветиапин обладает значительным удерживанием и дает широкие несимметричные пики в условиях обычного обзорного газожидкостного режима на типовых (неукороченных) скрининговых капиллярных колонках. Кроме того, есть основания предполагать возможный термолитиз производных кветиапина [50] в условиях ГЖХ.

С точки зрения химика-токсиколога кветиапин неудобен из-за его быстрого и почти полного метаболизма (содержание неметаболизированного кветиапина в моче менее 1%, [143]) и довольно широким набором метаболитов [144]. Как известно, в области ВЭЖХ до сих пор отсутствует общепринятая шкала относительного удерживания (подобно системе индексов Ковача в ГХ). Учитывая, что большинство исследователей все же сосредоточились на определении метаболитов кветиапина [139, 141-144], следует признать, что надежность обнаружения хотя бы некоторых из них базируется на основе знания удерживания и масс-спектрометрических характеристик как можно большего числа производных и метаболитов, содержание и вид которых меняется в зависимости от способа пробоподготовки.

Важным недостатком всех перечисленных аналитических работ мы считаем отсутствие единого и надежного метода, позволяющего определить как самого кветиапина, так и его метаболитов в биологических образцах. Считая несомненной пользу частных методик определения любого соединения, нельзя не признать, что современная аналитическая токсикология диктует жесткие требования к обзорным методам, позволяющим одновременно регистрировать наличие как можно большего числа соединений.

В данном исследовании мы выявили и идентифицировали ряд производных, дериватов и метаболитов кветиапина и определили характеристики их удерживания на двух широко распространенных фазах разной полярности. Предлагаемый ГХ-МС метод количественного определения исходного кветиапина в виде ацетата основан на обзорном режиме и пригоден также для определения метаболитов в биологических образцах. В качестве дополнительного варианта количественного определения разработан метод ВЭЖХ с УФ-детектированием. Подготовка проб пригодна для определения кветиапина и его метаболитов в биологических жидкостях и тканевых экстрактах.

В качестве стандартного образца кветиапина использовали таблетки «Сероквель» (АстраЗенека). Содержание кветиапина в таблетках принимали равным его декларированному содержанию. Для определения кветиапина и идентификации его метаболитов использовали следующие биоматериалы:

- образцы мочи, собранные у живых лиц, принимавших кветиапин;
- посмертные образцы мочи людей;
- образцы экстрактов тканей (печень, почки, мочевого пузыря), отбираемые при проведении судебно-медицинских экспертиз.

ГХ-МС производных и метаболитов кветиапина. Перед тем, как рассмотреть аспекты хроматографического поведения производных кветиапина, следует выделить две основные задачи, решаемые аналитиками: обнаружение этих соединений и количественное определение в биообразцах. Метод ГХ-МС, безусловно, пригоден для решения первой. Кветиапин (III) почти полностью метаболизируется с образованием по крайней мере, 20 соединений [49]. Определение части из них (продукты сульфоокисления и гидроксирования исходной структуры) данным методом может быть крайне затруднено из-за значительного удерживания, хотя возможно, и осуществимо на коротких тонкофазных колонках.

Линейные индексы и масс-спектры ряда производных и метаболитов кветиапина приведены в известной токсикологической обзорной библиотеке MPW2011 [50]. Но эти индексы измерены на неполярной фазе и обычно не могут быть применены непосредственно, поскольку наиболее распространенной фазой для определения соединений, имеющих химико-токсикологическое и наркологическое значения, в настоящее время является слабополярная

фаза. Индексы удерживания для слабополярной фазы могут быть рассчитаны приблизительно по неполярным индексам (Глава 2). Тем не менее, уточненные значения более предпочтительны. Структуры обсуждаемых соединений приведены на Рисунке 3.14, а линейные индексы удерживания – в Таблице 3.5. Все перечисленные соединения найдены в исследуемых биологических образцах, прошедших разную обработку.

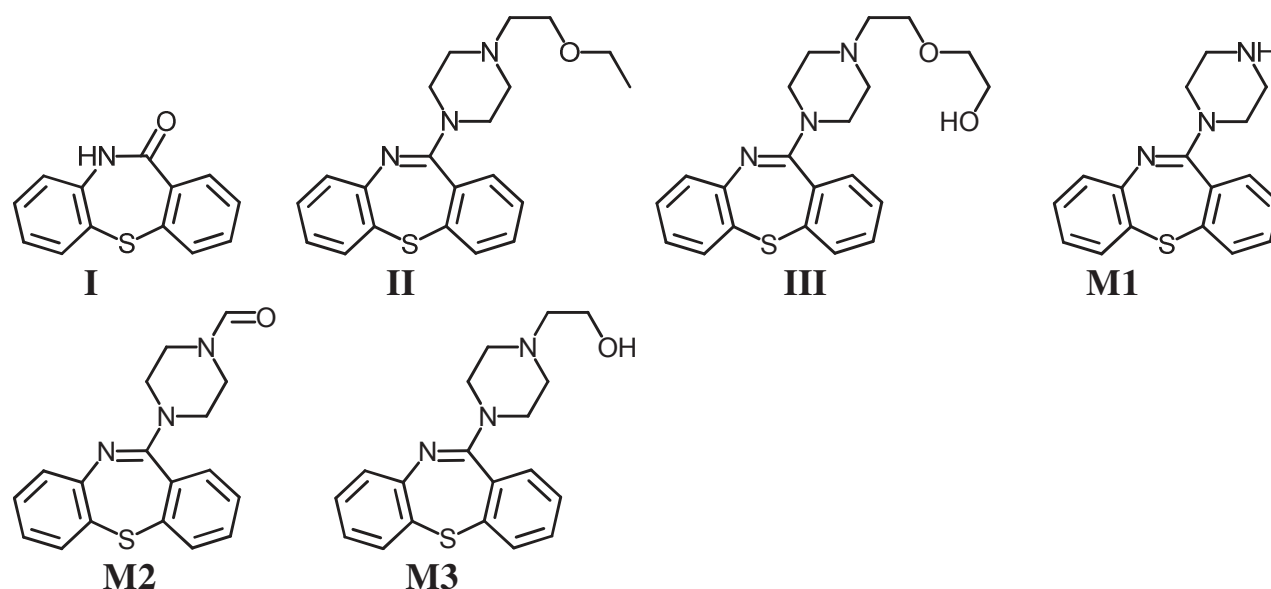


Рис. 3.14. Структуры кветиапина, его производных и метаболитов.

Таблица 3.5. Индексы удерживания производных и метаболитов кветиапина для двух фаз в двух температурных режимах.

Соединение	Брутто-формула	[M ⁺]	EVDX-5ms		DB-17ms	
			Режим I	Режим II	Режим I	Режим II
I	C ₁₃ H ₉ NOS	227	2354	2316	2911	2883
II	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ OS	367	3136	3098	3833	3775
III	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	383	3347	3310	4120	4053
III AC	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₃ S	425	3461	3427	4231	4175
III TMS	C ₂₄ H ₃₃ N ₃ O ₂ SSi	455	3389	3356	–	–
M1	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ S	295	2744	2700	3392	3324
M1 AC	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ OS	337	3172	3126	3964	3898
M2	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ OS	323	3110	3066	3925	3852
M3	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ OS	339	3070	3035	3796	3727
M3 AC	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	381	3173	3134	3879	3823
M3 TMS	C ₂₂ H ₂₉ N ₃ OSSi	411	3095	3064	–	–

Масс-спектры всех соединений (Рисунок 3.15) характеризуются достаточно интенсивными пиками молекулярных ионов, а также (кроме **I**) интенсивными пиками, соответствующими ароматической части структур с *m/z* 210 (дибензотиазепиновый остаток,

$C_{13}H_8NS^+$) и 239 (дибензотиазепинметиламиний, $C_{14}H_{11}N_2S^+$). Дибензотиазепинон (I) и этилат (II) найдены как в таблетках, так и в биообразцах. Соединения M1-M3 являются метаболитами кветиапина (III) по боковой цепи, причем происхождение M2 возможно, имеет артефактную природу. Метаболиты M2 и M3 не были приведены в библиотеке MPW2007 – версии, распространяемой во время проведения данных работ – и выявлены нами. Согласно нашим измерениям, в смеси метаболитов, наблюдаемых методом ГХ-МС, преобладает соединение M1, определяемое как в свободной форме, так и в виде АС деривата. В условиях применяемой методики образование TMS дериватов для атома азота в алифатическом остатке затруднительно.

Термолиз дибензотиазепиновых производных. Количественное определение всех обсуждаемых соединений методом ГХ-МС может быть поставлено под сомнение. Рассмотрение процессов ГХ элюирования и масс-спектров окрестностей хроматографических зон производных кветиапина привело к подтверждению довода [50] о малой термостабильности подобных соединений. На это указывает, в первую очередь, несовпадение ион-хроматограмм. На Рисунке 3.16 изображены одинаковые по длительности (2 мин) участки окрестностей хроматографических пиков кветиапина, а также его ацетильного и триметилсилильного производных (колонка EVDX-5ms). Выбраны ионы m/z 210 (соответствующий производным кветиапина) и 207 ($C_{14}H_{11}N_2^+$, продукты термолиза).

Присутствие посторонних соединений на хроматограммах смесей, содержащих производные кветиапина, отмечено в библиотеке MPW2007 [50] как «artifact desulfo». Брутто-формулы этих соединений отличаются от исходных отсутствием атома серы, а их масс-спектры указывают на наличие фенантридинового (m/z 178, $C_{13}H_8N^+$) и N-метиламинофенантридинового (m/z 207, $C_{14}H_{11}N_2^+$) остатков в их структурах и на отсутствие атома серы. Дополнительное подтверждение того, что эти соединения образуются в колонке хроматографа, а не попадают туда как элементы смесей извне можно получить, изменив селективность разделения (Рисунок 3.17, колонка DB-17ms). Подобное поведение свойственно всем рассматриваемым соединениям и в большей степени проявляется при увеличении времени удерживания – т.е. при повышении температуры или времени пребывания в этих условиях. В таком случае, можно предположить, что при высокой температуре (и в отсутствие кислорода) происходит следующая реакция, Рисунок 3.18. В пользу такого предположения говорит также характер зависимости отношения площади пика, образованного ионом, m/z 207, к сумме площадей пиков с m/z 207 и 210 (доля m/z 207) от времени пребывания в колонке. На Рисунке 3.19 приведена такая зависимость для ацетата кветиапина, температура колонки 300°C.

Близкое удерживание производных кветиапина и их десульфированных продуктов (Рисунок 3.16, слабополярная фаза EVDX-5ms) может быть объяснено противонаправленными

изменениями энтропийного и энтальпийного факторов. Дибензотиазепиновая структура неплоская (в этом можно убедиться с помощью программ молекулярного моделирования, например, HyperChem). Для наиболее выгодной конфигурации молекулы (полуэмпирический метод AM1), средний угол между плоскостями бензольных колец примерно равен 60°. Но фенантридиновая структура является плоской. Поскольку в хроматографии энтальпийный и энтропийный факторы оказывают противоположное действие на коэффициент распределения, то можно предположить, что падение энтальпии распределения, при переходе от дибензотиазепина к фенантридину, почти компенсируется уменьшением энтропии, обусловленному большей упорядоченностью фенантридиновой структуры.

К сожалению, в отсутствие возможности градуировки по фенантридиновым производным можно привести только оценочное значение степени распада. Если предположить, что сечения захвата электронов и средняя скорость движения в вакууме близки для дибензотиазепиновых и фенантридиновых производных (а массовый процент серы в молекуле кветиапина ацетата ~7.5%), то при малом отличии во временах удерживания градуировочные коэффициенты по общему ионному току МС также близки. Следовательно, различие в чувствительности в режиме SIM будет определяться только долей интенсивности пиков регистрируемых m/z в спектрах производных кветиапина и их десульфированных продуктов.

Доля пика иона с m/z 210 в спектре кветиапина ацетата (или в общем ионном токе) примерно равна 11%, а доля иона с m/z 207 в спектре его десульфированного производного – около 25%. Следовательно (учитывая сделанные предположения) при регистрации данных ионов чувствительность по ацетату кветиапина будет примерно в 2.3 раза ниже. Поскольку для колонки EVDX-5ms и температурного режима I время удерживания кветиапина ацетата около 21 мин, то длительность его пребывания при 300°C примерно равна 14 мин, а доля десульфированного продукта к моменту выхода из колонки составит около 17% (Рисунок 3.19).

Как уже отмечалось, рассмотренный процесс более заметен, для соединений **II**, **III** и дериватов **III**, **M1**, **M3**, характеризующихся наибольшим удерживанием. Можно с уверенностью предположить, что использование более тонкофазных колонок (например, HP-5ms с размерами 30 м × 250 мкм × 0.17 мкм) позволит снизить степень термоллиза.

Допустимость количественных определений может быть обусловлена воспроизводимостью самого процесса термоллиза (и времен удерживания), а также приемлемостью метрологических характеристик. В этом случае термоллиз будет проявляться только как снижение чувствительности определения.

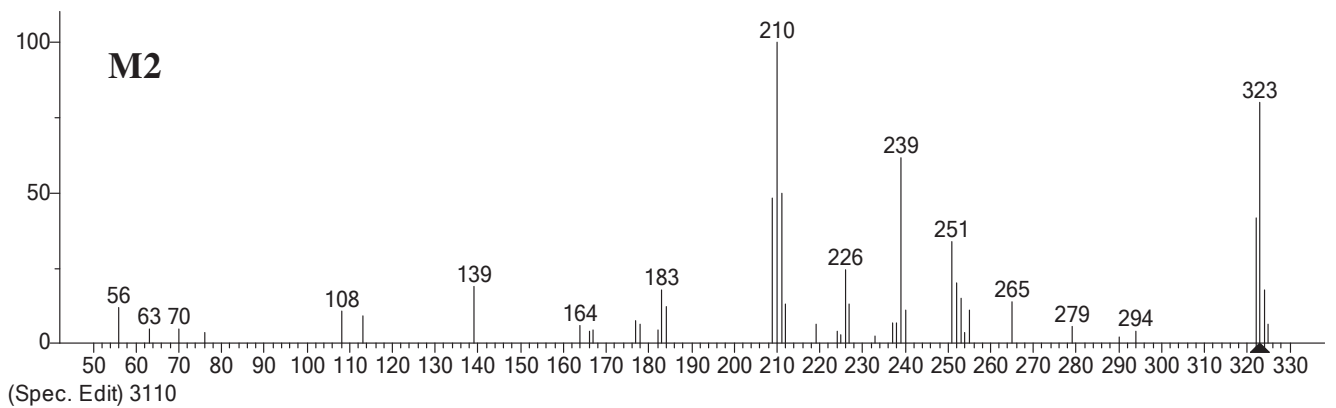
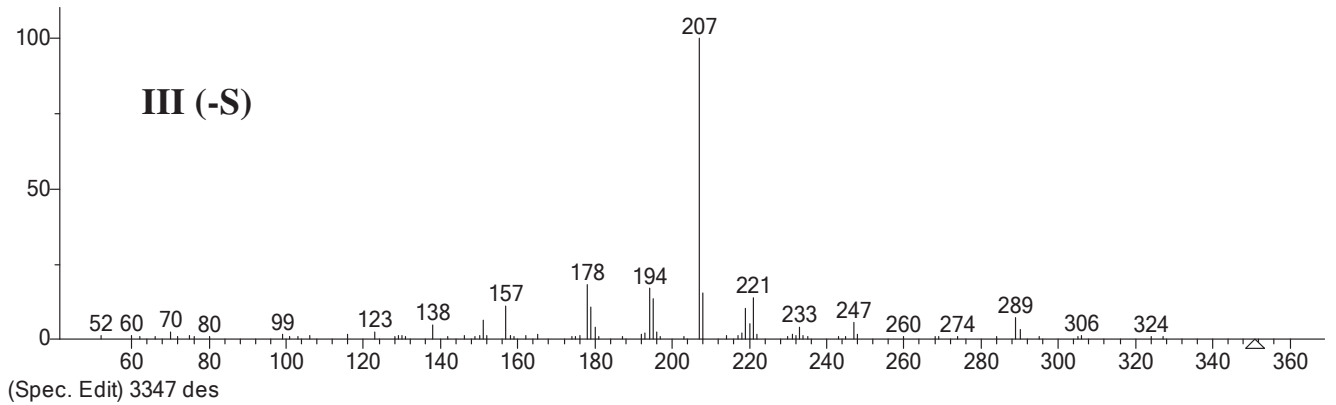
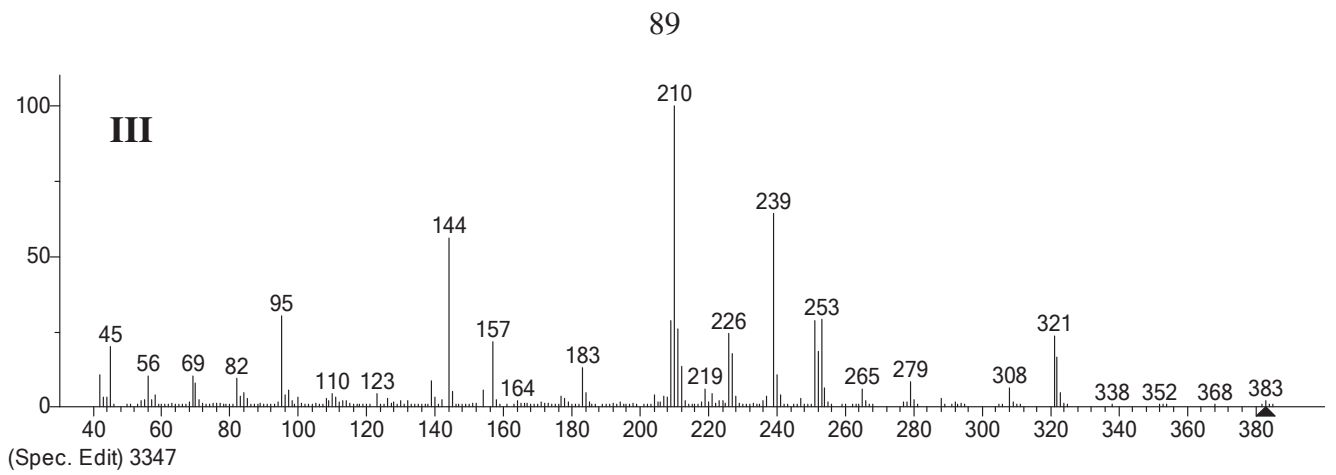


Рис. 3.21. Масс-спектры кветиапина, его производных и метаболитов (продолжение).

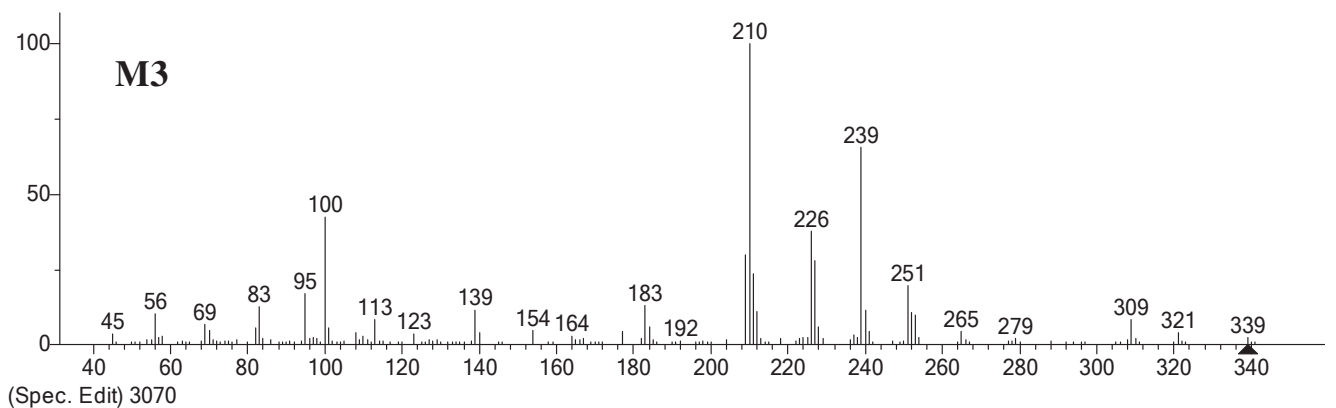


Рис. 3.15. Масс-спектры кветиапина, его производных и метаболитов.

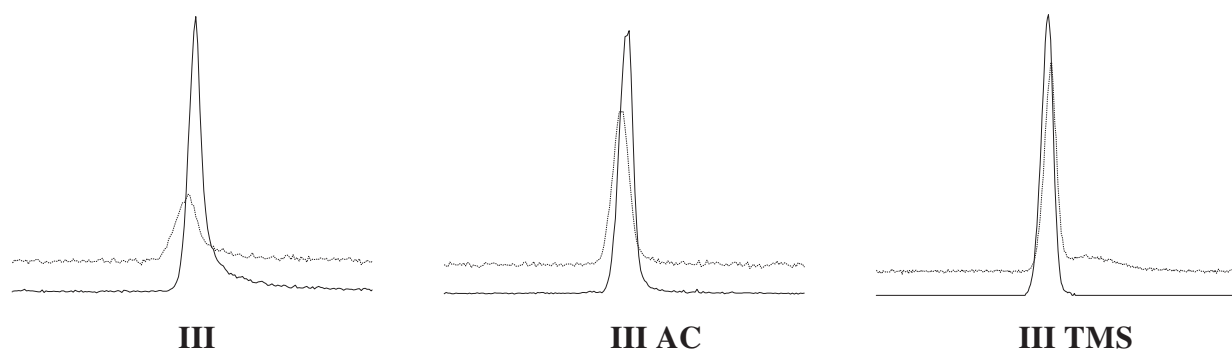


Рис. 3.16. Фрагменты (2 мин) ион-хроматограмм кветиапина и его дериватов (колонка EVDX-5ms, режим I). Ионы m/z 207 (---), 210 (—).

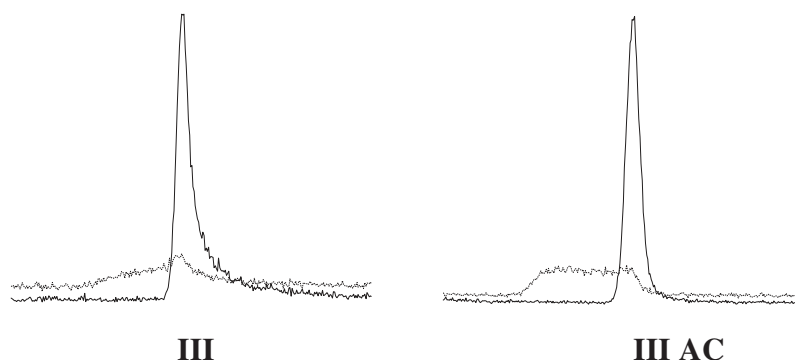


Рис. 3.17. Фрагменты (2 мин) ион-хроматограмм кветиапина и его дериватов (колонка DB-17ms, режим I). Ионы m/z 207 (---), 210 (—).

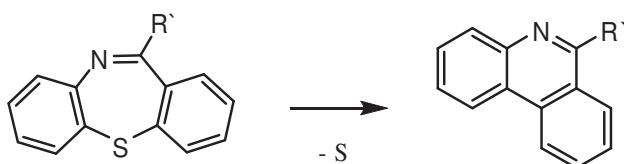
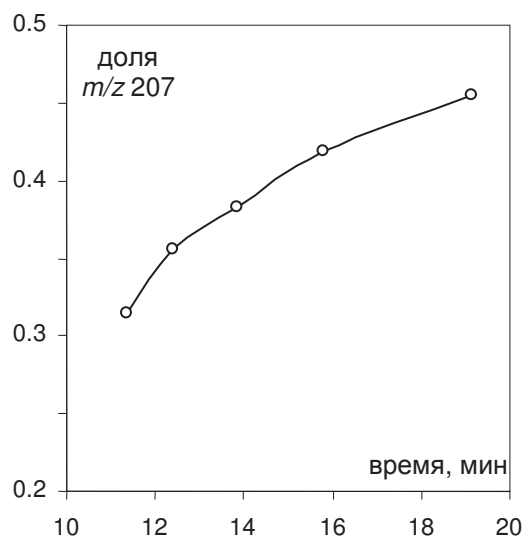


Рис. 3.18. Термолиз производных и метаболитов кветиапина.

Дериватизация и количественные измерения. Кветиапин – единственное из обсуждаемых соединений, которое является доступным и поэтому может быть использовано для разработки количественных методик. Как можно убедиться (Рисунок 3.16 и 3.17), для определения кветиапина (как и его метаболитов) желательно использовать дериватизацию. Хотя авторы работы [144] применяли триметилсилильное производное (**III TMS**), следует учесть возможную нестабильность подобных соединений. В данном случае дериватизация TMS не является безусловно предпочтительным методом (удерживание **III AC** больше, чем **III TMS**

на 72 ед. *RI*, что малосущественно в плане увеличения степени термоллиза), и поэтому для количественных измерений выбрано ацетилирование.

Рис. 3.19. Доля площади хроматографического пика, образованного ионом m/z 207 от суммы площадей хроматографических пиков с m/z 207 и 210 для кветиапина ацетата. Абсцисса представляет время пребывания смеси в колонке (300°C).



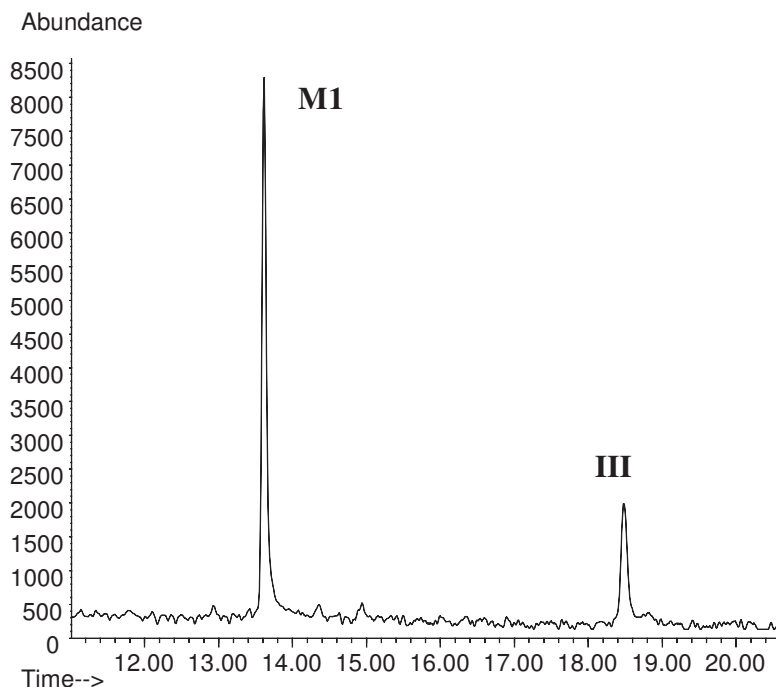
Полноту и воспроизводимость процесса ацетилирования проверяли методом ВЭЖХ. Для этого выбраны 2 раствора кветиапина с концентрациями 3.3 и 170 мкг/мл. Пять порций каждого раствора ацетилировали согласно методике, приведенной в Приложении 1 и определяли площади пиков получающегося кветиапина ацетата. Ни в одном случае не был найден непрореагировавший кветиапин. При определении площадей пиков кветиапина ацетата относительные среднеквадратичные отклонения ($S_r, \%$), включающие погрешности разведения и хроматографирования составили 2.8% и 1.6% для малой и большой концентраций соответственно.

Градуировочную зависимость по кветиапину ацетату определяли методом внутреннего стандарта (гексадецил додеканоат) по площадям пиков. При использовании режима SIM (m/z 210, 239, 251, 321) в диапазоне 5-170 мкг/мл кветиапина данная зависимость хорошо аппроксимируется полиномом второго порядка (коэффициент детерминации 0.998). Для определения отклика внутреннего стандарта измеряли площади его пиков на ион-хроматограммах (m/z 201), выделенного из общего ионного тока. При введении в группу SIM для кветиапина ацетата иона m/z 207 (продукт десульфирования кветиапина ацетата) относительные площади растут в 1.16 раз, то есть градуировочная зависимость соответствует линейному закону без свободного члена. Однако, применение подобного режима (суммарное определение кветиапина ацетата и его десульфированного продукта) не может быть рекомендовано вследствие того, что ион, m/z 207 – основной фоновый ион для фаз, подобных 5% фенилметилсилоксан.

Относительное среднеквадратичное отклонение ($S_r, \%$) определения площадей пиков кветиапина ацетата при использовании метода внутреннего стандарта составило 3.9% (для 11

измерений), предел обнаружения 0.94 мкг/мл. При увеличении объема вводимой пробы (0.2 мкл) до 1 мкл предел обнаружения может быть снижен без существенных ухудшений хроматографического поведения сильноудерживаемых компонентов. Ион-хроматограмма (m/z 210) ацетилированного образца мочи приведена на Рисунке 3.20.

Рис. 3.20. ГХ-МС (ЭИ) хроматограмма образца мочи, АС (m/z 210). Колонка EVDX-5ms, режим I.



Мы полагаем, что представленные данные свидетельствуют о допустимости количественного определения кветиапина даже при имеющемся времени удерживания (а значит – и степени термоллиза). Переход на короткие (10-15 м) и тонкофазные (~ 0.1 мкм) колонки не является необходимостью особенно при учете длительности этой процедуры для МС.

ВЭЖХ-ДМД. Для элюирования выбрали сильноокислый элюент, что обусловлено необходимостью элюирования кветиапина и его производных в виде двузарядных катионных форм (см. далее). Применение хлорной кислоты в качестве добавки, регулирующей удерживание ионогенных соединений, позволяет повысить нагрузочную способность системы для них. Аналиты элюировали двумя фазами А и В в градиентном режиме при линейном изменении состава от 20 до 50% фазы В (А - водный раствор хлорной кислоты, 20 мМ, В – ацетонитрил). Колонка Диасфер 110-С18 (250 мм × 4 мм, 6 мкм, БиоХимМак) с форколонкой (4.6 мм × 12.5 мм, заполненной тем же сорбентом), термостатировали при 25°C, скорость потока элюента 1 мл/мин. Детектирование при 206 и 285 нм, запись спектра 200-400 нм. Объем вводимой пробы 5-40 мкл.

Несмотря на очевидные преимущества метода ВЭЖХ (малая вероятность протекания реакций с участием определяемых соединений, высокая линейность градуировочных зависимостей, высокая воспроизводимость и пр.), анализ биологических образцов данным

методом обычно проигрывает ГХ-МС по причинам значительных матричных влияний и малой селективности детектирования. Определение производных кветиапина методом ВЭЖХ-ДМД имеет, по крайней мере, три существенных недостатка. Первое: УФ-спектры производных кветиапина малохарактеристичны, что повышает вероятность ложных определений, когда концентрации аналитов малы и/или образец плохо очищен. Второе: низкая (по сравнению с ГХ) фактическая эффективность колонок, что наиболее отчетливо проявляется для ионогенных соединений. Третье (характерное для детектирования полосовых спектров): затруднения в интегрировании плохо разделенных хроматографических зон; следует учесть, что из-за сложности биообразцов индивидуальных пиков на ВЭЖХ-ДМД-хроматограммах не бывает вообще. Почти полный метаболизм кветиапина, что может наблюдаться при его употреблении в терапевтических концентрациях, приводит к невозможности надежного обнаружения.

Тем не менее, метод ВЭЖХ пригоден для определения кветиапина по крайней мере, при уверенности в его присутствии в образце в значительных концентрациях, что обычно для случаев отравления. Для предложенных условий градуировочная зависимость практически линейна по крайней мере, в диапазоне 0.4-170 мкг/мл при абсолютной градуировке по площадям пиков, длина волны детектирования 206 нм). Относительное среднеквадратичное отклонение 0.7% (n=5), предел обнаружения для водных модельных растворов кветиапина составляет 20 нг/мл.

На Рисунке 3.21 приведена хроматограмма смеси кветиапина и его метаболитов в посмертной моче. Подготовка данной пробы была выполнена методом твердофазной экстракции. Пик со временем удерживания 10.61 мин. принадлежит кветиапину. Обнаружение метаболитов не проводили, хотя можно отметить, что группа пиков в области 9.74 мин и 11.18 мин имеют УФ-спектры, подобные спектру кветиапина и, по-видимому, принадлежат к его метаболитам.

Данный образец содержит существенное количество неметаболизированного кветиапина и может быть использован для количественных определений методом ВЭЖХ.

Подготовка проб. Мы рассмотрели как возможность жидкостно-жидкостной, так и твердофазной экстракций. В сильноокислых водных растворах кветиапин существует в виде двузарядного катиона (pK_{a1} и pK_{a2} равны 3.3 и 6.8 соответственно [49]). Поскольку экстрагируемость определяется также гидрофобностью формы, преобладающей в водной фазе, мы измерили концентрации кветиапина в ней после однократной экстракции хлороформом. Величину pH водной фазы регулировали фосфатным буфером, образованным 0.2 М раствором ортофосфорной кислоты с добавками гидроксида натрия. Соотношение фаз всегда было равно 1:1. Зависимость содержания кветиапина в водной фазе от ее pH после экстракции определяли методом ВЭЖХ (Рисунок 3.22).

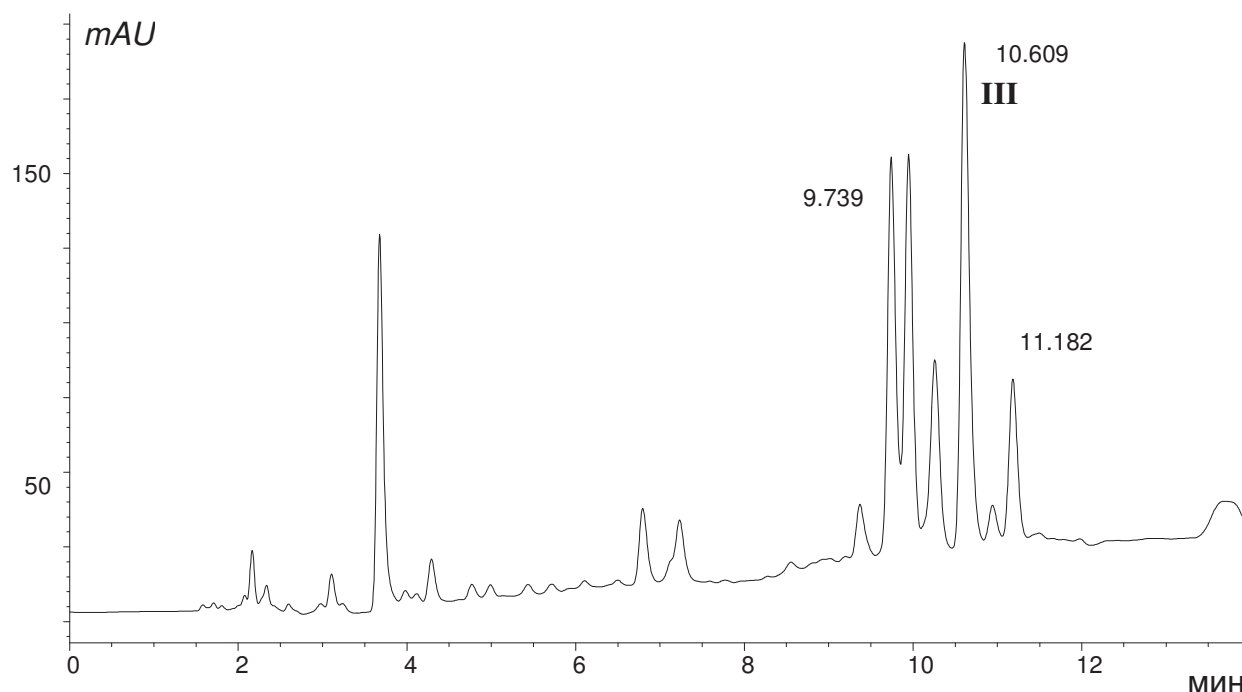


Рис. 3.21. ВЭЖХ-ДМД хроматограмма образца мочи. Условия приведены в тексте.

Полученная зависимость соответствует первой константе (pK_{a1}). Кветиапин экстрагируется в хлороформ при его существовании в водном растворе в виде однозарядной и, следовательно, нейтральной форм. Такая зависимость позволяет проводить очистку биообразцов, содержащих кветиапин способом экстракции части матрицы образца из кислого ($pH < 2$) водного раствора; при этом потери целевого соединения при однократной экстракции и соотношении фаз 1:1 составят менее 5%.

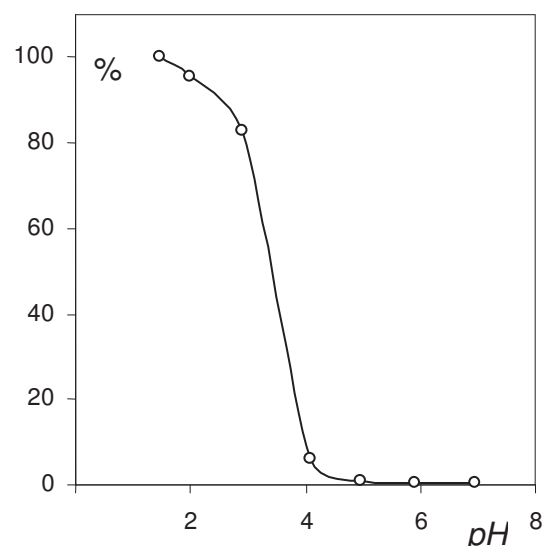
Твердофазную экстракцию выполняли на патронах AccuBond^{II} SPE EVIDEX, заполненных смешанным (обращенно-фазовым и сильным катионообменным) сорбентом. Принцип подбора условий основан на сорбировании кветиапина (и его метаболитов) по катионообменному механизму в однозарядной форме, что позволяет снизить содержание катионных примесей с более низкими величинами pK_a . В качестве модельных растворов применяли ацетатный буфер (0.1 М ацетат натрия, подстроенный до pH 4.5 ледяной уксусной кислотой) и мочу с добавками кветиапина или содержащую его метаболиты. Процедура экстракции следующая:

- промывка патрона 6 мл ацетонитрила;
- кондиционирование 6 мл ацетатного буфера;
- загрузка (8 мл ацетатного буфера с добавкой кветиапина в качестве модельного раствора или 5 мл мочи, подстроенной до $pH \sim 5$ уксусной кислотой и 3 мл ацетатного буфера);

- промывка патрона 3 мл ацетатного буфера;
- промывка 3 мл ацетонитрила;
- сушка патрона в течение 1 мин в потоке воздуха;
- элюирование 3 мл смеси дихлорметан: изопропанол: водный раствор аммиака (конц.) в объемных соотношениях 78:20:2.

Элюаты упаривали в вакууме при температуре 40°C досуха, растворяли в подходящем растворителе и вводили в хроматограф.

Рис. 3.22. Изменение концентрации кветиапина (% от исходной) в водной фазе после экстракции в хлороформ



Для трех процедур экстракции степень извлечения кветиапина из образцов мочи с добавками кветиапина составила 99.6% при относительном среднеквадратичном отклонении 2.4%. Кветиапин ни в одном случае не был обнаружен в сливах при загрузке патронов и промывочных растворах (для модельных растворов на основе ацетатного буфера). Мы не проводили количественных оценок ТФЭ метаболитов **М1** и **М3**, но эти соединения всегда присутствовали в элюатах при данном способе очистки.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [145, 146].

3.4. Димедрол

Димедрол, N,N-диметил-2-(дифенилметокси)-этиламин гидрохлорид (diphenhydramine hydrochloride, ДРМН), является важнейшим представителем группы противогистаминных препаратов (блокаторов H₁-гистаминовых рецепторов), способным оказывать местноанестезирующее и седативное действие, чем обусловлена его широкая применимость в клинической практике [119]. В случае приема значительных доз димедрол проявляет галлюциногенные свойства, что приводит к злоупотреблениям и требует контроля со стороны химико-токсикологических и наркологических служб. Характеристики данного соединения описаны в [49].

Со способами определения димедрола и его метаболитов в биожидкостях млекопитающих (и человека) методами ГХ-МС, ВЭЖХ и капиллярного электрофореза-МС можно ознакомиться в [147-153]. Несмотря на относительно высокую гидрофильность димедрола (в виде гидрохлорида хорошо растворим в воде), это соединение подвержено интенсивному метаболизму, и, следовательно, объектами обнаружения должны быть именно метаболиты. Основное количество метаболитов (до 45-50%) связано в конъюгаты с уроновыми кислотами и аминокислотами. В свободном состоянии с мочой экскретируется около 10-20% дифенгидраминуксусной кислоты, 7-13% N-оксида димедрола, 8-13% дезметилированных продуктов и 1-2% дифенилметанола (бензгидрола), а также 2-8% неизмененного димедрола. В работе [152] рассмотрено также определение дезаминированного димедрола и продукта окисления по фенильному кольцу (1-(4-гидроксифенил)-фенилметоксиуксусная кислота). Димедрол нередко используется для нелекарственных целей; например, согласно нашему опыту, его добавляют в героиновые смеси. Кроме того, нами зафиксирован случай разведения димедролом известного наркотика 3-метилфентанил.

Димедрол легко гидролизуется по эфирной связи как при обработке минеральными кислотами, так и в процессе метаболизма с образованием бензгидрола и N,N-диметил-2-аминоэтанола. В мочевых образцах и экстрактах тканей, содержащих димедрол или продукты его гидролиза почти как правило, присутствует множество соединений, ЭИ спектры которых указывают на наличие дифенилметанового фрагмента (m/z 167 или 165). Эти соединения могут являться либо метаболитами, либо артефактами пробоподготовки, и их идентификация могла бы быть полезной для последующего обнаружения в деградировавших или неверно приготовленных образцах. ХМС характеристики значительного числа метаболитов димедрола и сопутствующих соединений можно найти в библиотеках MPW2011 и NIST11, тем не менее, приводимые индексы удерживания малопригодны по причинам, указанным в Гл. 1 и 2. Цель данной части работы состояла в идентификации этих соединений на основании известных масс-спектров и адаптации удерживания методами Гл. 2. Осложнением идентификации являлось то, что ЭИ спектры большинства соединений, обнаруживаемых нами в биообъектах, сходны и не содержат молекулярных ионов. Поэтому значительное их число исключено из дальнейшего обсуждения. Ряд соединений был найден в таблетках «Димедрол» (производство АО «Белмедпрепараты», Беларусь), что облегчало идентификацию.

Обработка проб мочи. Кислые и основные экстракты образцов мочи готовили добавками соляной кислоты до pH 2 или раствора аммиака до pH 10 и последующей экстракцией этилацетатом. Экстракты упаривали досуха при температуре не выше $40^{\circ}C$ и остаток растворяли в этилацетате или в этаноле так, чтобы объем полученного раствора составлял 10% от исходного образца мочи. Гидролиз образцов мочи проводили кислотным

методом (Приложение 1). Гидролизат экстрагировали хлороформом непосредственно (кислая экстракция) или после добавки водного раствора аммиака до pH 10 (основная экстракция).

Обработка таблеток. После их измельчения и суспендирования порошка в метаноле полученный раствор фильтровали, разводили метанолом до требуемой концентрации и вводили в хроматограф. Гидролиз и/или ацетилирование проводили так же, как и для образцов мочи (после упаривания метанола).

Синтез N-оксида димедрола. Димедрола гидрохлорид, экстрагированный из таблеток, переводили в форму основания экстракцией из водного аммиачного раствора, pH 9-10, в этилацетат. Органическую фазу упаривали и растворяли в метаноле с добавкой концентрированной перекиси водорода.

ГХ-МС. В указанных образцах нами обнаружено более 50 соединений дифенилметанового ряда. Основными (хотя и не обязательными) признаками дифенилметанового производного можно считать наличие m/z 167 (дифенилметил-катион) и m/z 165 (флуоренил-катион, продукт перегруппировки). К сожалению, в ЭИ спектрах значительного числа компонентов ряда отсутствуют молекулярные ионы, а масс-спектры и индексы удерживания, встречающиеся в литературе и электронных библиотеках, разноречивы. В Таблице 3.6 приведены линейные индексы удерживания для фазы EVDX-5ms при двух условиях разделения только для наиболее надежно идентифицированных соединений для двух температурных программ. Их структуры таковы (Рисунок 3.23): **1:** $(CH_3)_2N(CH_2)_2OH$ (диметиламиноэтанол), **2:** $(CH_3)_2N(CH_2)_2OC_2H_5$, **3:** $(CH_3)_2N(CH_2)_2OC(O)CH_3$, **4:** $[(CH_3)_2N(CH_2)_2]_2O$, **5:** $(CH_3)_2N(CH_2)_2OC(O)CH=CH_2$, **6:** $R_1 = H, R_2 = H$, **7:** $R_1 = OCH_3, R_2 = H$, **8:** $R_1 = OC_2H_5, R_2 = H$, **9:** $R_1 = O(CH_2)_2N(CH_3)_2O, R_2 = H$, **10:** $R_1 = Cl, R_2 = H$, **11:** $R_3 = H$ (бензофенон, ВРН), **12:** $R_1 = OH, R_2 = H$ (бензгидрол, ВНД), **13:** $R_1 = OC(O)CH_3, R_2 = H$, **14:** $R_1 = O(CH_2)_2OH, R_2 = H$, **15:** $R_1 = OH, R_2 = OCH_3$, **16:** $R_1 = O(CH_2)_2N(CH_3)_2, R_2 = H$ (димедрол, ДРМ), **17:** $R_1 = O(CH_2)_2OH, R_2 = OH$, **18:** $R_1 = OC(O)CH_3, R_2 = OCH_3$, **19:** $R_1 = NHC(O)CH_3, R_2 = H$, **20, 21:** $R_3 = OC(O)CH_3$, **22:** $R_1, R_2 = OC(O)CH_3$, **23:** $R_1 = O(CH_2)_2N(CH_3)C(O)CH_3, R_2 = H$.

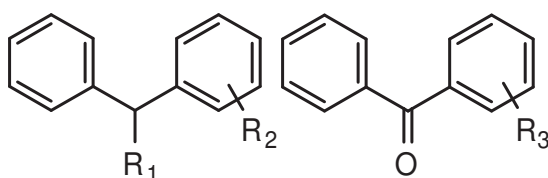


Рис. 3.23. Структуры метаболитов димедрола и сопутствующих соединений.

Как примеси к основному действующему компоненту, в таблетках димедрола обнаружили соединения **1, 3, 4, 6, 10-13**. Также в следовых количествах найдены компоненты **20, 21** (изомеры по положению ацетата в кольце). Судя по характеру удерживания и их МС

можно предположить, что это 2- и 4- бензоилфенилацетаты соответственно. Компонент **5** (диметиламиноэтанола акрилат) обнаружили в гидролизатах таблеток; его идентификация представляется надежной.

Таблица 3.6. Параметры удерживания идентифицированных соединений

№	Соединение	[M ⁺]	EVDX-5msI		Способ идент.
			Режим I	Режим II	
1 (M1)	Диметиламиноэтанол (M)	<u>89</u>	802	810	1
2	Диметиламиноэтил-этиловый эфир	<u>117</u>	835	832	1
3	Диметиламиноэтанол ацетат	<u>131</u>	914	912	1
4	<i>di</i> -Диметиламиноэтиловый эфир	160	1078	1071	1
5	Диметиламиноэтанол акрилат	<u>143</u>	1358	1356	1
6	Дифенилметан	<u>168</u>	1459	1448	1
7	BHD метилат	<u>198</u>	1588	1577	1
8	BHD этилат	<u>212</u>	1632	1621	1
9 (M2)	DPHM N-оксид (M)	241	1637	1626	3
10	BHD хлорид	<u>202</u>	1665	1649	1
11	ВРН	<u>182</u>	1672	1655	1
12 (M3)	BHD (M)	<u>184</u>	1680	1663	1
13 (M3 AC)	BHD ацетат	<u>226</u>	1737	1726	1
14 (M4)	DPHM дезамино-ОН (M)	<u>228</u>	1889	1870	2
15	BHD метокси-	<u>214</u>	1891	1879	2
16 (димедрол)	DPHM	255	1928	1913	1
17 (M5)	DPHM дезамино- <i>di</i> -ОН (M)	<u>244</u>	1990	1974	2
18	BHD метокси- ацетат	<u>256</u>	1995	1982	2
19	N-Бензгидрилацетамид	<u>225</u>	2019	2000	1
20	ВРН гидрокси, ацетат 1	<u>240</u>	2037	2020	2
21	ВРН гидрокси, ацетат 2	<u>240</u>	2082	2064	2
22	BHD гидрокси, диацетат	<u>284</u>	2136	2125	2
23 (M6)	DPHM дезметил ацетат (M)	283	2368	2344	1

Примечание к таблице. Подчеркнуты молекулярные массы тех соединений, для которых характерны молекулярные ионы. Способ идентификации: 1 – библиотека NIST11, 2 – литературные данные, 3 – синтез

Любопытно отметить, что соединения **1, 6, 10-12, 17** найдены как в таблетках, так и в образцах мочи, - следовательно, **6, 10, 17** могут быть использованы в качестве дополнительных признаков, подтверждающих наличие основных компонентов смеси в исходном образце. В гидролизованных образцах мочи основными компонентами являются диметиламиноэтанол (**1**) и бензгидрол (**12**).

Продукты алкилирования диметиламиноэтанола (**2**) и бензгидрола (**7, 8**) могут появляться в образцах при использовании метанола и этанола в качестве растворителей. Соединения **9, 15, 16** (димедрол), **23** найдены в основных экстрактах образцов мочи; соединение **18** – в этих же экстрактах после ацетилирования. Соединения **14, 17** обнаружены в

кислых экстрактах, компонент **22** – также после ацетилирования. В основных экстрактах гидролизованных образцов мочи найден компонент **1**, и после ацетилирования – соединение **19**. Примерная хроматограмма образца мочи приведена на Рис. 3.30.

Возможно предположить структуры еще трех наблюдаемых компонентов (Рисунок 3.25). Соединение **24** (*RI* 1877, 1861 для режимов I и II, соответственно) характеризуется предполагаемым молекулярным ионом с m/z 223, (что может отвечать брутто-формуле $C_{15}H_{13}NO$ и структуре $R_1 = OCH_2CN$, $R_2 = H$) и может являться продуктом дегидратации амида дифенгидраминуксусной кислоты ($R_1 = OCH_2C(O)NH_2$, $R_2 = H$), поскольку обнаружено в основных ацетилированных экстрактах образцов мочи. Соединение **25** (*RI* 2219, 2212) образуется при ацетилировании смесей, содержащих N-оксид димедрола (**9**), имеет предполагаемый молекулярный ион m/z 225, что соответствует вероятной брутто-формуле $C_{15}H_{15}NO$ и структуре $R_1 = OCH_2CHNH$, $R_2 = H$) [140-142].

Карбаматы. Соединение **26** нередко присутствует в основных экстрактах образцов мочи, причем площадь его пика (ТIC) может превышать как соответствующие площади самого димедрола, так и его основного метаболита (**M3**). Пик его предполагаемого молекулярного иона малоинтенсивен (m/z 313, около 0.8% от наиболее интенсивного пика спектра), но подтвержден измерениями при малых энергиях ионизации (12-15 эВ). Для рассматриваемой группы соединений, данное соединение характеризуется значительным удерживанием (*RI* 2327, 2313), не изменяется при ацетилировании и не проявляет выраженных ионогенных свойств в условиях ВЭЖХ.

Соединение **26** предположительно идентифицировано как этилкарбамат (брутто-формула $C_{19}H_{23}NO_3$). Его появление в образцах, приготовленных в этаноле для введения в хроматограф, скорее всего, обусловлено экстракцией соответствующей карбаминовой кислоты из мочи в виде соли с последующей этерификацией этанолом. Следует отметить, что возможные метаболические пути, заключающиеся в образовании карбаминовых кислот (или процессы, приводящие к их образованию как артефактов) трудно отмечать при проведении ЖХ анализа, поскольку при этом в основном, используются кислые элюенты, в которых карбаминовые кислоты неустойчивы.

Подобные соединения нами обнаружены и для иных лекарственных средств, структура которых содержит атом азота, связанный с алифатическим заместителем (прежде всего – с метильной группой). Это производные и метаболиты метамфетамина, анальгина, пропиофеназона, галоперидола, гидроксизина, метронидазола, доксиламина. Из перечисленных соединений только одно (производное анальгина) включено в библиотеки NIST; никаких сведений об остальных перечисленных соединениях (равно как и соответствующих процессах, приводящих к их образованию) в известных нам публикациях не встречалось.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [154-156].

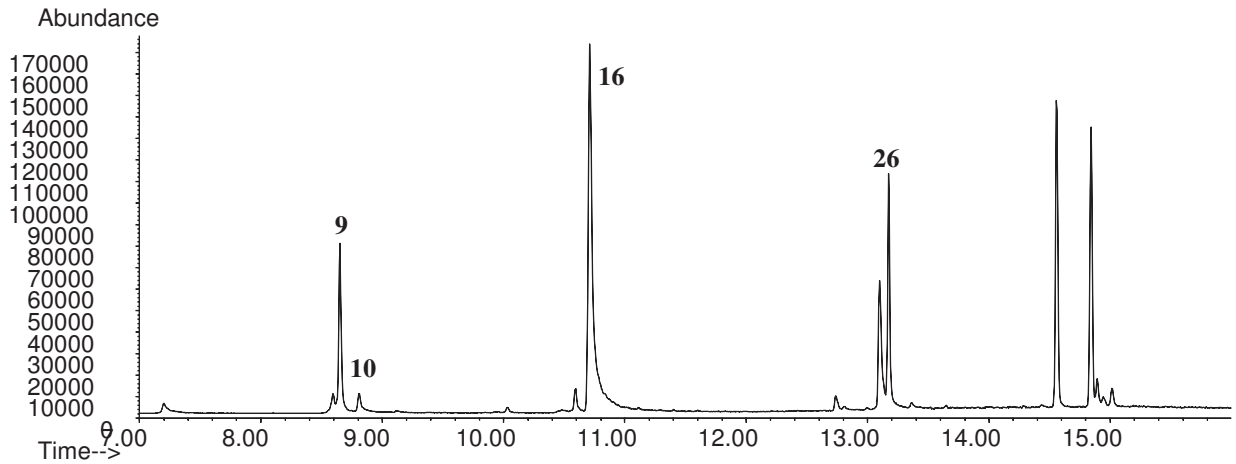


Рис. 3.24. ГХ-МС (ЭИ) хроматограмма образца мочи (EIS, m/z 167), основная экстракция. Колонка EVDX-5ms, режим I.

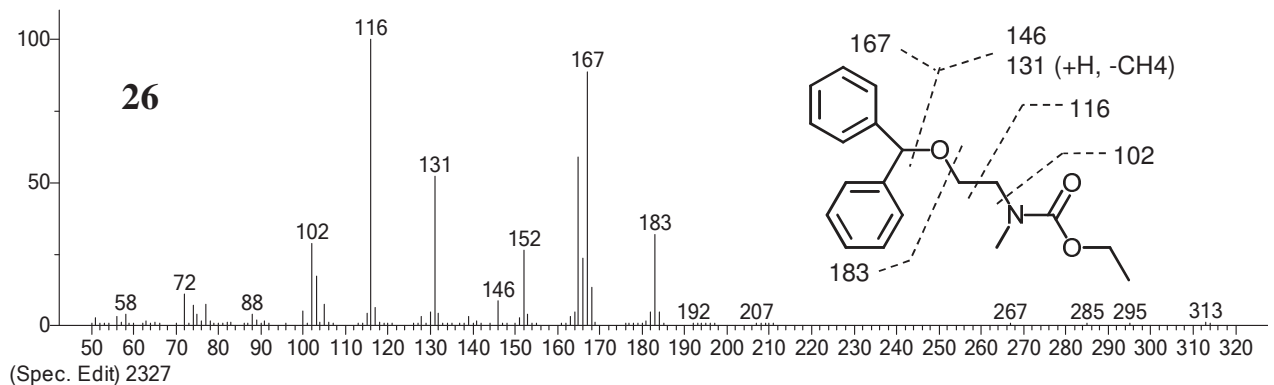
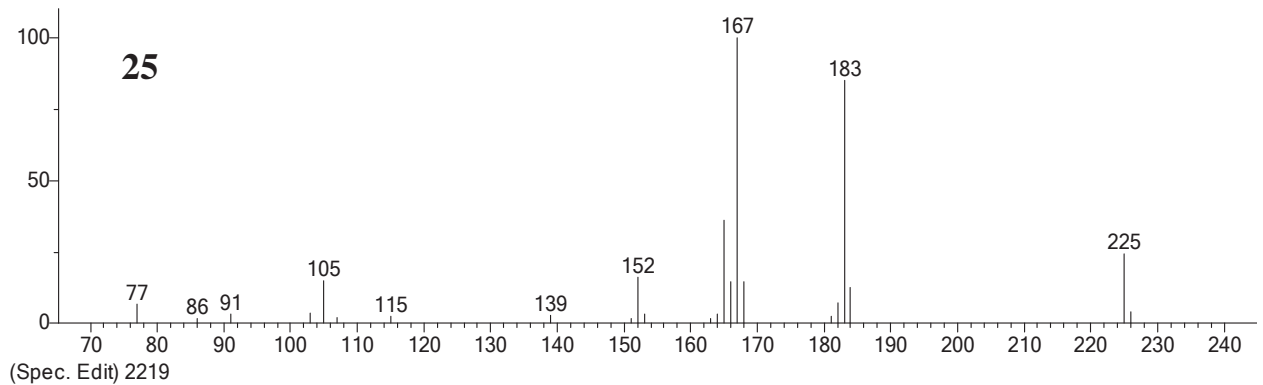
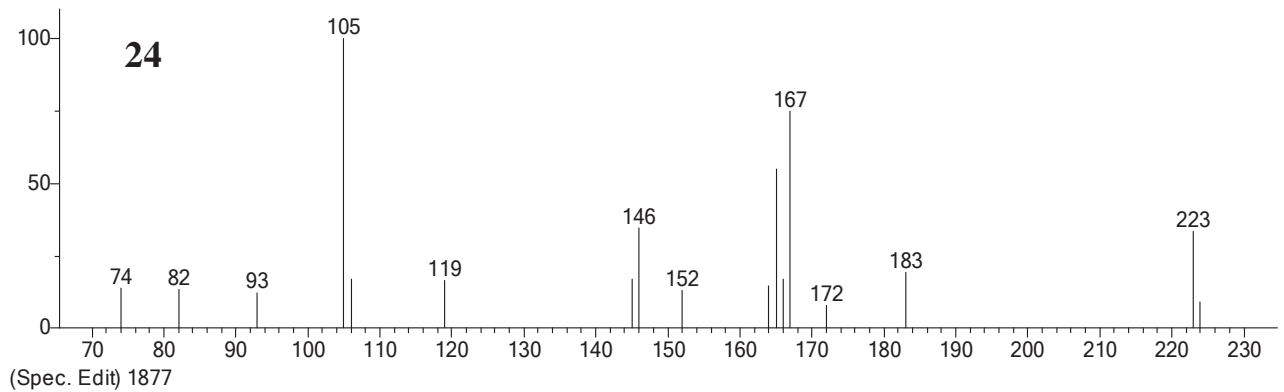


Рис. 3.25. ГХ-МС (ЭИ) спектры некоторых производных димедрола.

3.5. Краткие методические замечания по главе

В Таблице 3.7 приведены общие аналитические условия для обнаружения метаболитов и производных соединений, рассмотренных в данной Главе. Для метода ГХ-МС предлагаются режимы I и II при использовании средне- и слабополярных фаз. Частные условия проведения каждой стадии анализа указаны в соответствующих подразделах и Приложении 1. Пробоподготовка включает ЖЖЭ основных растворов или ТФЭ. В Таблице 3.8 перечислены некоторые метрологические характеристики определения исходных соединений.

Таблица 3.7. Аналитические условия для обнаружения метаболитов и производных соединений, рассмотренных в Главе 3.

Исходное соединение	Метод деконъюгирования	Дериватизация		Обнаруживаемые соединения	
		Предпочтительная	Возможная	Основные	Дополнительные
Банкол	-	АС	-	M1.1	M1.5
Дротаверин	-	-	-	VII, M1, M2	IV
Кветиапин	кислотный	АС	TMS	M1, M3	III

Таблица 3.8. Некоторые метрологические характеристики определения исходных соединений.

Исходное соединение	Метод	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	R^2	Предел обнаружения, нг/мл	S_r , %
Банкол	ВЭЖХ-ДМД	0.3-300	0.9999	50	-
Нереистоксин	ГХ-МС, ТИС	-	-	100	-
Дротаверин	ВЭЖХ-ДМД	0.02-100	0.9999	20	0.8
Дротаверин	ГХ-МС, ТИС	2-950	0.9999	470	-
Кветиапин	ГХ-МС, SIM	5-170	0.998	940	3.9
Кветиапин	ВЭЖХ-ДМД	0.4-170	0.9999	20	0.7

Заключение.

Инсектицид нереистоксин, действующее вещество препарата бенсультап, интенсивно метаболизируется в организме человека. Основными его метаболитами, найденными в моче, являются продукты раскрывания дитиоланового цикла сопровождающегося S-метилированием, N-дезметилированием и S-окислением. Неизмененный нереистоксин присутствует в моче лишь в следовых концентрациях. Метаболиты нереистоксина, могут быть обнаружены в моче методом ГХ-МС после пробоподготовки, включающей стадию жидкостно-жидкостной или твердофазной экстракции. Наиболее удобен для определения S,S'-диметилированный моносulfоксидированный метаболит. Продукты окисления нереистоксина были обнаружены впоследствии в биообразцах при проведении экспертиз.

Определение дротаверина методом ГХ-МС характеризуется высокой воспроизводимостью и низкими пределами обнаружения. Обнаружение продуктов окислительной деградации и метаболитов дротаверина актуально при анализе тканевых образцов, подвергшихся гнилоственному разложению или неверно обработанных. Основным продуктом деградации найдено кетопроизводное этаверина. Основными источниками погрешности определения дротаверина следует считать процессы окислительной деградации, протекающие как в биообъектах, так и при неправильной пробоподготовке. Для определения дротаверина и продуктов его окисления методом ВЭЖХ-ДМД пригодны элюенты с *pH* 2.2-2.5. Эта величина должна уточняться при использовании определенной колонки. Наилучшим методом выделения дротаверина из жидких биообразцов следует признать твердофазную экстракцию при учете необходимости подкисления элюата.

Несмотря на заметное образование продуктов термоллиза производных и метаболитов кветиапина в условиях ГХ, нет никакой необходимости проводить количественные определения посредством частных методик (используя короткие и тонкофазные колонки). Применение ГХ обзорных режимов, предназначенных для наблюдения широкого спектра соединений, имеющих химико-токсикологическое и наркологическое значения, позволяет получить приемлемые метрологические характеристики для определения кветиапина и его метаболитов. Метод ВЭЖХ-ДМД может быть использован в качестве вспомогательного метода при необходимости определения самого кветиапина и при условии значительного его содержания в исследуемых образцах. Пробоподготовка включала стадию жидкостно-жидкостной или твердофазной экстракции при *pH* водной фазы, равной 5.

Ряд соединений, являющихся спутниками димедрола в таблетированном препарате, были обнаружены также и в моче. Они могут быть использованы для подтверждения при обнаружении основных компонентов. Определены характеристики удерживания метаболитов димедрола и ряда сопутствующих соединений (26 компонентов) в условиях ГХ-МС. Приведены примеры их обнаружения в моче. Выявлены три не описанных ранее соединения, причем одно из которых предположительно идентифицировано как этилкарбамат нор-дифенилгидрамина.

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

4.1. История появления синтетических каннабимиметиков на рынке психоактивных средств и общие подходы к определению нативных соединений

Изучение природы действия Δ^9 -тетрагидроканнабинола (ТГК) – психоактивного компонента конопли (*Cannabis sativa*) – на психофизиологическое состояние млекопитающих привело в 1988 г. к обнаружению нового рецептора, в основном, локализованного в центральной нервной системе [157]. В дальнейшем было показано, что обнаруженный рецептор (обозначенный как CB1, CBR1) относится к семейству G-протеин связывающих рецепторов и участвует в формировании механизмов боли и эмоционального состояния. Кроме того, для CB1 были найдены эндогенные лиганды – соединения, представляющие собой производные жирных (в первую очередь, арахидоновой) кислот, обратимо связывающихся с рецептором и изменяющие его состояние, что посредством эффекторной системы позволяет формировать психоактивный отклик [158, 159]. Несколько позже в мембранах иммунокомпетентных и эритропоэтических клеток был обнаружен второй (периферический) каннабиноидный рецептор CB2 (CB2R). ТГК был первым экзогенным соединением, являющимся аффинным лигандом для обоих рецепторов и охарактеризованным как частичный агонист рецептора CB1 [160-163]. Главной (но не исчерпывающей) отличительной характеристикой каннабимиметиков является показатель степени их связывания с рецептором – константа аффинности (K_i) – величина, уменьшающаяся при увеличении степени связывания лиганда и рецептора (для ТГК $K_i = 41$ нМ [164]).

Исследования рецепторно-эффекторных каннабиноидных систем и поиск безопасных фармакологических заменителей ТГК позволили сделать важный вывод о сравнительно невысокой селективности каннабиноидных рецепторов и, следовательно, о структурном многообразии их экзогенных лигандов – каннабимиметиков. Значительное количество аффинных каннабимиметиков (большинство которых обозначены кодами «JWH-XXX») было синтезировано группой J.W.Huffman (Clemson University, USA) [163]. Синтез и свойства другой, также многочисленной серии (префикс кода «AM») были выполнены группой A. Makriyannis [165-185].

Последующее появление некоторых из этих соединений в свободной продаже и быстрый рост их популярности можно объяснить, по крайней мере, пятью факторами:

- сравнительная простота синтеза;
- обилие синтетических прописей, находящихся в свободном (патенты) или частично ограниченном (публикации в научной литературе) доступе;

- неготовность служб химико-аналитического мониторинга товаров к детектированию и идентификации нативных каннабимиметиков в продуктах, продаваемых на полулегальных рынках;

- неготовность аналитических лабораторий, работающих в области химико-токсикологического и наркологического анализа для обнаружения биомаркеров синтетических каннабимиметиков в моче и сыворотке крови;

- психологически приемлемый способ употребления, заключающийся в ингаляции (а не внутривенном введении) каннабимиметика;

- рекламированием и продажами продуктов, содержащих синтетические каннабимиметики с помощью Интернета или мобильной связи.

В настоящее время уже невозможно определить место и время начала продаж синтетических каннабимиметиков, хотя существует утверждение о том, что растительные смеси, предназначенные для курения и формирующие каннабиноидоподобные психогенные эффекты, продаются через Интернет с 2004 г под общим названием «Spice» («спайс») [186]. В конце первой декады нового века возросший объем продаж и связанный с ним общественный резонанс привлекли внимание исследователей к новым одурманивающим продуктам, и в конце 2008 г компании THC Pharma (Германия) и AGES PharmMed (Австрия) почти одновременно и независимо друг от друга сообщили об идентификации нафтоиндольного производного JWH-018 в качестве компонента курительных смесей [187]. Сообщение было подтверждено исследователями, обнаружившими JWH-018 в продуктах, продаваемых в Западной Европе [188, 189], Японии [190, 191] и США [192].

В отношении оборота синтетических каннабимиметиков многими государствами (и, в том числе, РФ [193]) был предпринят ряд законодательных мер ограничительного характера [187]. Однако важнейшей особенностью рынка синтетических каннабимиметиков следует считать его чрезвычайную изменчивость. Вследствие факторов, описанных выше, производители и продавцы лишены необходимости конфликтовать с законом, и поэтому очередной запрет на оборот этих соединений приводит лишь к быстрому появлению новых каннабимиметиков, выпуск которых отработан заранее [187, 194, 195]. Согласно особенностям законодательных ограничений ряда стран (в т.ч. и России), в списки наркотических средств включаются не только точно определенные соединения, но и их производные («generic law»). Однако, вариации структур, подпадающих под понятие «производное» не определены в законодательном порядке в РФ и рассматриваются лишь в виде ведомственных рекомендаций.

В результате этих процессов в наиболее неблагоприятном положении оказались именно аналитические службы, вынужденные после каждого очередного запрета идентифицировать новые каннабимиметики и искать их биомаркеры. JWH-018 вместе с двумя соединениями

(JWH-073 и CP47,497 C8), идентифицированными непосредственно после него можно назвать каннабимиметиками «первой волны» (Рисунок 4.1).

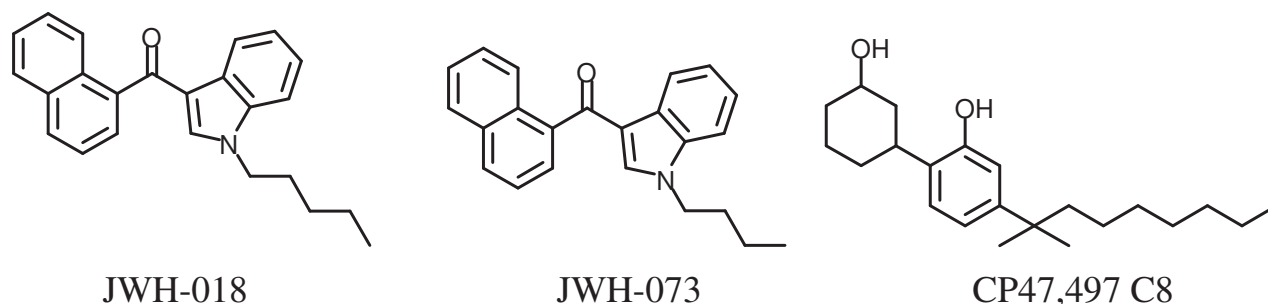


Рис. 4.1. Структуры каннабимиметиков «первой волны».

Следует учесть, что – несмотря на успехи в области поиска биологически активных структур (structure-Activity relationship, SAR) - понятие «синтетические каннабимиметики» основано на фармакологических, а не структурных принципах. Структуры подавляющего большинства каннабимиметиков отличаются как в пределах этой группы, так и в сравнении с ТКК и эндоканнабиноидами. Консультативным советом по неправильному использованию наркотиков (Advisory Council on the Misuse of Drugs, ACMD) предложена общая классификация продаваемых каннабимиметиков, основанная на структурном принципе и включающая семь групп [196]:

- нафтоиндолы;
- нафтилметииндолы;
- нафтоилпирролы;
- нафтилметииндены;
- фенилацетииндолы;
- циклогексилфенолы;
- дибензопираны (классические каннабиноиды).

Данный список содержал только известные ранее соединения, сведения о синтезе которых были опубликованы официальными научными группами. Тем не менее, вскоре стали появляться новые соединения неустановленного авторства (RCS-4, AB-001, АКВ-48, РВ-22 и пр.), не относимые ни к одной из семи групп. Это приводит к необходимости расширения данной классификации. Для соединений, обсуждаемых в данной работе, предлагаются следующие дополнительные классы:

- бензоиндолы;
- алканоиндолы;
- индазол-карбоксамиды.

Начиная с 2008 г. – времени первого документально подтвержденного обнаружения синтетических каннабимиметиков на рынке психотропных средств – эти соединения лидируют по количеству структурных новинок, зарегистрированных Системой раннего оповещения (Early Warning System, EWS) Евросоюза [195].

Исследования в области медико-биологических аспектов воздействия синтетических каннабимиметиков на организм человека (и млекопитающих вообще) находятся в настоящее время в стадии накопления и систематизации. Обобщенная симптоматика, сопровождающая употребление каннабимиметиков, включает тахикардию, гипертензию, возбуждение, беспокойство (непосредственно после приема), судороги, возможность возникновения галлюцинаций, острый психоз, гипокалиемию, сонливость и слабость (через некоторое время после приема (напр. [197-200]) Отмечены случаи возникновения синдрома зависимости [197]. Согласно сообщениям, приведенным на специализированных форумах Интернета, а также нашим наблюдениям, каннабимиметики обладают значительным потенциалом для развития толерантности.

В последнее время в научной периодической литературе непрерывно публикуются сообщения о детектировании и идентификации известных ранее, а также новых синтетических каннабимиметиков в продаваемых продуктах [201-237]. Общая схема процедуры заключается в следующем.

- Экстракция исходной формы, которая может представлять собой кристаллический порошок (субстанция), растительный материал или вязкие смолообразные массы. В качестве экстрагента целесообразно использовать метанол или этанол [204].

- Выделение интересующих соединений из экстракта с помощью колоночной или препаративной тонкослойной хроматографии на подходящем сорбенте (обычно силикагель).

- Характеризация очищенных соединений физико-химическими методами (ЯМР-, ИК- и масс-спектрометрия, УФ-спектроскопия, ХМС, в т.ч. с применением масс-спектрометрии высокого разрешения, МСВР). Для ГХ-разделения используются слабополярные фазы, для ЖХ – обращенные. ЖХ элюирование выполняют водно-ацетонитрильными (или водно-метанольными) смесями при значительном содержании органического растворителя вследствие малополярного характера структур большинства каннабимиметиков. Буферы (ацетатный или формиатный) или кислоты (уксусная или муравьиная), добавляемые в элюент, предназначены в основном, для улучшения ионизации при последующем МС-обнаружении.

- Определение концентрации каннабимиметиков в исходных формах, пользуясь очищенными соединениями в качестве стандартов.

Для соединений, охарактеризованных ранее, разработаны методики качественного [238-247] и/или количественного определения [248-259]. В большинстве случаев, они заключаются в

процедуре экстракции аналитов и последующем анализе экстрактов методами ЖХ-МС или ЖХ-МС/МС. Выбор жидкостного варианта хроматографии обусловлен двумя факторами: значительным молекулярным весом синтетических каннабимиметиков (и, следовательно, значительным ГХ удерживанием) и очевидным вниманием исследователей и редакций научных журналов к использованию более новых (хотя и значительно более дорогих) методов анализа. В качестве внешних стандартов используют соединения, синтезируемые и продаваемые некоторыми фирмами (в основном, Cayman Chemicals, www.caymanchem.com). При регистрации МСВР возможен анализ экстрактов методом MALDI-TOF (матричная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным анализатором), что минимизирует процесс пробоподготовки [260]. Описан метод непосредственного масс-спектрометрического анализа исходных форм без экстракции (метод прямого анализа в реальном времени, DART) [261-264]. Содержание каннабимиметиков в продаваемых формах меняется в широких пределах, от долей единицы до сотен мг/г. Верхний предел характерен для порошков, обычно представляющих собой кристаллические субстанции от белого до оранжевого или светло-бурого оттенков, умеренно растворимые в ряде органических растворителей (низшие спирты, ацетон, этилацетат, хлороформ), почти нерастворимые в воде и, следовательно, не содержащие (или содержащие малые количества) биополимерных материалов. Подобные субстанции в основном, предназначены для нанесения на курительную основу. Готовые формы содержат от единиц до десятков мг/г, каннабимиметика, а нижний предел заставляет предполагать случайные загрязнения. Примерная однократная дозировка курительной смеси на растительной основе составляет 70-150 мг, что (также примерно) соответствует единицам миллиграмм каннабимиметика. По крайне приблизительным оценкам, доля, абсорбируемая легкими, составляет около 20-30% от количества каннабимиметика, находящегося в выкуренном материале.

Методы определения нативных каннабимиметиков в биологических образцах отличаются усложненной пробоподготовкой (вследствие наличия богатых матриц) и способами детектирования, позволяющими достигать высокой чувствительности и малых пределов обнаружения. Инструментальная часть всех опубликованных методов является вариантами ГХ-МС или ЖХ-МС/МС (обращенно-фазовый вариант) при детектировании в режиме MRM (multiple reaction monitoring). В качестве внутренних стандартов используются дейтерированные аналоги определяемых соединений, что позволяет определять важные характеристики процесса пробоподготовки (матричные эффекты, выход и эффективность процесса) при валидации метода.

В свободном состоянии синтетические каннабимиметики встречаются в крови, слюне и волосах. При подготовке проб для определения каннабимиметиков в сыворотке крови [265-271]

и в трупной крови [272] применяют ЖЖЭ, пределы обнаружения составляют десятки и сотни пг/мл. Концентрации каннабимиметиков в сыворотке крови достигали десятков нг/мл (199 нг/мл для посмертного случая [272]). Показано, что концентрация каннабимиметика (JWH-018) в крови курильщика быстро (единицы минут) достигает максимума и сравнительно быстро снижается (до <10% от максимальной за 3 часа) [266]. Быстрое выведение каннабимиметика в его нативной форме из крови косвенно свидетельствует о быстром метаболизме; это наблюдение позволяет сделать вывод о целесообразности анализа крови (сыворотки) только при наличии симптомов острой интоксикации у курильщика. Дополнительным ограничением использования крови в качестве аналитической пробы является инвазивный – и, следовательно, нежелательный характер отбора.

Анализ слюны курильщиков [273-276] является неинвазивным, хотя его результаты – ввиду очевидных причин – могут оказаться малообъективны. Подготовка проб может включать стадию упаривания образца после осаждения белков охлажденным ацетонитрилом, или ТФЭ, или заключаться в разведении образца элюентом. В последнем случае были достигнуты наименьшие пределы обнаружения (до 20 пг/мл). Концентрация каннабимиметиков в образцах слюны составляла от единиц до сотен нг/мл, определяемый аналит наблюдали до нескольких часов и до нескольких суток при концентрациях, больших предела количественного определения (>0.2 нг/мл) и больших предела обнаружения [276].

Также неинвазивным является анализ волос; этот вид анализа пригоден в основном, для установления хронического употребления. Подготовка проб заключалась в экстракции каннабимиметиков этанолом (в течение 3 ч) [277] или в быстром (10 мин) гидролизе матрицы в присутствии гидроксида натрия с последующей ЖЖЭ [278]. Пределы обнаружения определялись видом каннабимиметика и были хуже, чем 20 пг/г. Концентрации каннабимиметиков составляли от единиц до сотен нг/г.

Метод определения нативных JWH-018 и JWH-073 в мозговой ткани мышей был разработан для изучения распределения каннабимиметиков [279]. При подготовке проб образцы ткани гомогенизировали в воде с последующей экстракцией ацетонитрилом при вымораживании. Предел количественного определения установлен авторами *a priori* равным 1 нг/мл.

Несмотря на приемлемость (а иногда – необходимость) отбора и последующего анализа любого из биоматериалов – крови, слюны или волос – следует учесть, что основным и наиболее удобным объектом химико-токсикологического анализа является моча вследствие относительно бедной матрицы, неинвазивного характера отбора и, главное – вследствие естественной накопительной и выделительной функции. Однако, начальные исследования характера выделения JWH-018 [280] (хотя эта работа проводилась с использованием крыс)

показали, что само нативное соединение отсутствует в моче, или может быть найдено лишь в крайне малых концентрациях. Результаты последующих исследований, полученные как нами, так и иными авторами, распространили это наблюдение почти на все синтетические каннабимиметики, идентифицированные впоследствии. Этот факт может быть объяснен неполярным характером молекул каннабимиметиков, и, следовательно, их интенсивным метаболизмом. Косвенными подтверждениями такого объяснения могут быть быстрое снижение содержания каннабимиметиков в крови (JWH-018, [266]), а также способ приема – курение, при котором абсорбированное легкими соединение быстро попадает в кровоток головного мозга, минуя окислительные ферменты печени и становясь доступным для взаимодействия с рецептором CB1. Сходным физиологическим характером обладает и ТГК, который практически полностью трансформируется и экскретируется с мочой в основном, в виде конъюгата нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловой и глюкуроновой кислот. Следовательно, определение основных путей метаболизма каннабимиметиков и выявление мочевых метаболитов – единственный способ, дающий возможность использования мочи в качестве биологической пробы.

4.2. Выявление и идентификация примесей, сопутствующих JWH-018 и JWH-073 в курительных смесях

В период, предшествовавший массовому введению ограничений на оборот JWH-018 и CP 47, 497 C8 – синтетических каннабимиметиков «первой волны» (2009-2010 гг, в России – до января 2010 г), растительные курительные смеси производились в основном, фабричным способом в соответствующих формах, включающих пакетирование, цветографическую маркировку, рекламируемые названия и указание производителя («Natural Scientific Solutions», «The Psyche Deli» и пр.), Рис. 4.2. Наиболее известны Spice Diamond, Spice Gold, Spice Silver, Mojo, Genie, Yucatan Fire, Skunk, Smoke и пр.

Эти смеси отличались примерным постоянством состава. Кроме психоактивных компонентов, европейскими исследователями были обнаружены этилванилин, эвкалиптол, эвгенол, бензофенон, олеамид и токоферолы (α -, β - и γ -) [188-191].

По нашим наблюдениям, русский рынок курительных смесей отличался разнообразием продаваемых форм: они могли соответствовать изображенному на Рисунке 4.2, иметь иную маркировку (или не иметь ее), содержать очевидные признаки кустарного изготовления, проявляющиеся, в первую очередь, разнообразием составов смесей и компонентной простотой состава каждой отдельной смеси. После введения первого запрета [193], кустарно изготовленные смеси стали преобладать, причем кроме самих каннабимиметиков они могли включать полупродукты или побочные продукты синтеза, косвенно свидетельствующие об

изготовлении в условиях домашней лаборатории. Это свидетельство подтверждается появлением в Интернете предложений покупки полупродуктов синтеза, не подпадающих под запрет.



Рис. 4.2. Примеры маркировок растительных курительных смесей.

Курительные смеси, продаваемые в настоящее время, внешне могут представлять собой как измельченный растительный материал, так и вязкую смолообразную субстанцию бурого или коричневого цвета, Рисунок 4.3.

Для определения общего компонентного состава смеси экстрагировали этанолом (5 мин при обработке ультразвуком), центрифугировали и анализировали экстракты методом ГХ-МС (колонка EVDX-5ms, режим I). В целом, компоненты, обнаруживаемые нами в спиртовых экстрактах растительных курительных смесей (Таблица 4.1), можно разделить на пять групп.

1. Синтетические каннабимиметики как психоактивные компоненты, (одно или несколько соединений).
2. Ингредиенты, повышающие или модифицирующие потребительские качества продукта. Токоферолы (возможно, добавляемые в качестве антиоксиданта) присутствовали в «ранних» смесях, продаваемых до запрета и некоторое время после него. Так, токоферол был основным

наблюдаемым ингредиентом смесей “Genie Blend”, “Mojo”, “Spice Arctic Synergy”, “Spice Diamond”, “Spice Tropical Synergy”, “Yucatan Fire” and немаркированных смесей 8, 9 и 13. Олеамид (возможно, применяющийся как модификатор психофизиологических свойств каннабимиметика) наблюдали редко; значительные его количества наблюдали в составе смеси «Smoke». Эта смесь также содержала заметные количества насыщенных и ненасыщенных амидов C_{14} - C_{20} .

3. Ароматические добавки (эвгенол, ментол и производные ванилина).
4. Ряд соединений, характерный для растительных основ (включая никотин).
5. Полупродукты и побочные продукты синтеза.

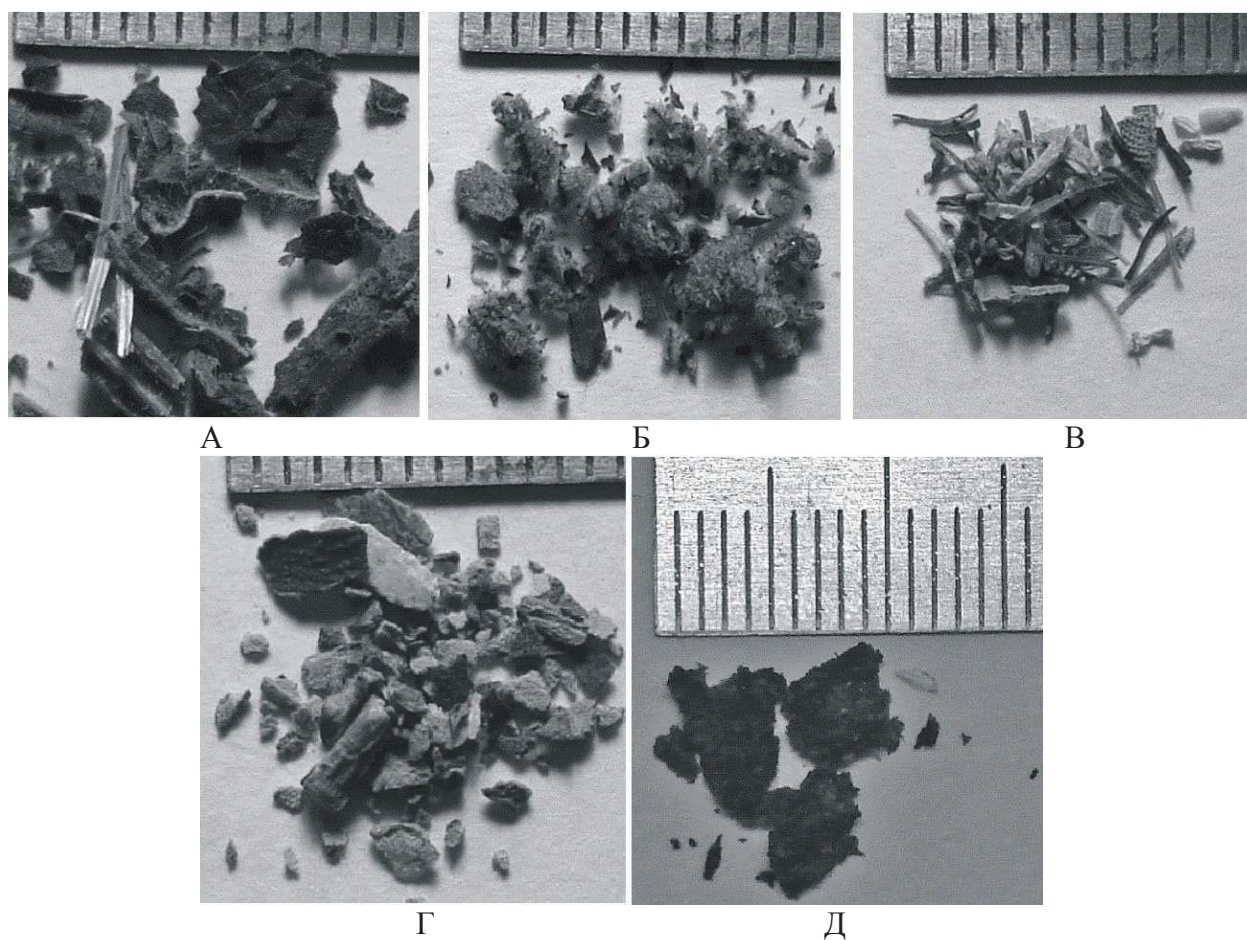


Рис. 4.3. Внешний вид растительных (А-Г) и смолообразной (Д) курительных смесей. Деления линейки соответствуют 1 мм.

Все соединения, не относящиеся к каннабимиметикам и их синтезу, найдены с помощью собственных поисковых библиотек (Гл. 2). Хроматограмма экстракта смеси Н.С. 9 приведена на Рисунке 4.4.

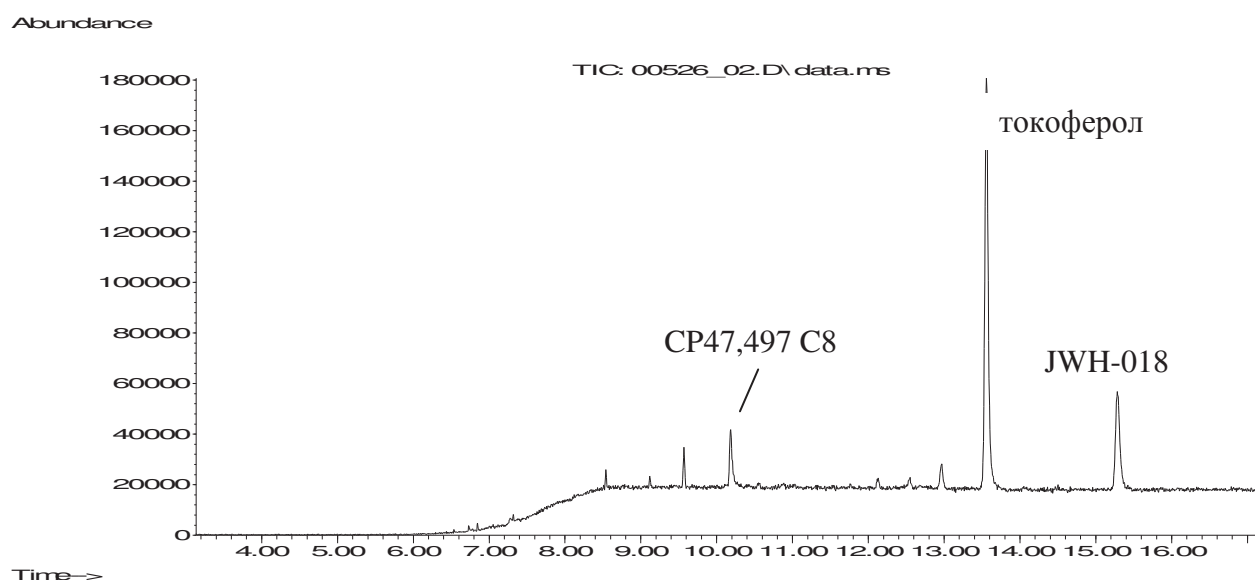


Рис. 4.4. ГХ-МС (TIC) хроматограмма экстракта смеси Н.С. 9. Колонка EVDX-5ms, режим I.

Детектирование синтетических примесей может быть полезным для определения происхождения субстанций и курительных смесей на их основе. Учитывая отмеченное выше появление смесей, загрязненных продуктами синтеза, мы выполнили идентификацию тех из них, которые содержались в смесях в наибольших концентрациях. Для этого экстракт смеси Н.С. 16 (как наиболее загрязненной синтетическими компонентами), разделили методом ВЭЖХ-ДМД. Часть экстракта упарили и сухой остаток растворили в элюенте начальной стадии градиентной программы. Условия разделения: колонка SB-C18 (4.6 мм × 150 мм, 5 мкм, Agilent) с форколонкой, заполненной этим же сорбентом (4.6 мм × 150 мм); элюировали раствором ацетонитрила (линейный градиент от 30 до 100 об.% за 15 мин) в воде; скорость потока 1 мл/мин, объем ввода 10 мкл; детектирование ДМД, 254 нм. Собранные фракции упаривали, сухой остаток растворяли в этилацетате и исследовали методом ГХ-МС непосредственно или после дериватизации (АС или TMS).

Предполагаемую идентификацию компонентов **ХII-XXIX**, отсутствующих в наших поисковых библиотеках, а также в библиотеках масс-спектров NIST11, WileyRegistry9-N08 и MPW2011, выполняли на основе ХМС и УФ-спектроскопических характеристик и общих сведений о синтезе JWH-018. Всего идентифицировали 28 соединений (Таблица 4.2 и Рисунок 4.5). Хроматограммы (ГХ-МС, TIC) и ВЭЖХ-ДМД экстракта смеси Н.С. 16 приведены на Рисунках 4.6 и 4.7, соответственно.

Синтез нафтоиндольных каннабимиметиков может быть осуществлен согласно двустадийной схеме взаимодействием нафтоилхлорида и индола с последующим N-алкилированием продукта соответствующим алкилбромидом, Рисунок 4.8 [182]. Так,

компоненты VII-IX, XI, XIII, XIV, XVII и XVIII образованы, скорее всего, в результате неполного протекания первой стадии процесса, ошибочного соотношения между исходными соединениями или недостаточной обработки продуктов. Появление хлорированных производных JWH-018 (XXVIII и XXIX) скорее всего, объясняется присутствием хлорпроизводных исходного нафтоилхлорида, приводящих к образованию устойчивых XV и XVI. Вполне возможно, что хлорпроизводное JWH-018 (идентифицированное в 2009 в Великобритании как JWH-398 [194]) также представляет собой не целевой, а побочный продукт синтеза.

Таблица 4.1. Соединения, обнаруженные в курительных смесях с преобладающим содержанием JWH-018 как психоактивного компонента (Н.С. – немаркированная смесь).

Продукт	JWH-018	JWH-073	CP 47, 497 C8	α -Токоферол	Другие соединения
Afghan incense	+++	+	-	+	-
Chernobyl	+++	+	+	+	XXVIII, XXIX
Genie Blend	++	-	-	+++	-
Master Kush	+++	-	-	+	-
Mojo	++	-	-	+++	-
Smoke	++	-	+	+	Эвгенол, олеамид (основной компонент)
Spice Arctic Synergy	++	-	++	+++	Ментол, XXVIII, XXIX
Spice Diamond	+	-	++	+++	Этилванилин
Spice Tropical Synergy	++	+	++	+++	Ментол, кофеин
Yucatan Fire	++	-	++	+++	-
Н.С. 1	+++	-	-	+++	-
Н.С. 2	+	-	+++	+	-
Н.С. 3	+++	+	-	-	Ментол
Н.С. 4	+++	++	-	+	-
Н.С. 5	+++	-	-	-	Никотин, VII, XIV
Н.С. 6	+++	+	-	-	VII
Н.С. 7	+++	-	-	-	Никотин
Н.С. 8	++	-	-	+++	-
Н.С. 9	++	-	+	+++	-
Н.С. 10	+++	-	-	-	Олеамид
Н.С. 11	+++	+	-	-	Ванилин, VII
Н.С. 12	+++	-	-	-	-
Н.С. 13	++	-	+	+++	-
Н.С. 14	+++	+	-	++	-
Н.С. 15	+++	-	-	-	-
Н.С. 16	+++	-	-	-	Ментол, никотин, III, VII, XIV, XI и пр.

Примечание. Число «+» примерно соответствует относительной интенсивности хроматографических пиков на хроматограмме образца (режим ТИС, диапазон m/z 50-550).

Таблица 4.2. Индексы удерживания полупродуктов и побочных продуктов синтеза JWH-018 на двух фазах разной полярности в двух температурных режимах.

№	Брутто-формула	[M] ⁺⁺	HP-5ms		DB-17ms	
			Режим I	Режим II	Режим I	Режим II
I	C ₇ H ₁₇ N	115	843	846	-	-
II	C ₁₁ H ₂₅ N	171	1157	1151	1187	1188
III	C ₈ H ₇ N	117	1316	1308	1597	1586
IV	C ₁₅ H ₃₃ N	227	1463	1461	1468	1466
V	C ₁₁ H ₇ N	153	1539	1521	1837	1815
VI AC	C ₁₂ H ₂₅ NO	199	1558	1553	1720	1725
VII	C ₁₃ H ₁₇ N	187	1646	1632	1875	1859
VIII	C ₈ H ₆ BrN	195	1675	1655	2035	2005
IX TMS	C ₁₄ H ₁₆ O ₂ Si	244	1796	1784	-	-
X	C ₁₃ H ₁₃ NO	199	1915	1890	2316	2287
XI	C ₁₁ H ₉ NO	171	1926	1897	2419	2379
XII	C ₁₂ H ₁₁ NO	185	1951	1925	2018	1995
XIII	C ₁₃ H ₁₆ BrN	265	1959	1936	2240	2214
XIV	C ₁₆ H ₁₈ O ₂	242	2064	2043	2356	2332
XV	C ₁₆ H ₁₇ ClO ₂	276	2248	2224	2541	2513
XVI	C ₁₆ H ₁₇ ClO ₂	276	2256	2230	2560	2532
XVII	C ₁₆ H ₁₉ NO	241	2313	2288	2731	2700
XVIII	C ₂₁ H ₂₉ NO	311	2525	2498	2863	2837
XIX	C ₁₉ H ₁₃ NO	271	2874	2834	3539	3476
XX	C ₂₄ H ₂₃ NO	341	3078	3044	3659	3610
XXI	C ₁₉ H ₁₃ NO	271	3088	-	3915	3843
XXII AC	C ₂₁ H ₁₅ NO ₂	313	3096	3057	3851	3789
XXII	C ₁₉ H ₁₃ NO	271	3159	3108	4026	3951
XXIII (JWH-073)	C ₂₃ H ₂₁ NO	327	3180	-	3931	3873
XXIV	C ₂₄ H ₂₃ NO	341	3210	3167	3884	3826
XXV	C ₂₄ H ₂₃ NO	341	3242	3205	3947	3889
XXVI (JWH-018)	C ₂₄ H ₂₃ NO	341	3285	3248	4011	3962
XXVII	C ₂₄ H ₂₃ NO	341	3363	3323	4079	4022
XXVIII	C ₂₄ H ₂₂ ClNO	375	3462	3423	4204	4184
XXIX	C ₂₄ H ₂₂ ClNO	375	3471	3431	4219	4211

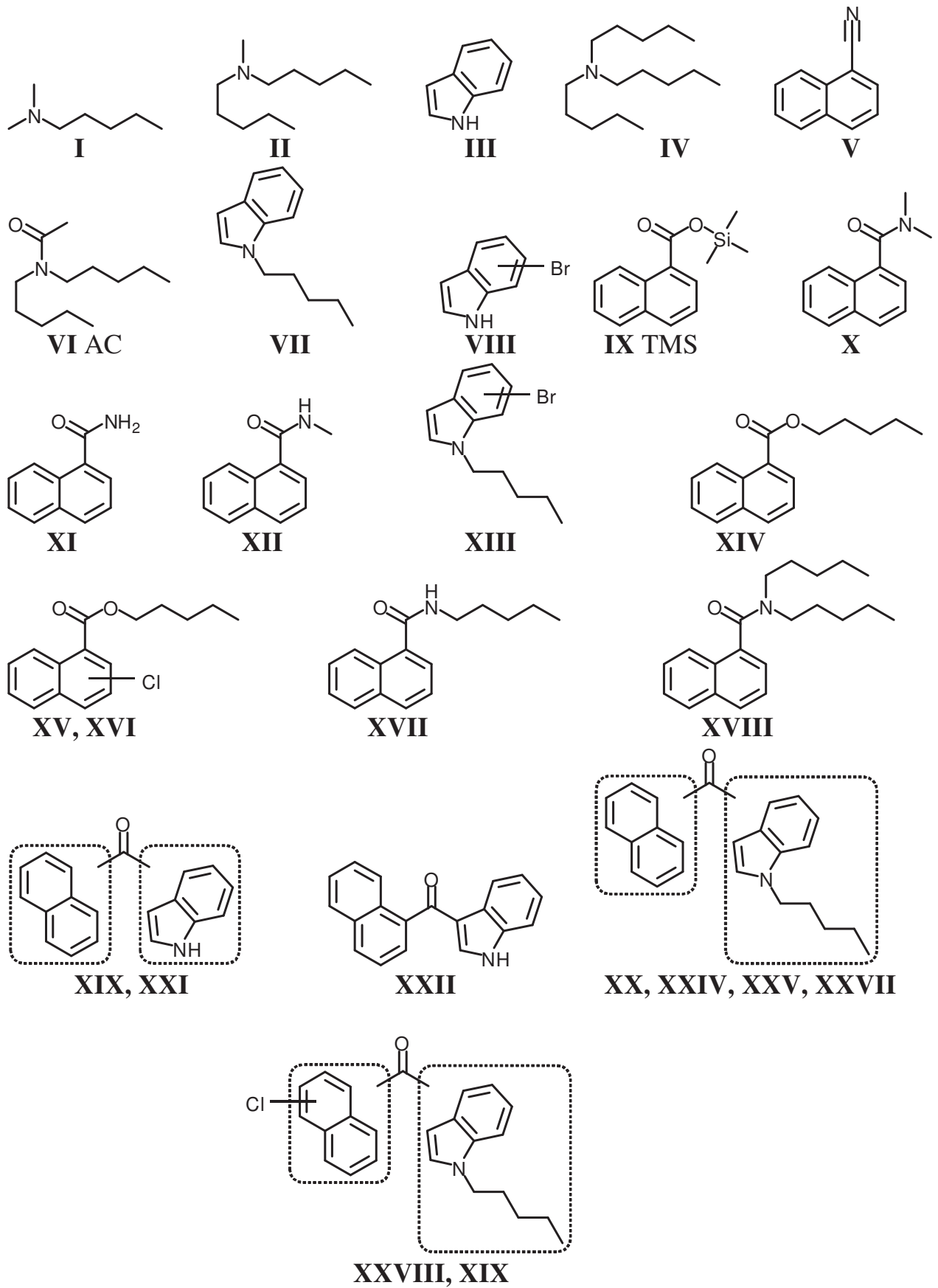


Рис. 4.5. Структуры соединений, обнаруженных в курительных смесях.

Abundance

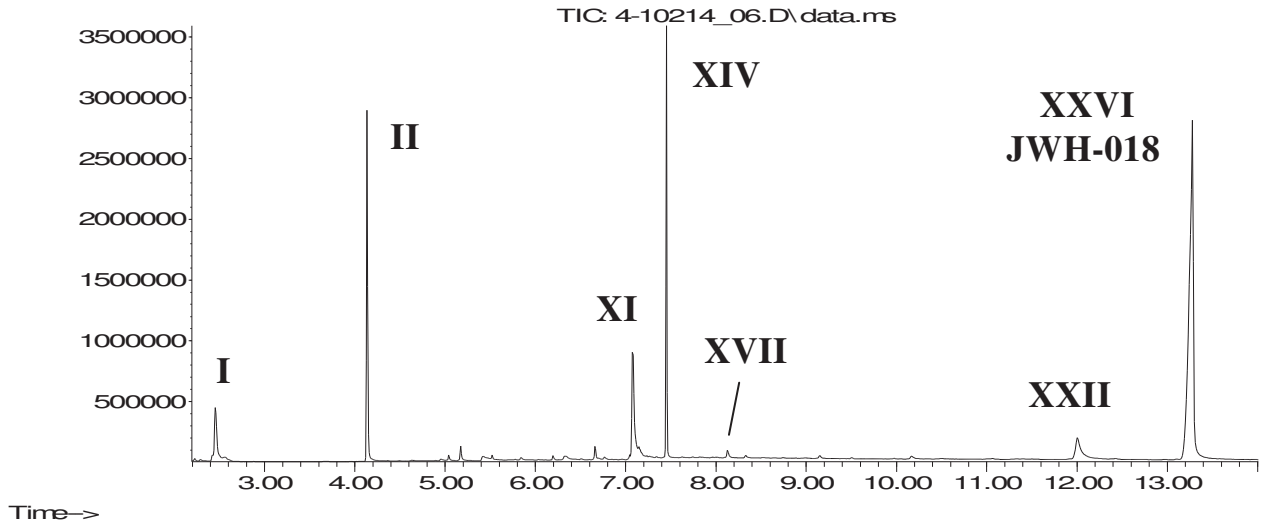


Рис. 4.6. ГХ-МС (TIC) хроматограмма экстракта смеси Н.С. 16 (колонка HP-5ms, режим I).

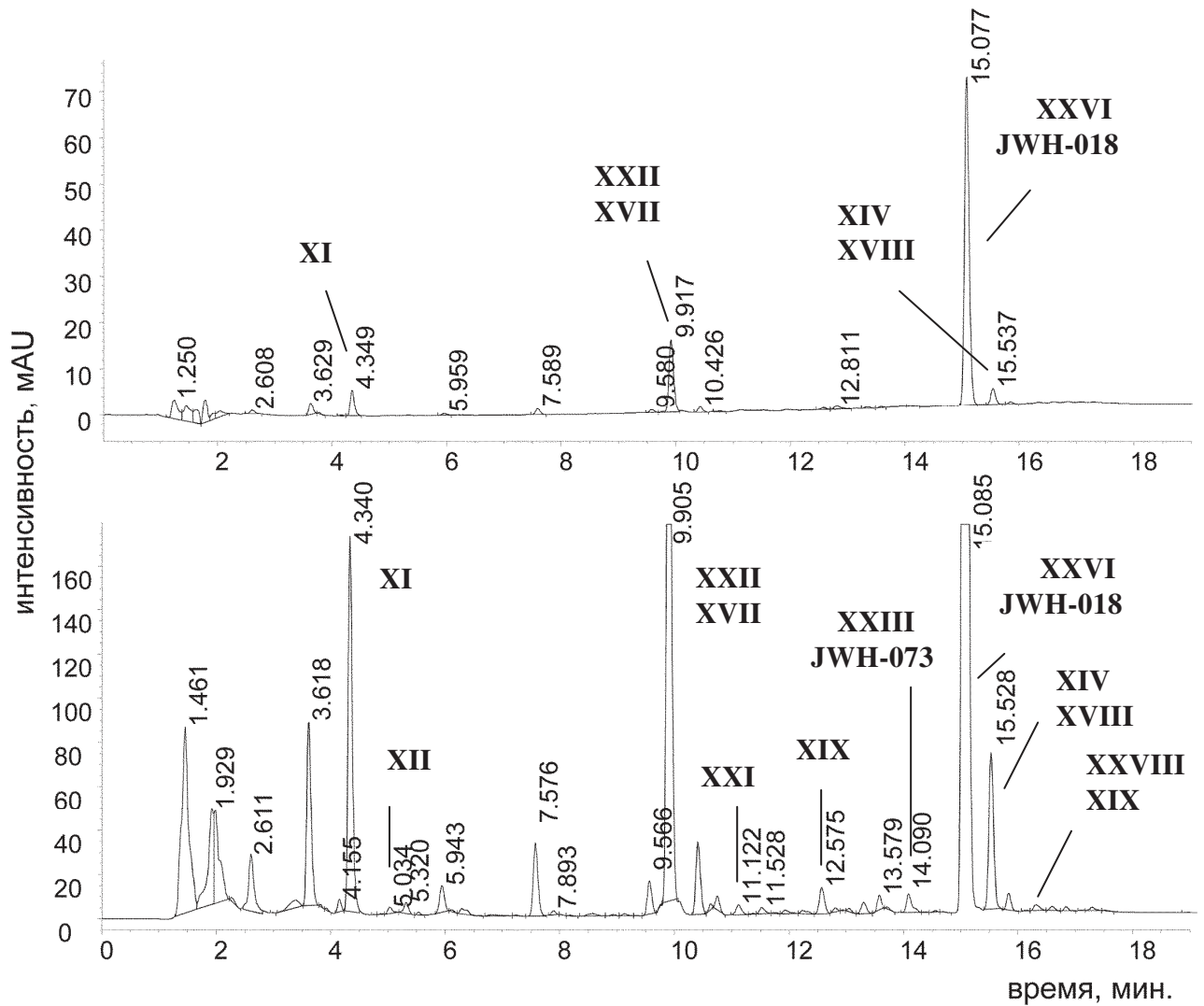


Рис. 4.7. ЖХ-ДМД хроматограмма экстракта смеси Н.С. 16 (условия в тексте). Указаны компоненты, соответствующие наиболее интенсивным пикам.

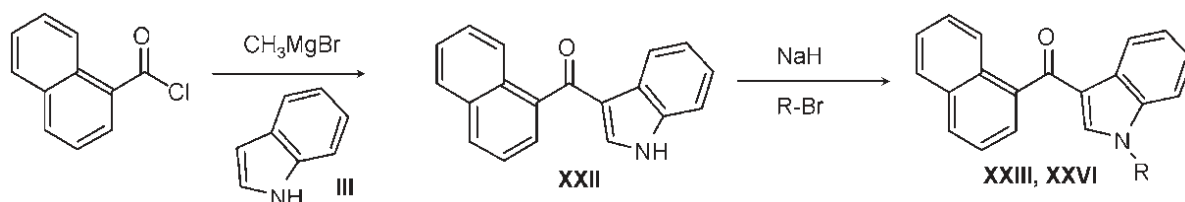


Рис. 4.8. Распространенный вариант синтеза нафтоиндольных производных. Для JWH-018 и JWH-073 $R = n\text{-C}_5\text{H}_{11}$ и $= n\text{-C}_4\text{H}_9$, соответственно.

Несмотря на то, что ацилирование индола в присутствии метилмагнийбромида проходит достаточно селективно (в положение 3), образуются также продукты неселективного ацилирования (**XIX** и **XXI**) и последующие алкилированные производные **XX**, **XXIV**, **XXV** и **XXVII**. Согласно нашим наблюдениям, основными синтетическими примесями в смесях, содержащих JWH-018 и JWH-073, являются компоненты **XI** и **XIV**.

Масс-спектры некоторых соединений, выявленных нами и отсутствующих в библиотеках NIST11, WileyRegistry9-N08 и MPW2011, приведены на Рисунке 4.9. Триметилсилильный дериват соединения **IX** получен по методике, указанной в Приложении 1.

Основным направлением фрагментации N-пентилиндола (**VII**) является элиминирование (n-1) звеньев N-алкильной цепи, что выражается в существовании интенсивного пика иона, m/z 130, в спектре. Ему соответствуют ионы, m/z 208 и 210 в спектре бромпроизводного **XIII**. Для производных 1-ацилнафталина (**XII**, **XV**, и **XVII** **XVIII**) характерны ионы, m/z 127 и 155. Этим ионам соответствуют пики, m/z 161 и 189 в спектре хлорпроизводного **XV**.

Структура соединения **XXII** была подтверждена впоследствии в ходе исследования метаболизма JWH-018 и JWH-073. Его спектр, как и спектры его изомеров **XIX** и **XXI**, имеют ионы, m/z 116 и 144, соответствующие индольному и ацилированному индольному остаткам, а также m/z 127 и 155, соответствующие нафталиновому и ацилированному нафталиновому остаткам. Спектры всех трех изомеров в целом, сходны и отличаются только интенсивностью ряда ионов. Ацетатный дериват получен по методике, указанной в Приложении 1.

Целевые соединения синтеза JWH-018 (**XXVI**) и JWH-073 (**XXIII**) идентифицировали согласно их ХМС характеристикам [188-191]. Их фрагментация подобна неалкилированным нафтоиндолам. Интенсивные пики ионов, m/z 200 и 214, соответствуют ацилированным индольным остаткам с N-бутильной (JWH-073) и N-пентильной (JWH-018) боковыми цепями. Ионы, m/z 270 и 284 (JWH-018 и JWH-073), 310 (JWH-073) и 324 (JWH-018) формируются при ступенчатом элиминировании N-алкильных цепей. Спектры изомерных N-пентилнафтоиндолов (JWH-018, **XX**, **XXIV**, **XXV** и **XXVII**) в целом, подобны.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [32, 281-284].

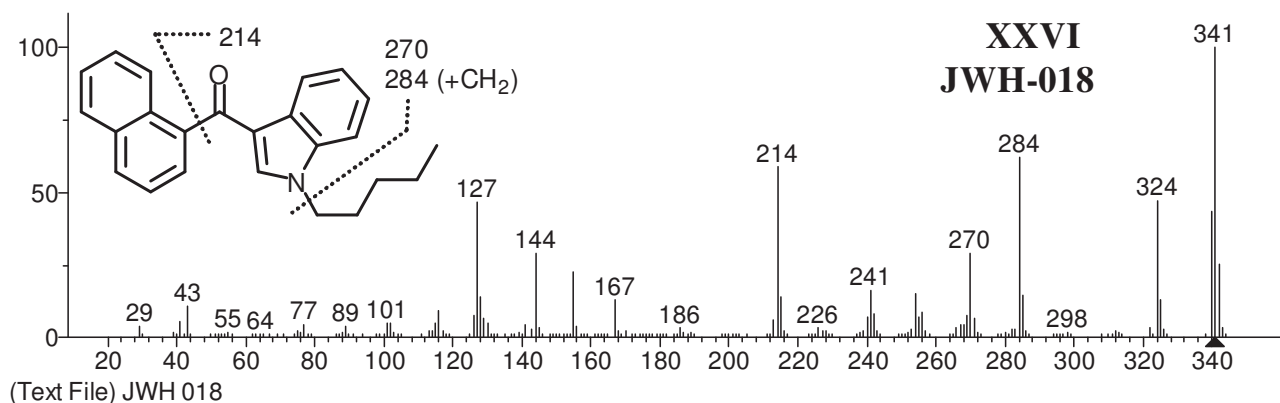
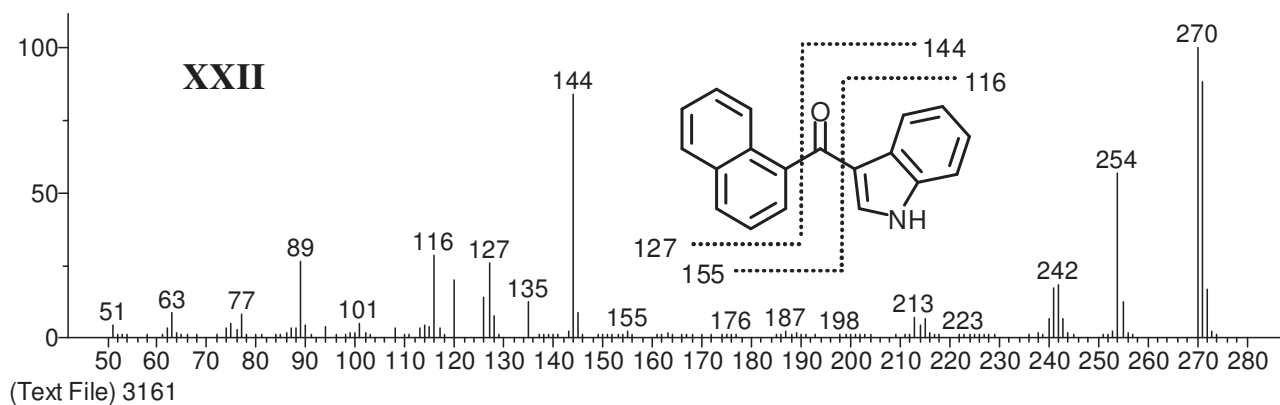
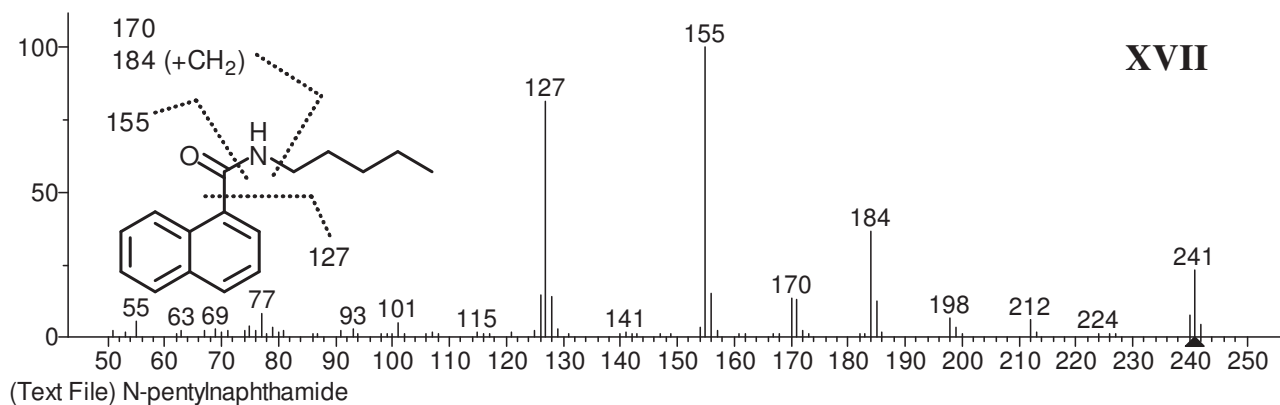
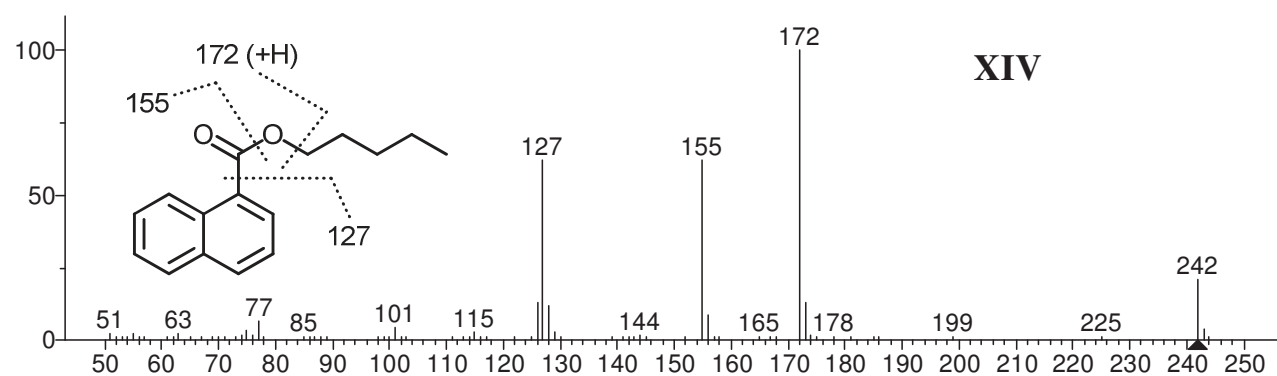


Рис. 4.9. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) полу- и побочных продуктов синтеза JWH-018 (продолжение).

4.3. Выявление метаболитов JWH-018

JWH-018 – первое из обнаруженных и наиболее полно исследованное соединение, принадлежащее обширной группе N-алкилиндольных каннабимиметиков. Как было показано в работах [285, 286], JWH-018 является полным агонистом рецептора CB1 с константой аффинности $K_i \sim 9$ нМ. Несмотря на то, что процедура измерения величин K_i не является стандартизированной (обычно она заключается в оценке параметров конкурентного связывания рецептором CB1 исследуемого каннабимиметика и стандартных соединений – тритированных CP55,940 или WIN55,212-2) [163], сравнительно невысокая дозировка JWH-018 свидетельствует в пользу приведенного значения.

Первые публикации исследования метаболизма JWH-018 у крыс были сделаны Краемер *et al.* [287, 288]; авторами этих работ были выявлены в основном, N-дезалкилированные метаболиты при небольшом содержании гидроксильных групп. Кроме того, в моче крыс был обнаружен нативный JWH-018 [287]; впрочем, в своем параллельном сообщении [288] Краемер *et al.* уточнили, что содержание нативного соединения весьма невелико. Исследования, проведенные *in vitro* с применением печеночных микросом человека показали, что основными направлениями окислительного метаболизма JWH-018 [289] могут быть моно- и полигидроксилирование исходной структуры при расположении гидроксильных групп на разных остатках молекулы, а также N-дезалкилирование, карбоксилирование и образование дигидродиольной группы на нафталиновом остатке. Эти результаты вполне согласуются с ранним сообщением [28], описывающим исследование *in vitro* метаболизма близкого по структуре соединения JWH-015 ((2-метил-1-пропил-1H-индол-3-ил)(нафталин-1-ил)метанол, агонист рецептора CB2).

Следует отметить, что исследования метаболизма *in vitro* являются важными в плане определения возможных основных направлений метаболизма, но не дающих информации об их вкладе в формирование реального метаболического мочевого профиля. Метаболизм определенного соединения для крыс может значительно отличаться от человеческого. Первой опубликованной печатной работой, описывающей выявление мочевых метаболитов JWH-018 у людей, следует считать сообщение Соболевского с соавт. [290]. На основании исследования образцов мочи трех курильщиков, авторы предположительно идентифицировали ряд метаболитов JWH-018, включая продукты моно- и дигидроксилирования, дезалкилирования с моногидроксилированием, карбоксилирования. Также были найдены метаболиты, имеющие дигидродиольную группу на нафталиновом остатке. Признавая несомненные достоинства данной работы, заключающиеся в описании опыта успешного выявления метаболитов JWH-018 в реальных образцах, следует отметить, что неверное предположение авторов о структуре

основного (моногидроксилированного) метаболита привело впоследствии к появлению работ, ориентированных на определение метаболитов, не являющихся основными.

Перед поиском метаболитов JWH-018 нами были оценены температурная (в условиях испарения при горении растительной основы курительной смеси) и химическая (в условиях кислотного деконъюгирования, Приложение 1) стабильность нативного соединения. Для выявления возможных продуктов пиролиза JWH-018, 50 мг растительной курительной смеси сжигали в кварцевой трубке в потоке воздуха. Продукты сжигания, конденсировавшиеся на слое стеклянной ваты, смывали последовательно равными порциями этанола и этилацетата. Смывы объединяли, упаривали до приблизительного объема 1 мл и анализировали методом ГХ-МС. Не было найдено никаких дополнительных соединений, структуры которых могли бы содержать индольные (пентиндольные) или нафталиновые остатки. Стабильность JWH-018 в условиях, близких к условиям кислотного деконъюгирования метаболитов фазы II (нагревание до 95°C в водном растворе, содержащем 30 об.% этанола и 10 об.% HCl конц.) проверяли методом ВЭЖХ-ДМД. Отбираемые пробы кислого раствора (50 мкл) смешивали с подобным объемом раствора аммиака (5 об. % водного NH₃ конц.) и вводили в хроматограф (объем ввода 25 мкл, элюирование 90 об.% ацетонитрила в воде, остальные условия аналогичны приведенным ранее). Присутствие этанола в реакционной среде необходимо из-за малой растворимости JWH-018 в воде. Снижения концентрации JWH-018 не обнаружили, по крайней мере, в течение 110 мин (обычное время деконъюгирования 60 мин.).

Для исследования метаболического профиля JWH-018 и поиска соединений, которые могли бы использоваться в качестве биологических маркеров JWH-018, применяли следующие биоматериалы:

- образцы мочи (8) крыс, получивших JWH-018;
- образцы мочи (27) и сыворотки крови (1) персон, доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями.

Для проведения испытаний на лабораторных животных пять грамм растительной курительной смеси, содержащей JWH-018, экстрагировали дважды порциями по 100 мл этанола, фильтровали и раствор упаривали на вакуумно-роторном испарителе досуха. Полученный смолообразный остаток (СО) весом около 110 мг и содержащий значительное количество JWH-018 применяли без дальнейшей очистки для выявления продуктов метаболизма у крыс и у человека.

Испытания на крысах. Использованы аутбредные крысы-самцы Wistar весом 400-500 г. Для определения фармакологического эффекта (эксперимент №1), суспензию СО в 2% Tween-80 вводили трем крысам внутрибрюшинно после суточного голодания из расчёта 15 и 30 мг СО/кг, что соответствует 0.7 – 1.4 г исходной курительной смеси. Двигательную активность

животных исследовали в тесте «Открытое поле». Каталептическое действие экстракта констатировали по факту иммобилизации животных в принудительной позе, при помещении их передними лапами на брусок высотой 15 см («поза лектора»). Для выявления метаболитов JWH-018 в моче животных (эксперимент №2) СО растворяли в 96% этаноле (40 мг/мл), раствор разводили в 16 раз водой, полученную суспензию вводили четырём крысам внутривентрикулярно в дозе 25 мг СО/кг. Через 3 часа после введения суспензии СО животных помещали в метаболические кюветы для сбора мочи на 20 часов при свободном доступе к воде.

Через 5 и 10 мин после внутрибрюшинного введения суспензии СО в Tween-80 (эксперимент №1) у животных отмечали практически полное подавление двигательной активности в тесте «Открытое поле», сопровождавшееся неестественными движениями вспять. При помещении крыс в принудительную позу наблюдали самопроизвольную иммобилизацию животных на 5-10 мин в этой позе. Иммобилизация сопровождалась полным прекращением движения вибрисс. Через 1 и 2 часа после введения СО при повторном тестировании в «Открытом поле» выявили значительное снижение двигательной активности с полной редукцией таких показателей, как «вертикальные стойки» и «выход в центральные секторы». Через 3 часа после введения СО происходило постепенное восстановление двигательной активности с сохранением повышенного тонуса скелетных мышц и вокализации при попытках их перемещения.

В эксперименте №2 через 15 мин. после внутривентрикулярного введения суспензии СО в этаноле у всех животных отмечено увеличение двигательной активности, сохранявшееся в течение трёх часов. Каталептическое действие СО при этом способе введения не проявлялось.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, проводили через двухстадийную процедуру поиска одурманивающих средств. Первую стадию (предварительный иммунохроматографический анализ) выполняли с помощью экспресс-тестов ИХА-Марихуана-фактор, ИХА-Мульти-4-фактор и ИХА-ТАД-фактор. Вторая стадия (подтверждающий ГХ-МС анализ) заключалась в скрининге образцов методом, описанным в Гл. 2 и использовании сформированных поисковых библиотек. Ни в одном из образцов, допущенных для дальнейшей обработки, не были найдены известные ранее психоактивные соединения или их метаболиты.

Случаи, использованные для поиска метаболитов в крови и измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

С1 – курение смеси Н.С. 1, Таблица 4.1. Кровь отбирали через 20 мин после приема, мочу собирали в течение суток.

С2 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 1 сут.

С3 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 2 сут.

Подготовка проб и условия анализа. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных, АС и TFA образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS образцов.

Образцы мочи деконъюгировали кислотным или ферментативным методами (Приложение 1), экстрагировали и анализировали методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Для ГХ-МС проводили дериватизацию триметилсилилированием (TMS), ацетилизацией (АС), и трифторацетилизацией (TFA). Степень концентрирования образцов равна 50.

Всего охарактеризовали 33 соединения, из них 7 артефактов пробоподготовки и ГХ. Предполагаемые структуры приведены на Рисунке 4.10. Исходный JWH-018 не был обнаружен ни в одном из образцов.

В Таблице 4.3 указаны линейные индексы удерживания для двух подобных фаз при двух температурных режимах работы колонок. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1, если не указано иное) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС/МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных, АС и TFA образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS образцов.

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.6 (M.w. = 357). Шесть моногидроксилированных метаболитов указаны на ЖХ-МС/МС хроматограмме, Рисунок 4.11 (А и Б).

ЭР спектры всех шести метаболитов имеют ионы, m/z 127 и 155 (Рисунки 4.20 и 4.22), соответствующие неизменным нафталиновому и оксометилнафталиновому остаткам, соответственно. Существование малоинтенсивных пиков ионов, m/z 230 указывают на наличие гидроксильной группы на пентилиндоильном остатке. Наиболее интенсивны хроматографические сигналы метаболитов **M1.1** и **M1.2**. Спектры минорных метаболитов **M1.5** и **M1.6** также содержат пики, m/z 127 и 155, и, следовательно, эти метаболиты гидроксильноированы по пентилиндоильному остатку.

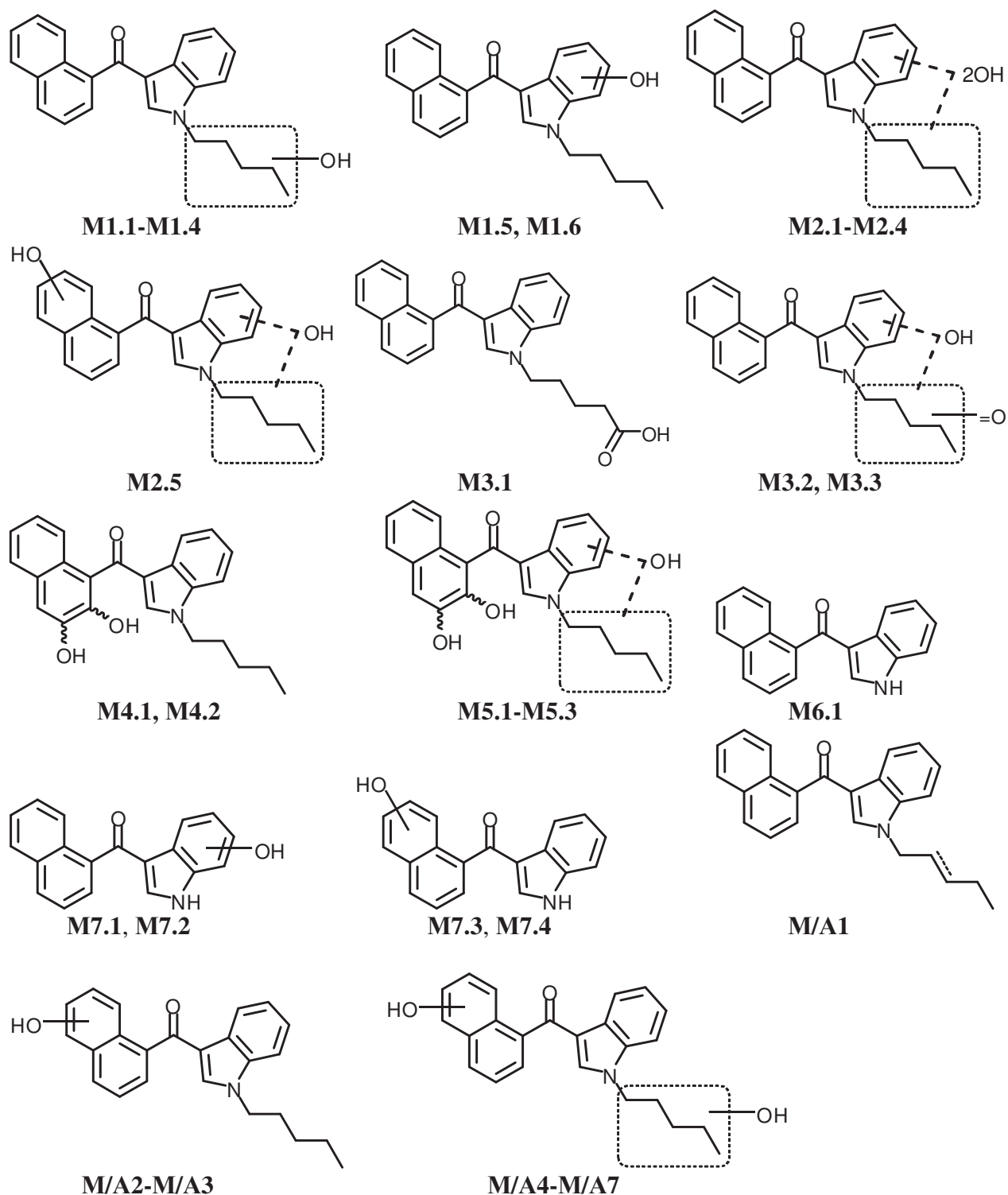


Рис. 4.10. Структуры метаболитов и артефактов JWH-018.

Три соединения (**M/A2-M/A3**) были найдены в образцах, получаемых кислотным деконъюгированием мочи (Рисунок 4.11Г) и отсутствовали в образцах, деконъюгированных ферментативным способом (Рисунок 4.11В). Их спектры имеют ион, m/z 171, что позволяет предположительно идентифицировать эти соединения как артефакты пробоподготовки,

имеющие гидроксильную группу на нафталиновом остатке и получающиеся дегидратацией дигидродиольных метаболитов **M4.1** и **M4.2** (см. далее) при нагревании в сильноокислой среде.

Таблица 4.3. Индексы удерживания метаболитов и артефактов JWH-018 для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах.

N	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	EVDX-5ms		VF-5ms	
				Реж. I	Реж. III	Реж. I	Реж. III
1	JWH-018	C ₂₄ H ₂₃ NO	341	3265	3316	-	-
2	M1.1	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	357	3508	3543	-	-
3	M1.1 TMS	C ₂₇ H ₃₁ NO ₂ Si	429	3462	3498	3489	3522
4	M1.1 AC	C ₂₆ H ₂₅ NO ₃	399	3542	3580	-	-
5	M1.1 TFA	C ₂₆ H ₂₂ F ₃ NO ₃	453	3303	3328	-	-
6	M1.1/A1	C ₂₄ H ₂₁ NO	339	3276	3313	-	-
7	M1.2 TMS	C ₂₇ H ₃₁ NO ₂ Si	429	3555	3591	3583	3618
8	M1.2 AC	C ₂₆ H ₂₅ NO ₃	399	3660	3702	-	-
9	M1.2 TFA	C ₂₆ H ₂₂ F ₃ NO ₃	453	3427	3454	-	-
10	M1.3 TMS	C ₂₇ H ₃₁ NO ₂ Si	429	3535	3571	3564	3602
11	M/A2 TMS	C ₂₇ H ₃₁ NO ₂ Si	429	3525	3557	3551	3584
12	M2.1 2TMS	C ₃₀ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	517	-	3674	3668	3699
13	M2.2 2TMS	C ₃₀ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	517	3672	3699	3696	3719
14	M/A5 2TMS	C ₃₀ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	517	3709	3735	3729	3757
15	M/A6 2TMS	C ₃₀ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	517	-	-	3733	3757
16	M/A7 2TMS	C ₃₀ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	517	-	3752	3748	3775
17	M3.1 TMS	C ₂₇ H ₂₉ NO ₃ Si	443	3652	3689	3683	3719
18	M3.1 Me	C ₂₅ H ₂₃ NO ₃	385	3591	3630	-	-
14	M6.1 AC	C ₂₁ H ₁₅ NO ₂	313	3085	3129	-	-
15	M7.1 2AC	C ₂₃ H ₁₇ NO ₄	371	3441	3479	-	-
16	M7.2 2AC	C ₂₃ H ₁₇ NO ₄	371	3460	3499	-	-
17	M7.3 2AC	C ₂₃ H ₁₇ NO ₄	371	3414	3451	-	-
18	M7.4 2AC	C ₂₃ H ₁₇ NO ₄	371	3454	3493	-	-

Дальнейшая детализация структур моногидроксилированных метаболитов была выполнена посредством их модификации и выявлением продуктов методом ГХ-МС. Поскольку концентрации всех выявленных метаболитов JWH-018 обычно невелики и все они имеют полярные группы (это же можно сказать и других рассмотренных далее каннабимиметиках), то наиважнейшим условием их ГХ определения является верный выбор способов дериватизации. В редких случаях содержание метаболита **M1.1** достаточно для обнаружения в свободном состоянии. Характер спектра недериватизированного **M1.1** однозначно указывает на гидроксирование N-пентильной цепи, что следует из присутствия интенсивного пика иона, *m/z* 144, соответствующего неизмененному оксометилиндолильному остатку. Наличие ионов, *m/z* 270 и 284, подтверждает этот вывод, а также указывает на то, что α-метиленовая группа боковой N-пентильной цепи не гидроксирована. Ионы, *m/z* 127, 144, 155, 270 и 284 (или их

дериватизированные аналоги) можно использовать в качестве характеристических при поиске и выявлении других метаболитов.

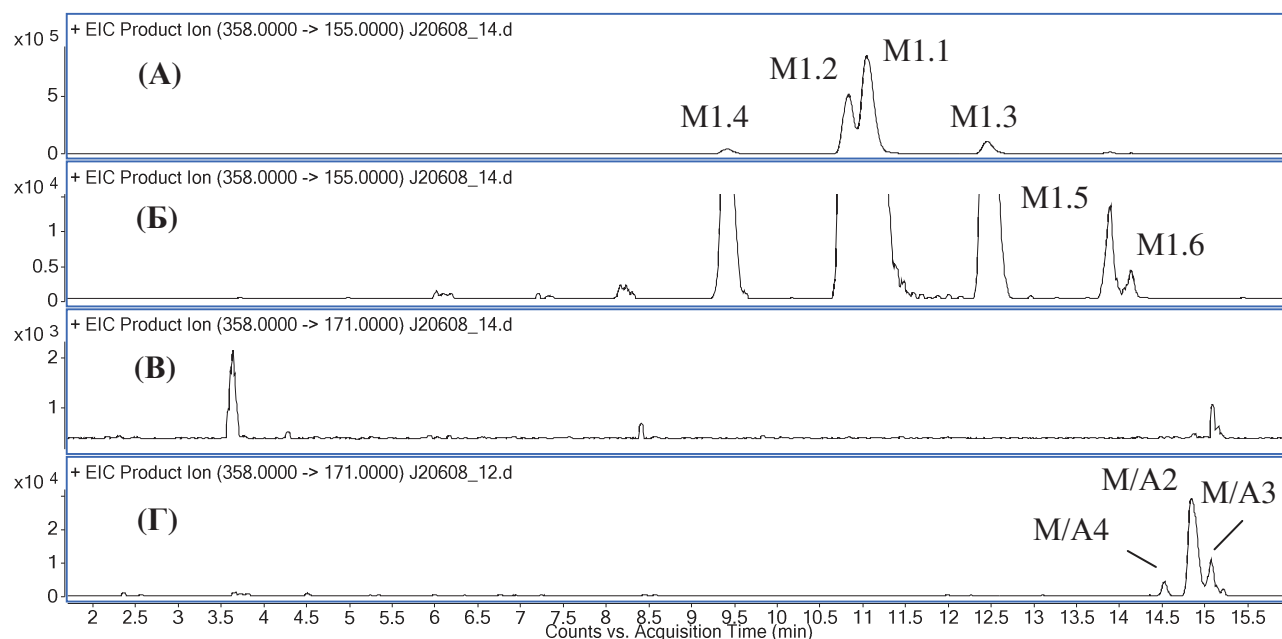


Рис. 4.11. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека. Моногидроксилированные метаболиты (А-В), ферментативный гидролиз. Моногидроксилированные артефакты (Г), кислотный гидролиз.

Наилучшим способом дериватизации по критериям удерживания и эффективной чувствительности было найдено триметилсилилирование, Этот способ пробоподготовки позволяет наблюдать как моногидроксилированные, так и более глубоко окисленные формы (Рисунок 4.12).

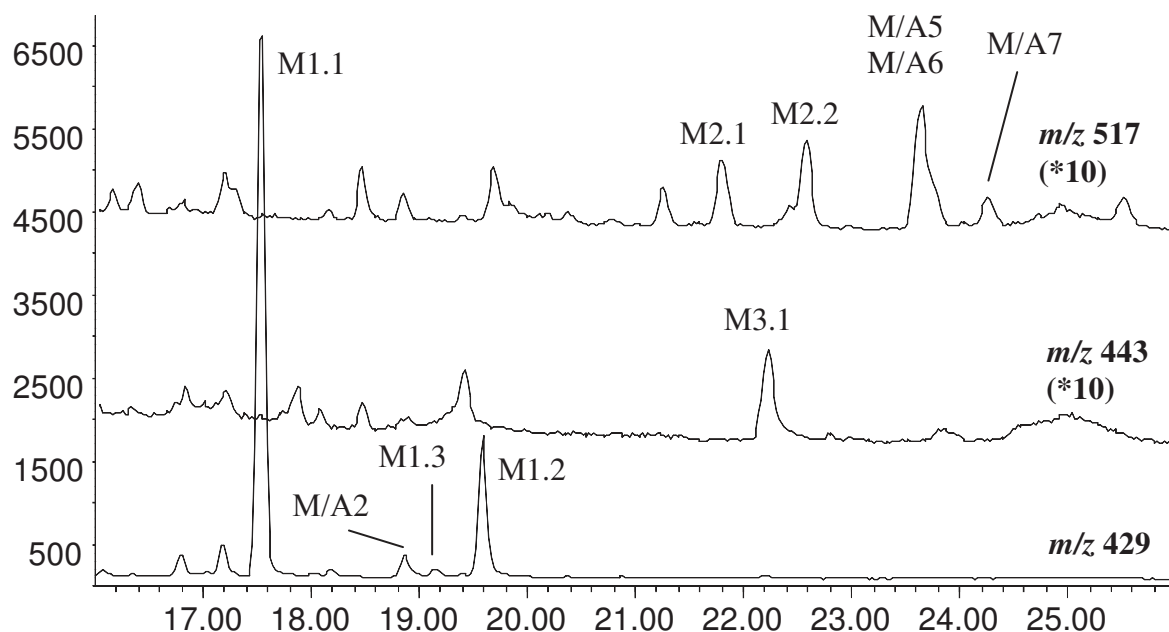
Так же как и для метода ЖХ-МС/МС, хроматографические сигналы метаболитов **M1.1** и **M1.2** наиболее интенсивны. Их спектры подобны и содержат те же ионы (m/z 144, 127, 155, 270 и 284), что и спектр недериватизированного **M1.1**, Рисунок 4.21. Чувствительности метода ГХ-МС без дополнительного концентрирования образца обычно недостаточно для наблюдения минорных форм **M1.4-M1.6** и **M/A3, M/A4**.

При использовании ацетилирования можно наблюдать основные моногидроксилированные метаболиты (**M1.1** и **M1.2**), причем следует отметить, что данный способ дериватизации не является оптимальным из-за увеличения удерживания и, следовательно, снижения чувствительности – поскольку удерживание всех рассматриваемых аналитов соответствует изократическому участку хроматограммы.

Хотя фрагментация (ЭИ) ацетатных дериватов **M1.1** и **M1.2** почти подобна недериватизированным и силилированным формам, важным отличием следует считать наличие

малоинтенсивного пика иона, m/z 212, образующегося при элиминировании молекулы уксусной кислоты от боковой N-алкильной цепи. Этот ион более интенсивен в спектрах трифторацетатов.

Abundance



Time->

Рис. 4.12. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека, кислотный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты (m/z 429). Карбоксилированный метаболит (m/z 443). Дигидроксилированные метаболиты и артефакты (m/z 517). (Колонка VF-5ms, режим I, TMS, SIM).

Фрагмент хроматограммы (ГХ-МС, изократический участок, температура 300°C) трифторацетилованного образца мочи приведен на Рисунке 4.13. Как можно убедиться, TFA дериват метаболита **M1.2** элюируется нормально, в то время как дериват метаболита **M1.1** подвержен термолузу, выражающемуся в элиминировании трифторуксусной кислоты. Образующийся ГХ артефакт **M/A1** характеризуется меньшим удерживанием и имеет двойную связь на боковой алкильной цепи. Такое различие в ГХ поведении **M1.1** и **M1.2**, отличающихся только положением гидроксильной группы на боковой N-алкильной цепи, позволяет с уверенностью заключить, что гидроксильная группа у **M1.2** расположена на (ω)-звене цепи, а у **M1.1** – на любом из остальных звеньев. Это предположение было впоследствии подтверждено работами [291, 292], авторы которых идентифицировали **M1.1** и **M1.2** как продукты (ω -1)- и (ω)-гидроксилирования JWH-018, соответственно.

Методом ГХ-МС в образце сыворотки крови курильщика не обнаружили нативный JWH-018, хотя этот факт может объясняться недостаточной чувствительностью метода. Тем не

менее, были найдены два моногидроксилированных метаболита **M1.1** и **M1.2**, Рисунок 4.14. В том случае, если аналитик не располагает возможностями метода ЖХ-МС/МС (при использовании режима MRM), поиск этих метаболитов более целесообразен, нежели поиск нативного соединения. Кроме того, определение метаболитов JWH-018 в крови имеет практическое значение ввиду их психофизиологической активности [293].

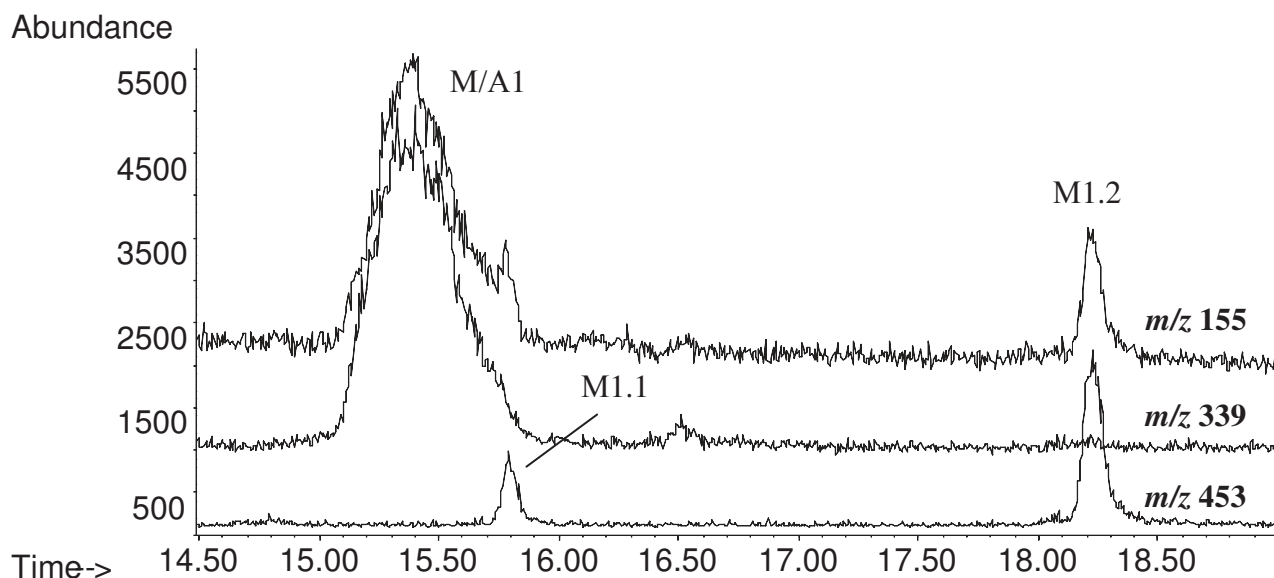


Рис. 4.13. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Термолиз ТФА деривата моногидроксилированного метаболита **M1.1**. (Колонка EVDX-5ms, режим I, TFA).

*Дигидроксилированные метаболиты **M2.1-M2.5** (M.w. = 373).* Концентрации всех пяти выявленных дигидроксилированных метаболитов в образцах мочи была малы, что затрудняло определение особенностей структур. Однако, можно заключить, что четыре соединения (**M2.1-M2.4**), Рисунок 4.15, имеют две гидроксильные группы на N-пентилиндольном остатке, на что указывает наличие ионов, m/z 127 и 155, свидетельствующих о присутствии неизмененного нафталинового остатка.

ЭР спектр пятого дигидроксилированного метаболита (**M2.5**) характеризуется переходом $374 \rightarrow 171$ (Рисунок 4.15Б), и, следовательно, имеет одну гидроксильную группу на нафталиновом остатке. Из-за малого содержания всех этих соединений сопоставление данных, полученных методами ЖХ-МС/МС и ГХ-МС не проводили.

Методом ГХ-МС выявили только два метаболита (**M2.1** и **M2.2**), причем их спектры также содержат ионы, m/z 127 и 155. Кроме того, в спектре **M2.2** присутствуют группы ионов вблизи m/z 358 и 372, свидетельствующие о наличии моногидроксилированного наптоилиндольного остатка, и, следовательно, о расположении одной гидроксильной группы на

боковой цепи. Как будет указано ниже (в разделах, посвященных JWH-073 и AM-694), при фрагментации гидроксированной боковой цепи возможно формирование как четно-электронных, так и нечетно-электронных ионов (ион-радикалов), образующихся в результате переноса протона от элиминируемого алканового остатка. Это приводит к появлению моноазотсодержащих ионов, характеризующихся как четными, так и нечетными значениями m/z ; в данном случае 358, 359 и 372, 373, причем относительная интенсивность пиков этих ионов может варьироваться в широких пределах.

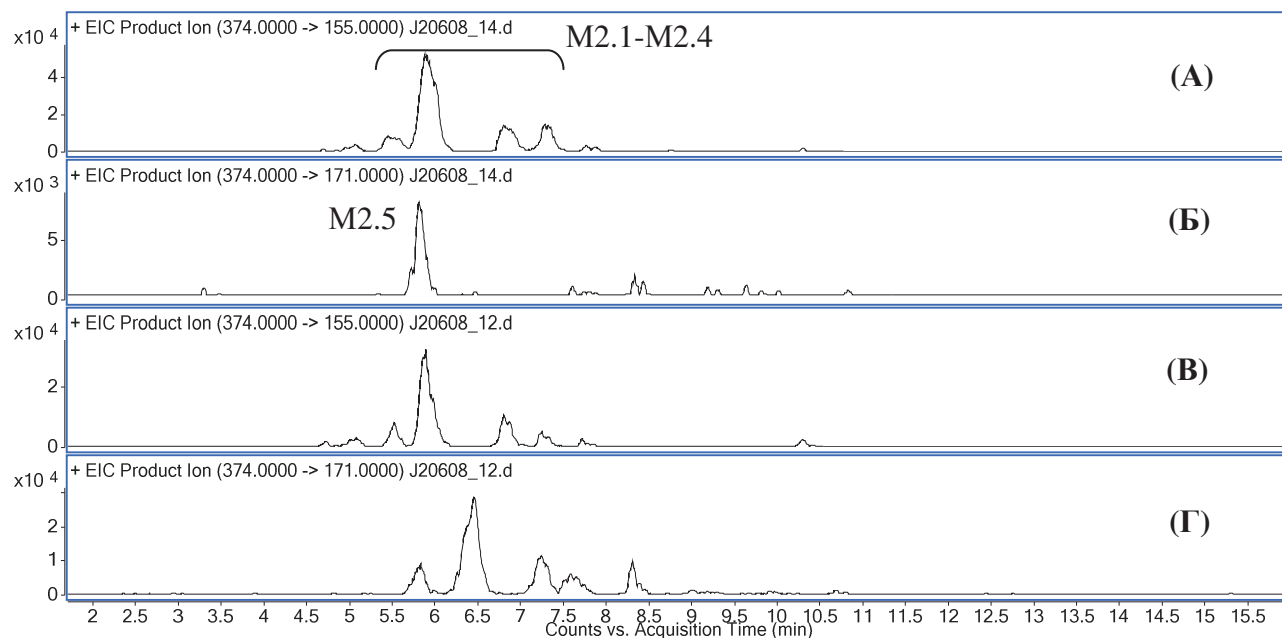
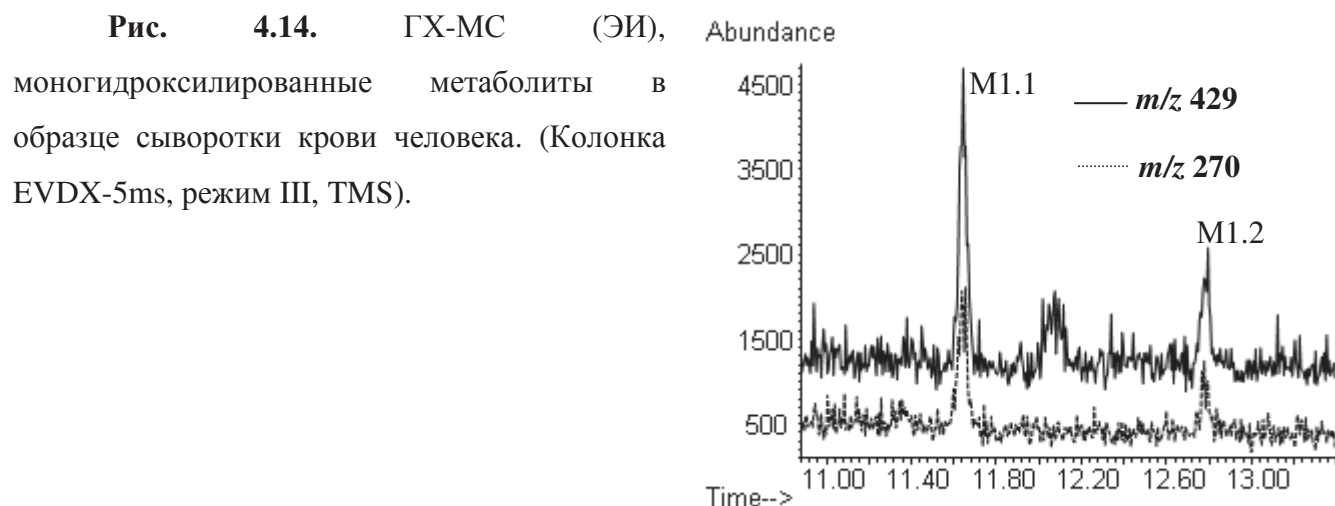


Рис. 4.15. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека. Дигидроксированные метаболиты (А и Б), ферментативный гидролиз. Дигидроксированные артефакты в присутствии дигидроксированных метаболитов (В и Г), кислотный гидролиз.

Три дигидроксилированных артефакта пробоподготовки были выявлены методом ГХ-МС (Рисунок 4.12). Сопоставление данных ГХ-МС и ЖХ-МС/МС в этом случае также не проводили. ЭИ спектры артефактов **M/A5-M/A7** содержат пики ионов, m/z 243, соответствующие моногидроксилированному оксометилнафталиновому остатку, а также ионы, m/z 358 и 372, обсуждаемые ранее. Существование этих соединений подтверждено методом ЖХ-МС/МС (Рисунок 4.15). Спектр, зарегистрированный в максимуме наиболее интенсивной полосы (6.5 мин) содержит интенсивный пик иона, m/z 171, соответствующий моногидроксилированному оксометилнафталиновому остатку. Все три артефакта отсутствуют в образцах, деконъюгированных ферментативным способом и образуются (подобно моногидроксилированным артефактам **M/A2-M/A4**) при дегидратации гидроксилированных дигидродиольных метаболитов **M5.1-M5.3** (см. далее) в сильнокислой среде. Артефакты **M/A5** и **M/A6** хорошо заметны на ГХ-МС хроматограммах и могут быть использованы для подтверждения при обнаружении метаболитов JWH-018.

*Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи **M3.1-M3.3*** (M.w. = 371). ЭР спектры трех метаболитов имеют пики ионов, m/z 127 и 155 (Рисунок 4.16) и, следовательно, гидроксильная группа расположена на пентилиндольном остатке, а карбонильная – на боковой N-алкильной цепи.

Дальнейшую детализацию структур минорных **M3.2** и **M3.3** не проводили из-за малого содержания. Исходя из массы этих соединений, возможно также предположить, что они являются дигидроксилированными формами, имеющими двойную связь на боковой цепи. Подобные формы действительно были выявлены для других каннабимиметиков, но поскольку их концентрация была крайне мала – в отличие от карбонилсодержащих форм, характерных для большинства каннабимиметиков – предположение о наличии карбонильной группы в данном случае представляется более обоснованным.

Метаболит **M3.1**, характеризующийся наиболее интенсивным хроматографическим пиком, был выявлен также методом ГХ-МС (Рисунки 4.12 и 4.21). Его ЭИ спектр содержит малоинтенсивный пик иона, m/z 244, соответствующий гидроксилированному оксометилпентилиндольному остатку (m/z 230) с добавкой +14. Интенсивный пик иона, m/z 270, а также 284 и 144 в ЭИ спектре **M3.1** указывают на неизменный характер индольного остатка. Обработка деконъюгированных образцов мочи метанолом в присутствии соляной кислоты привела к образованию метилата, что позволило уверенно опознать **M3.1** как продукт карбоксилирования JWH-018. После этерификации метанолом и последующей TMS дериватизации триметилсилильный дериват (**M3.1** TMS) не обнаружили. Присутствие карбоксилированного метаболита в общей смеси подтверждено сообщениями других исследователей [293-295].

Метаболиты с дигидродиольной группой на нафталиновом остатке **M4.1** и **M4.2** (M.w. = 375). В публикации Zhang *et al* [28] было высказано предположение о том, что подобные соединения образуются в результате метаболического эпоксицирования нафталинового остатка с последующим гидролизом эпоксида. Оба дигидродиольных производных наблюдали только методом ЖХ-МС/МС в человеческой моче, Рисунок 4.16. Эти соединения присутствовали только в образцах, деконъюгированных ферментативным способом и являются источником образования дегидратированных артефактов **M/A2-M/A4** при кислотном деконъюгировании. В ЭР спектрах обоих соединений имеются пики ионов, m/z 214, соответствующие неизмененному оксометилпентилиндольному остатку и m/z 171, представляющими собой результат дегидратации дигидродиольной группы на оксометилнафталиновом остатке (ион, m/z 189, в спектре **M4.1**).

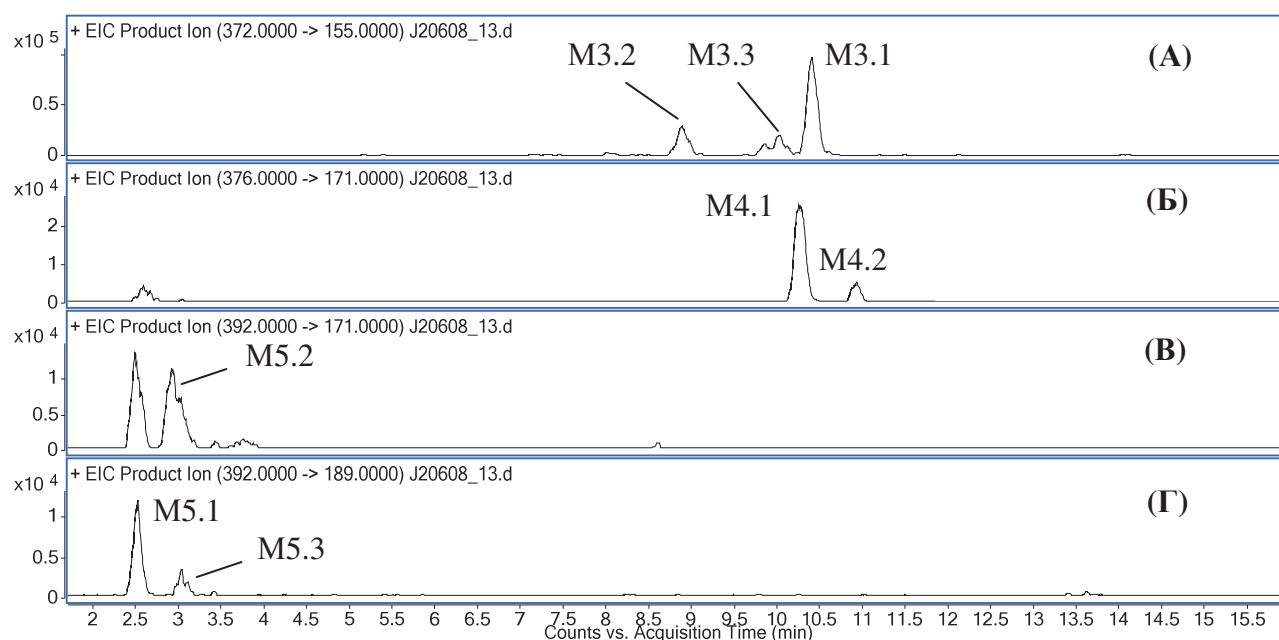


Рис. 4.16. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Гидроксилированные метаболиты с карбонильной группой (А). Метаболиты с дигидродиольной группой на нафталиновом остатке (Б). Гидроксилированные метаболиты с дигидродиольной группой (Г).

Моногидроксилированные метаболиты с дигидродиольной группой на нафталиновом остатке **M5.1-M5.3** (M.w. = 391). Три слабоудерживаемых соединения были выявлены в образцах человеческой мочи после ферментативного деконъюгирования методом ЖХ-МС/МС, Рисунок 4.16. Подобно метаболитам **M4.1** и **M4.2**, эти соединения отсутствовали после проведения кислотного деконъюгирования из-за легкой дегидратации с образованием дигидроксилированных артефактов **M/A4-M/A7**. ЭР спектры всех соединений имеют пик иона,

m/z 171, а спектры **M5.1** и **M5.3** – m/z 189, указывающие на присутствие дигидродиольной группы. В спектре **M5.2** можно также отметить присутствие иона, m/z 230, соответствующего моногидроксилированному оксометилпентилиндольному остатку. Дальнейшую детализацию структур метаболитов **M5.1-M5.3** не проводили из-за их значительного удерживания в условиях ГХ-МС. Основываясь на тезисе о преимущественном метаболическом окислении алифатических (а не ароматических) остатков молекул каннабимиметиков, который будет обоснован далее, можно лишь предположить, что гидроксильная группа – с большей вероятностью – находится на боковой цепи, а не на индольном кольце.

N-дезалкилированный метаболит **M6.1** (M.w. = 271). *N*-дезалкилированные моногидроксилированные метаболиты **M7.1-M7.4** (M.w. = 287). Дезалкилирование JWH-018 (как и других каннабимиметиков, см. далее) характерно для метаболизма крыс. Простейшая дезалкилированная форма **M6.1** (не указана на хроматограммах) была найдена только в моче крыс. Моногидроксилированные дезалкилированные метаболиты **M7.1-M7.3** нашли как в моче крыс, так и людей, Рисунок 4.17. Метаболит **M7.4** присутствовал только в человеческой моче.

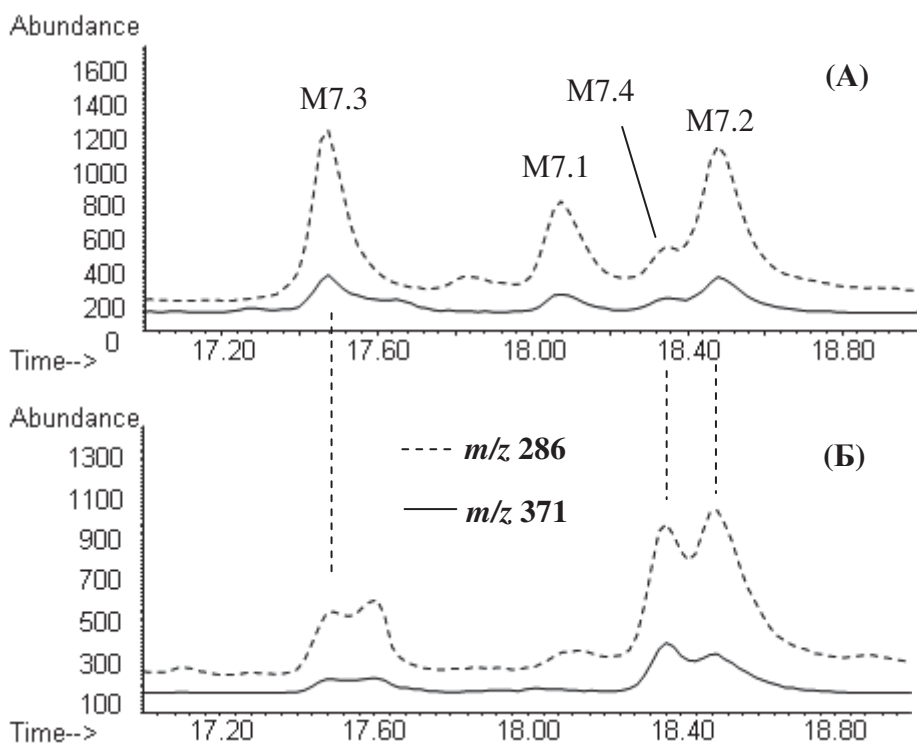


Рис. 4.17. ГХ-МС (ЭИ), дезалкилированные моногидроксилированные метаболиты в образцах мочи человека (А) и крысы (Б). (Колонка EVDX-5ms, режим I, AC, SIM).

Интерпретация масс-спектров дезалкилированных метаболитов не представляет затруднений. Для AC дериватов (ЭИ) характерно элиминирование молекулы кетена (C_2H_2O , $\Delta M=42$, для гидроксильных метаболитов **M7.1-M7.4**) и ацетильного радикала ($C_2H_3O^+$,

$\Delta M=43$) от атома азота с образованием интенсивных пиков ионов, m/z 329 и 286 в спектре. Ион, m/z 160, соответствует гидроксильному оксометилиндольному остатку, ионы, m/z 155 (127) и 144 свидетельствуют о наличии неизмененных нафталинового и индольного циклов, соответственно, Рисунок 4.21. Таким образом, метаболиты **M7.1** и **M7.2** гидроксильны по индольному, а **M7.3** и **M7.4** – по нафталиновому остаткам, соответственно.

Выбор способа дериватизации дезалкилированных метаболитов для их последующего обнаружения методом ГХ-МС осложнен наличием атома азота в индольном цикле. Ацетилирование найдено приемлемым, но не оптимальным способом дериватизации из-за малой химической и температурной стабильности N-ацетилированных индолов. Термолитическое элиминирование кетена от ацетилированного атома азота происходит при ГХ элюировании и сопровождается появлением заметных пиков ГХ артефактов с массой [M-42]. Интенсивность пиков артефактов зависит от истории колонки и, по-видимому, определяется ее каталитической активностью. Присутствие небольших количеств воды в растворах АС дериватов дезалкилированных метаболитов (например, при использовании спиртов в качестве растворителей дериватизированных смесей) приводит к быстрому гидролизу N-ацетатов и выражается в уменьшении интенсивности их пиков при последовательных вводах одного и того же раствора.

Триметилсилилирование индольного атома азота также приемлемо, хотя и не оптимально. ГХ пики TMS дериватов имеют затянутый тыл (см. далее), что затрудняет обнаружение малых количеств дезалкилированных форм.

Метилирование следует признать наиболее надежным способом дериватизации, хотя и этот способ не свободен от недостатков. Главными из них является трудоемкость процедуры метилирования и значительные потери аналитов, связанные с наличием двух стадий экстракции. Важнейшей особенностью метилирования (в том варианте, который был использован нами) можно считать его селективность: кроме индольного атома азота метилируются только ароматические, но не алифатические гидроксильные группы. Эта особенность была использована для детализации структур выявляемых форм. N- и O- Метилаты обладают гидролитической и температурной стабильностью, что делает их чрезвычайно удобными объектами для ГХ-МС. На Рисунке 4.18 приведена хроматограмма образца мочи человека после проведения двухстадийной дериватизации метилированием и триметилсилилированием. Дезалкилированные метаболиты наблюдаются в форме метилатов, моногидроксильные (по боковой цепи) – в форме триметилсиликатов. Для регистрации ионных хроматограмм выбраны m/z молекулярных ионов. Более подробно метильные дериваты нафтоиндолов будут рассмотрены далее.

ЖХ-МС/МС хроматограмма образца мочи человека (ферментативное деконъюгирование) с четырьмя дезалкилированными моногидроксилированными метаболитами приведена на Рисунке 4.19. Как было отмечено ранее, два из четырех метаболитов (M7.3 и M7.4) гидроксилированы по нафталиновому остатку, хотя это направление метаболизма было малохарактерным для метаболитов, сохранивших боковую цепь. Однако, исходя из мягких условий гидролиза, можно заключить, что эти соединения лишь с малой вероятностью могут являться артефактами.

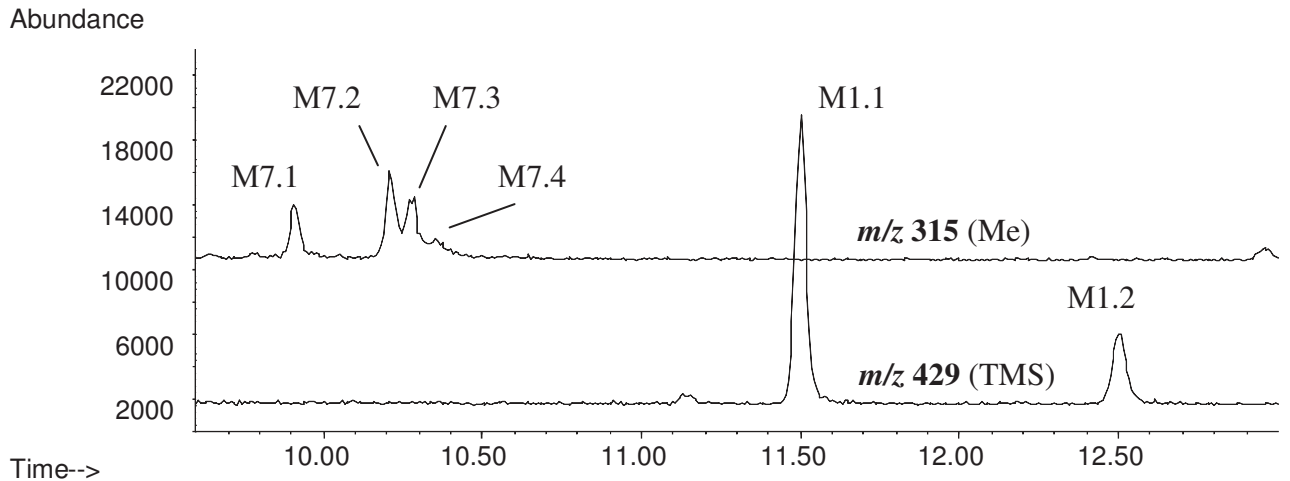


Рис. 4.18. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Моногидроксилированные метаболиты (m/z 429). Дезалкилированные моногидроксилированные метаболиты (m/z 315). (Колонка VF-5ms, режим III, последовательная дериватизация Me и TMS).

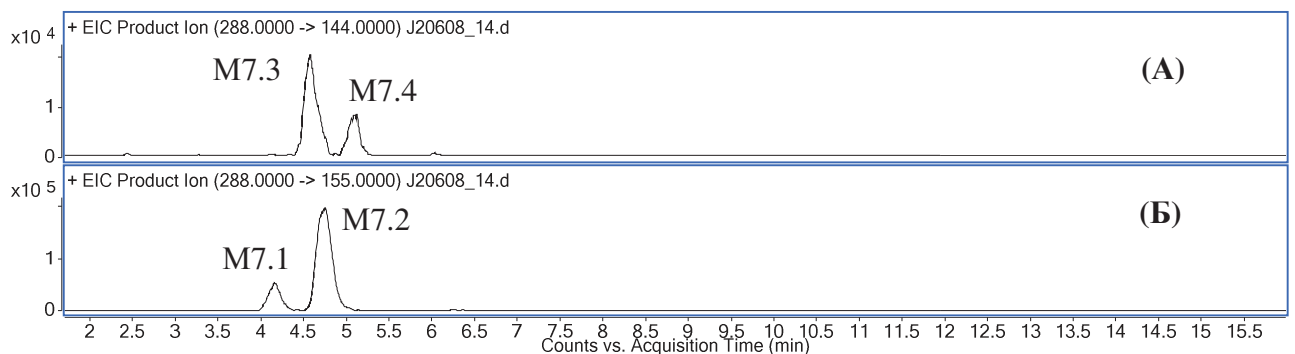


Рис. 4.19. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Дезалкилированные гидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильной группы на нафталиновом (А) и индольном (Б) остатках.

ЭР фрагментация дезалкилированных метаболитов подобна фрагментации остальных форм и, в целом, ЭИ фрагментации АС дериватов. Ионы, m/z 155(127) и 144 свидетельствуют о наличии неизмененных ароматических остатков, а m/z 171 и 160 – об их гидроксировании.

Определение брутто-формул некоторых метаболитов и их фрагментов (ЭР) по спектрам высокого разрешения. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали с помощью хроматографа 1200, подключенного к тандемному времяпролетному масс-спектрометру 6510 (QqTOF) с источником ионизации Chip Cube (Agilent Technologies) в нанопотоковом режиме. Хроматографическое разделение выполняли при помощи HPLC-Chip, включающего обогащающую колонку 40 нл, 5 мкм Zorbax 80SB-C18 и аналитическую колонку 75 мкл × 43мм, 5 мкм Zorbax 80SB-C18. Загрузку и промывку обогащающей колонки проводили водным 0.1 об.% раствором муравьиной кислоты (3 мкл/мин). Объем вводимой пробы 1 мкл. Разделение выполняли в линейном градиентном режиме от А:В = 98:2 до 0:100 в течение 48 мин, затем 2 мин раствором В (А – 0.1 об.% муравьиной кислоты в воде, В – 20 об.% раствора А в ацетонитриле). Расход подвижной фазы 0.4 мкл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме электрораспылительной ионизации при регистрации положительных ионов. Температура осушающего газа азота 325°C, расход 5 л/мин, напряжение на капилляре 2000 В. Диапазон сканирования от 100 до 1000 m/z при скорости 3 скана/сек, регистрировали спектры ионов-предшественников и ионов-продуктов. Возможные варианты брутто-формулы идентифицируемого соединения рассчитывали по точной массе иона-предшественника, и подтверждали спектром и величинами m/z ионов-продуктов (программа MassHunter). Измеренные массы и наиболее вероятные брутто-формулы приведены в Табл. 4.4 [282, 297, 298].

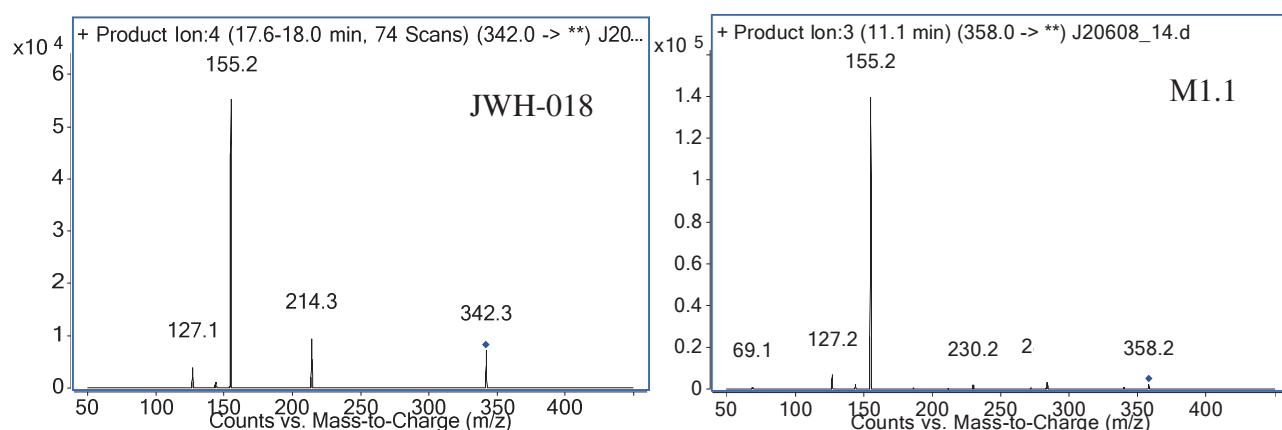


Рис. 4.20. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) JWH-018 и его метаболита.

Количественные и полуколичественные определения. Идентификация метаболитов JWH-018 и появление их в продаже в качестве синтетических продуктов (см. напр.

www.caumannchem.com) позволяет в настоящее время выполнять количественные определения их содержания в биообъектах [299-302] и сточных водах населенных пунктов [303]. Однако, на момент выполнения данной работы, коммерческие образцы метаболитов JWH-018 были еще недоступны. При отсутствии аналитических стандартных образцов мы ограничились частичной разработкой количественного метода пробоподготовки и измерениями динамики экскреции ряда метаболитов и артефактов JWH-018 с мочой.

Таблица 4.4. Точные массы ионов-предшественников и ионов-продуктов метаболитов JWH-018.

Метаболит	Ион-предшественник			Ион-продукт		
	m/z	$\Delta m/z$, <i>ppm</i>	Брутто- формула	m/z	$\Delta m/z$, <i>ppm</i>	Формула
M1.1	358.1795	1.60	$C_{24}H_{24}NO_2^+$	127.0541	0.98	$C_{10}H_7$
	-	-	-	144.0450	-3.89	C_9H_6NO
	-	-	-	155.0490	1.12	$C_{11}H_7O$
M2.1, M2.2	374.1768	-4.49	$C_{24}H_{24}NO_3^+$	-	-	-
M3.1	372.1593	0.33	$C_{24}H_{22}NO_3^+$	127.0530	9.38	$C_{10}H_7$
				155.0482	6.05	$C_{11}H_7O$
M7.1-M7.4	288.1040	-7.41	$C_{19}H_{14}NO_2^+$	-	-	-

Методом повторной экстракции деконъюгированной мочи было показано, что степень экстрагируемости основных метаболитов (**M1.1**, **M1.2**) весьма высока. Относительные площади (ГХ-МС) этих соединений при повторной экстракции не превышали 5% от их площадей в первичном экстракте, и, следовательно, метод ЖЖЭ может быть включен в схему количественной пробоподготовки.

Кроме ЖЖЭ, мы также предлагаем применение ТФЭ по обращенно-фазовому механизму. Для измерения выхода использовали патроны AccuBond C18 (3 мл, 200 мг, Agilent Technologies), заполненные обращенно-фазовым сорбентом и экстракт деконъюгированной мочи с большим содержанием **M1.1** (раствор в этаноле). Перед загрузкой патроны промывали 6 мл ацетонитрила и кондиционировали 6 мл смеси воды и ацетонитрила (8:2 по объему).

К 3 мл человеческой мочи, деконъюгированной кислотным методом и не содержащей метаболитов JWH-018, pH~8, добавляли 3 мл воды, 600 мкл ацетонитрила и 100 мкл экстракта. Смесь пропускали через патрон; сорбент промывали последовательно растворами, содержащими 10 и 40 об.% ацетонитрила в воде (по 3 мл), осушали потоком воздуха в течение 0.5 мин и элюировали 3 мл ацетона. После упаривания элюента сухой остаток ацетилировали и измеряли площадь пика ацетата **M1.1** методом ГХ-МС (режим SIM по ионам, m/z 272, 296 и 399).

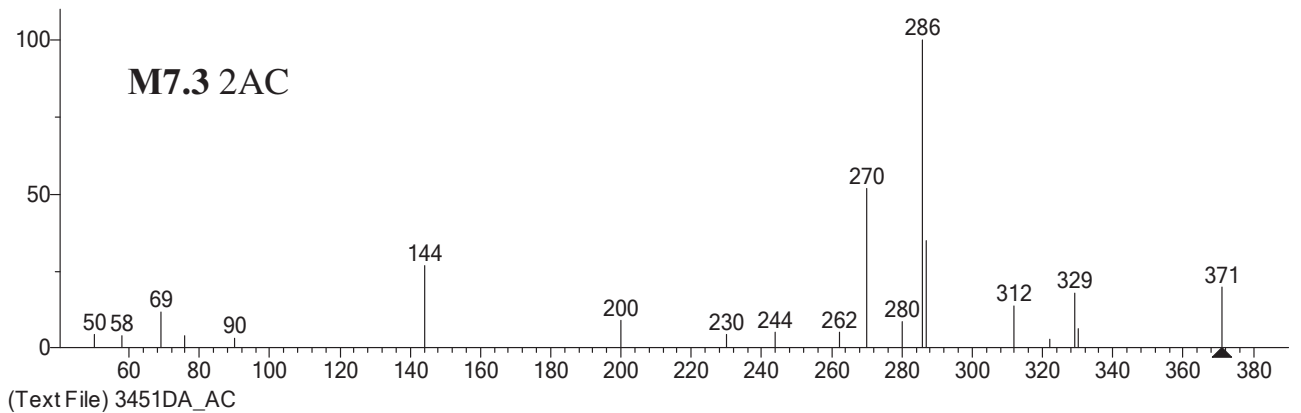
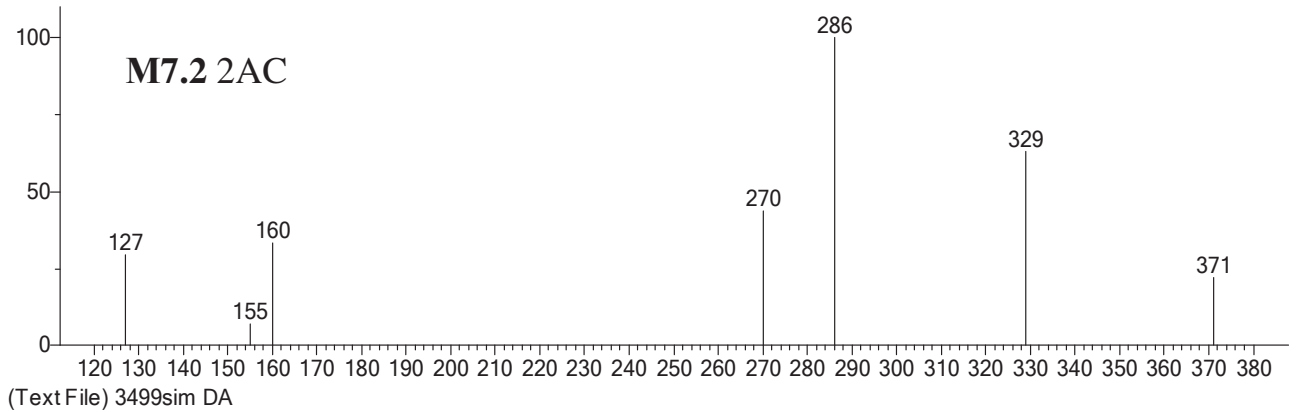
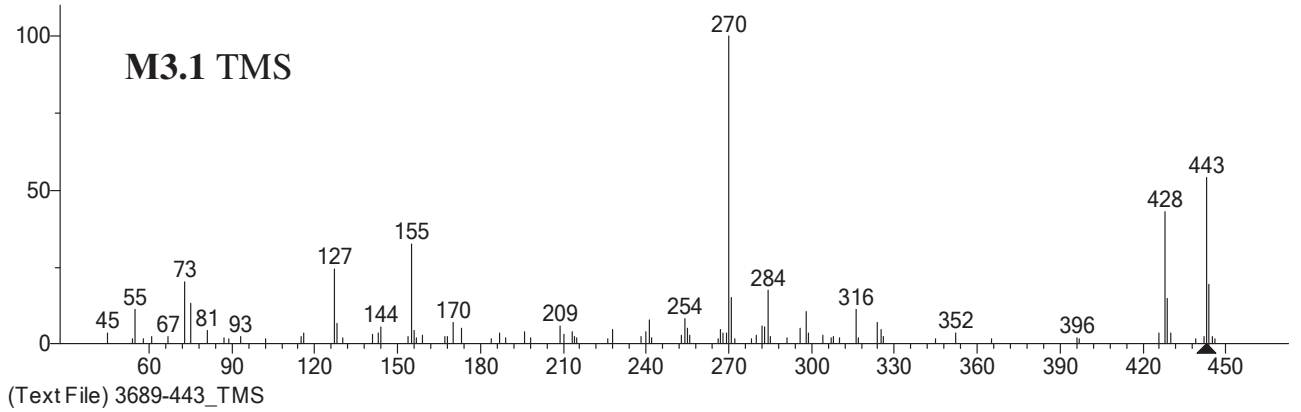
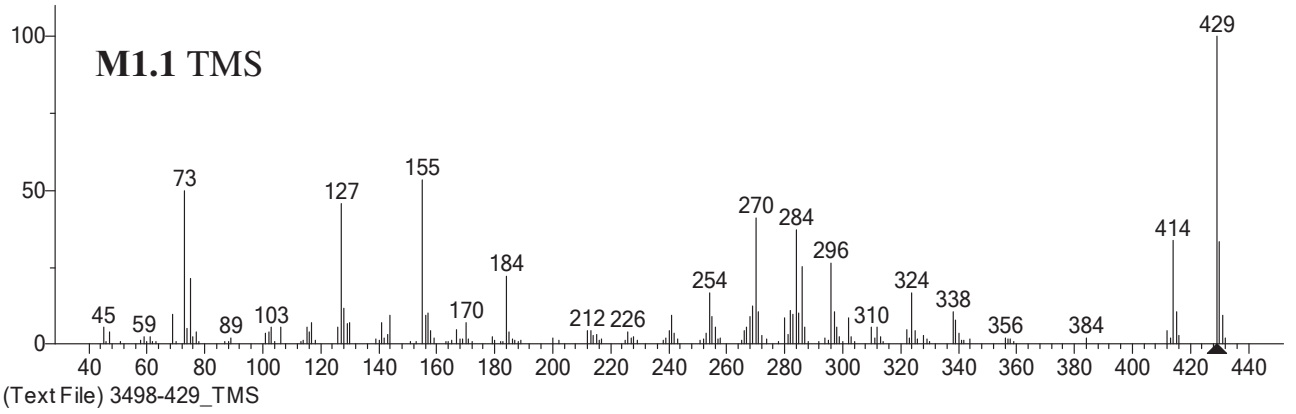


Рис. 4.21. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) метаболитов JWH-018.

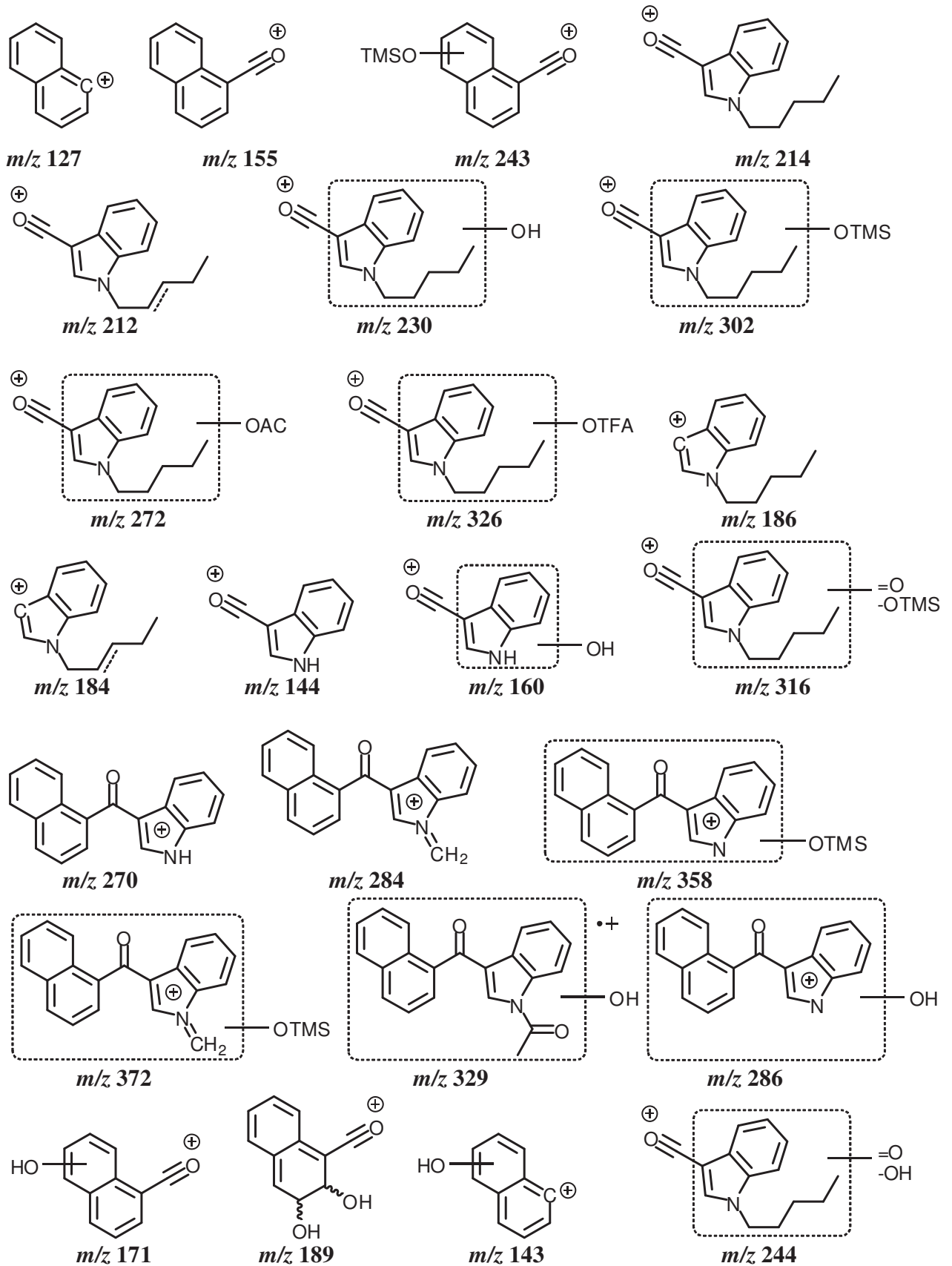


Рис. 4.22. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов и артефактов JWH-018.

Измеренные площади сравнивали с площадями ацетата **M1.1** в исходном экстракте. Выход **M1.1** составил 102% ($n=3$, $S_r, \% = 0.10$). Данный метод пригоден для использования в общей схеме количественной пробоподготовки, но не применялся нами в дальнейшем ввиду высокой стоимости патронов и очевидно малых отличий (для метода ГХ-МС, ТИС) в чистоте растворов, получаемых методами ЖЖЭ или ТФЭ. Последнее замечание легко объяснимо малой селективностью обращенно-фазового механизма ТФЭ в отличие, например, от ионнообменного, позволяющего получать весьма чистые экстракты. К сожалению, почти все продаваемые синтетические каннабимиметики (и большинство их метаболитов фазы I) не проявляют ионогенного характера в допустимой области pH .

Важным вопросом для количественного определения является степень деконъюгирования метаболитов фазы I и возможные потери при проведении этой процедуры. В работах, посвященных исследованию биохимических особенностей JWH-018 и его метаболитов фаз I и II, было показано, что окисление JWH-018, по-видимому, происходит с участием цитохрома P450, и сопровождается образованием конъюгатов, представляющих собой простые эфиры глюкуроновой кислоты для моногидроксилированных метаболитов и соответствующий сложный эфир – для карбоксилированного метаболита фазы I [304-306]. Нами были выполнены сравнительные определения содержания метаболитов фазы I в образцах человеческой мочи при наличии или отсутствии стадии деконъюгирования. Было найдено, что относительное содержание этих соединений невелико. Согласно примерной оценке, оно составляет менее 5% от содержания конъюгированных форм.

Ввиду аналитических затруднений, связанных, в частности, с отсутствием надежных стандартных образцов конъюгатов, пока не представляется возможным определять выходы процессов деконъюгирования. Тем не менее, косвенным подтверждением надежности этих процессов можно считать общее сходство метаболического состава, получаемого при варьировании способа деконъюгирования – при учете возможного образования артефактов.

Динамика экскреции с мочой рассмотрена на примере двух разнородных метаболитов (**M1.1** и **M3.1**), содержание которых в моче обычно достаточно для проведения подобных оценок. Образцы были деконъюгированы кислотным методом. Метаболиты JWH-018 экстрагировали методом ЖЖЭ и определяли в форме TMS дериватов методом ГХ-МС с внутренним стандартом папаверином, изначально отсутствующем во всех образцах. Раствор папаверина (50 мкл, 130 мкг/мл в этаноле) добавляли к деконъюгированной моче перед ЖЖЭ. В качестве аналитического отклика использовали площади пиков соответствующих соединений при регистрации ионных хроматограмм по m/z их молекулярных ионов (режим SIM). Значения относительных площадей пиков метаболитов на диаграммах выведения (Рисунок 4.23) приведены в условных единицах.

Первые порции мочи, (собранные через 4-6 часов после приема) характеризуются наибольшей концентрацией всех метаболитов JWH-018. Столь быстрое выведение вполне согласуется с динамикой содержания неизмененного JWH-018 в крови [265], а также с субъективными ощущениями лиц, принимавших данное соединение, как посредством курения, так и перорально. Несмотря на резкое снижение концентрации основного метаболита **M1.1** в моче в первые часы после приема (примерно в 5-10 раз в течение начального 3-6-часового периода), дальнейший спад концентрации замедляется. Метаболит **M1.1** с высокой степенью достоверности может быть обнаружен в моче методом ГХ-МС, по крайней мере, в течение двух суток после приема JWH-018

Важным дополнением к приведенным диаграммам следует считать сделанное наблюдение об общем подобии метаболических профилей, получаемых при пероральном и ингаляционном способах введения. Это относится по крайней мере, к трем метаболитам (**M1.1**, **M1.2** и **M3.1**), характеризующихся наиболее интенсивными хроматографическими сигналами.

Определенный интерес может представлять сравнительная оценка концентрации метаболитов в образцах мочи лиц, доставленных в наркологические диспансеры вследствие неадекватности поведения.

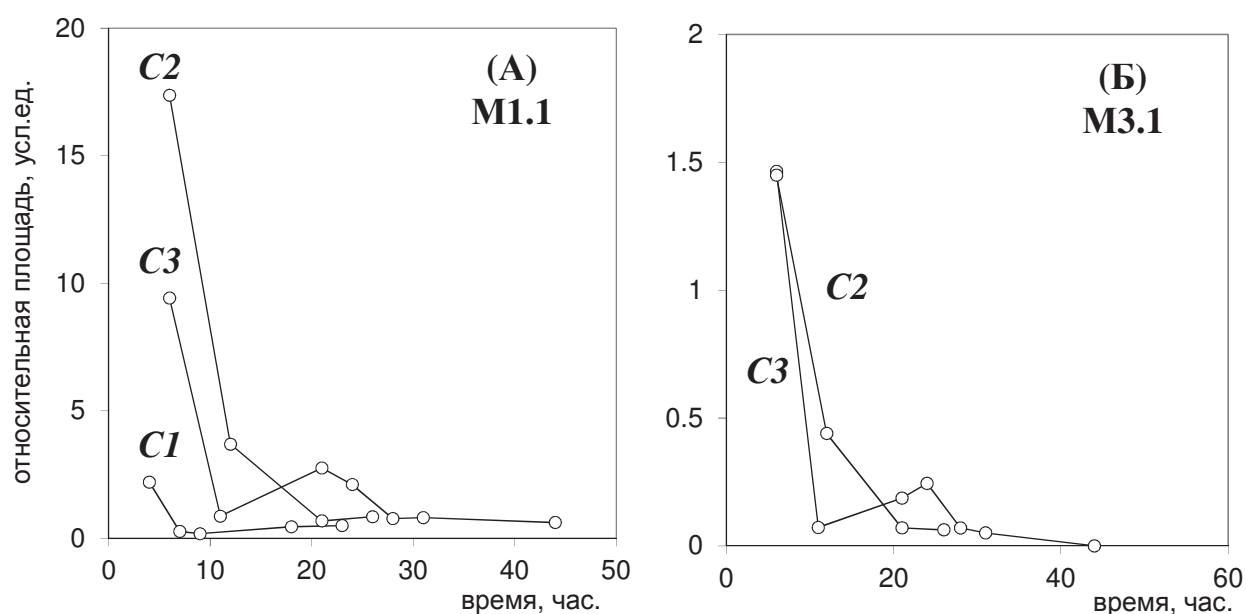


Рис. 4.23. Диаграммы экскреции метаболитов **M1.1** (А) и **M3.1** (Б) с мочой (случаи *C2* и *C3* после перорального приема JWH-018, случай *C1* – после курения). Метод ГХ-МС, режим II, кислотный гидролиз, TMS.

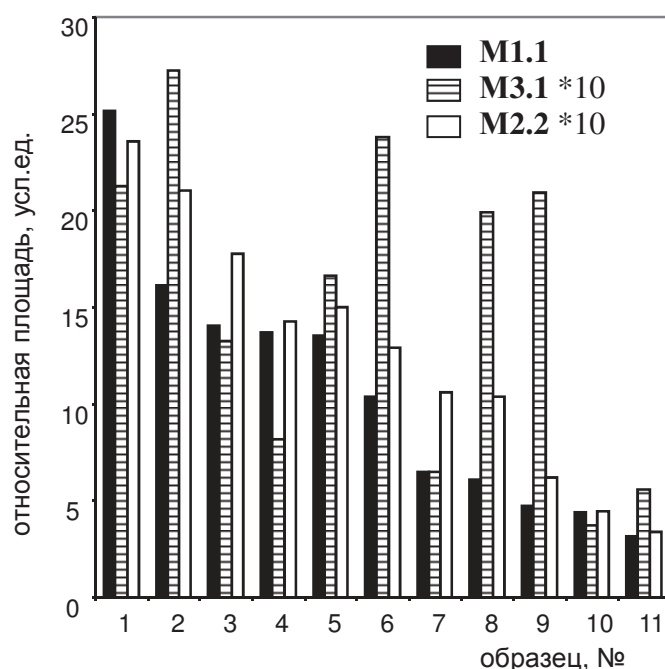
На диаграмме, Рисунок 4.24, приведены относительные площади хроматографических пиков (в условных единицах) TMS дериватов трех разнородных метаболитов:

могидроксилированного **M1.1** карбоксилированного **M3.1** дигидроксилированного **M2.2** в 11 образцах мочи.

Образцы расположены в порядке убывания отклика **M1.1**. Относительные площади минорных **M3.1** и **M2.2** увеличены в 10 раз. Наибольшая концентрация **M1.1** в данной выборке примерно в восемь раз выше наименьшей, что можно объяснить как разным временем, прошедшим между приемом и отбором мочи, так и разными количествами JWH-018, поступившими в организм.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [32, 282, 284, 297, 298, 307-311].

Рис. 4.24. Относительные площади пиков **M1.1**, **M3.1** и **M2.2** в образцах мочи лиц, доставленных в наркологический диспансер (ГХ-МС, режим II, кислотный гидролиз, TMS).



4.4. Выявление метаболитов JWH-073

Спустя небольшое время после обнаружения JWH-018, в продуктах, продаваемых на рынке психоактивных средств, был найден его N-бутильный гомолог – JWH-073, получивший наибольшее распространение после введения ограничений на оборот самого JWH-018 [189, 238-240]. Данное соединение характеризуется близкой к JWH-018 константой аффинности к рецептору CB1 ($K_i \sim 8.9$ нМ) [163, 312, 313], является агонистом CB1 и CB2 [314, 315], и, следовательно, должно формировать сходные психофизиологические эффекты.

В целом, при исследования метаболического мочевого профиля JWH-073 выполняли ту же схему, что и для JWH-018. Используемые биоматериалы были:

- образцы мочи (2) крыс, получивших JWH-073;

- образцы мочи (32) персон, доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями, а также свидетельствующих об употреблении смесей, в составе которых был обнаружен JWH-073.

Для испытаний на крысах применяли субстанцию с высоким содержанием JWH-073, полученную следующим способом. Около 1.6 г. гранулированного твердого материала бурого-коричневого цвета, содержащего JWH-073, суспендировали в 50 мл воды при обработке ультразвуком. Отмечена частичная растворимость материала. К смеси добавили 50 мл ацетонитрила и экстрагировали трижды 100 мл хлороформа. Объединенные экстракты фильтровали через бумажный фильтр («синяя лента») и упаривали досуха в потоке азота при температуре не выше 45°C. Окончательную сушку выполняли вакуумированием. Качественный состав полученного темно-бурого порошка (317 мг) анализировали методами ГХ-МС и ВЭЖХ-ДМД (при детектировании на 216 и 302 нм). Единственной найденной примесью был α -нафтиламид (около 10%, метод нормировки по площадям, ГХ-МС, ТИС).

Испытания на крысах. Субстанцию JWH-073 вводили двум крысам (аутбредные крысы-самцы Wistar весом 400-500 г) интрагастрально и интраперитонеально в виде суспензии в 1% водном растворе TWEEN 80. Мочу собирали в течение суток при свободном доступе животных к воде. Не было отмечено никаких фармакологических эффектов действия введенного препарата.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, анализировали так же, как и для случая JWH-018. Оба образца содержали значительные (согласно интенсивности пиков) количества метаболитов JWH-018.

Случаи, использованные для измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

C1 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 51 ч. Малое время сбора обусловлено низким содержанием метаболитов.

C2 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 49 час. Малое время сбора обусловлено низким содержанием метаболитов.

C3 – курение. Мочу собирали в течение 165 ч (около 7 сут).

Подготовка проб и условия анализа. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных, АС и TFA образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS образцов. Для подтверждения

положения гидроксильных групп гидролизованные образцы мочи дериватизировали последовательно метилированием и триметилсилилированием.

Всего охарактеризовали 37 соединений, из которых 11 являлись артефактами пробоподготовки и один – артефакт ГХ. Структурные формулы соединений приведены на Рисунке 4.25, индексы удерживания дериватов – в Таблицах 4.5-4.7. Ни в одном из образцов не нашли нативный JWH-073. Образцы мочи людей деконъюгировали кислотным или ферментативным методами (Приложение 1), экстрагировали и анализировали методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Образцы мочи крыс деконъюгировали только кислотным методом и анализировали только ГХ-МС. Исходный JWH-073 не был обнаружен ни в одном из образцов.

Таблица 4.5. Индексы удерживания гидроксильрованных метаболитов и артефактов JWH-073 для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах. Обнаружение метаболитов в моче человека (Ч.) и крысы (К.).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	EVDX-5ms		VF-5ms		Ч./К.	Фр. №
				Реж. I	Реж. III	Реж. I	Реж. III		
1	JWH-073	C ₂₃ H ₂₁ NO	327	3180	3234	3221	3259	-	-
2	M1.1 TMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ Si	415	3367	3400	3389	3425	+/+	4
3	M1.2 TMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ Si	415	3467	3500	3489	3525	+/-	4
4	M1.3 TMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ Si	415	3426	3451	3445	3475	+/+	4
5	M/A2 TMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ Si	415	3454	3484	3474	3510	+/-	5
6	M/A3 TMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ Si	415	3457	3487	3478	3513	+/-	5
7	M/A4 TMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ Si	415	3378	3403	3399	3428	+/-	5
8	M/A5 TMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ Si	415	3480	3513	3500	3530	+/+	5
9	M2.1 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3681	3702	3700	3724	+/-	3
10	M2.2 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3585	3609	3603	3628	+/-	3, 4
11	M2.3 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3633	3658	3650	3679	+/+	3, 4
12	M2.4 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3531	3553	3548	3575	+/+	4
13	M/A6 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3613	3639	3630	3661	+/+	3, 4
14	M/A7 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3618	3645	3635	3666	+/-	4
15	M/A8 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3548	3577	3555	3586	-/+	-
16	M/A9 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3688	3709	3699	3720	-/+	-
17	M/A10 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3722	3748	3730	3759	-/+	-
18	M/A11 2TMS	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	503	3742	3769	3749	3778	-/+	-
19	M3.1 3TMS	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄ Si ₃	591	3774	3795	3788	3812	+/-	2, 3
20	M/A12 3TMS	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄ Si ₃	591	3759	3780	3773	3800	+/-	2, 3

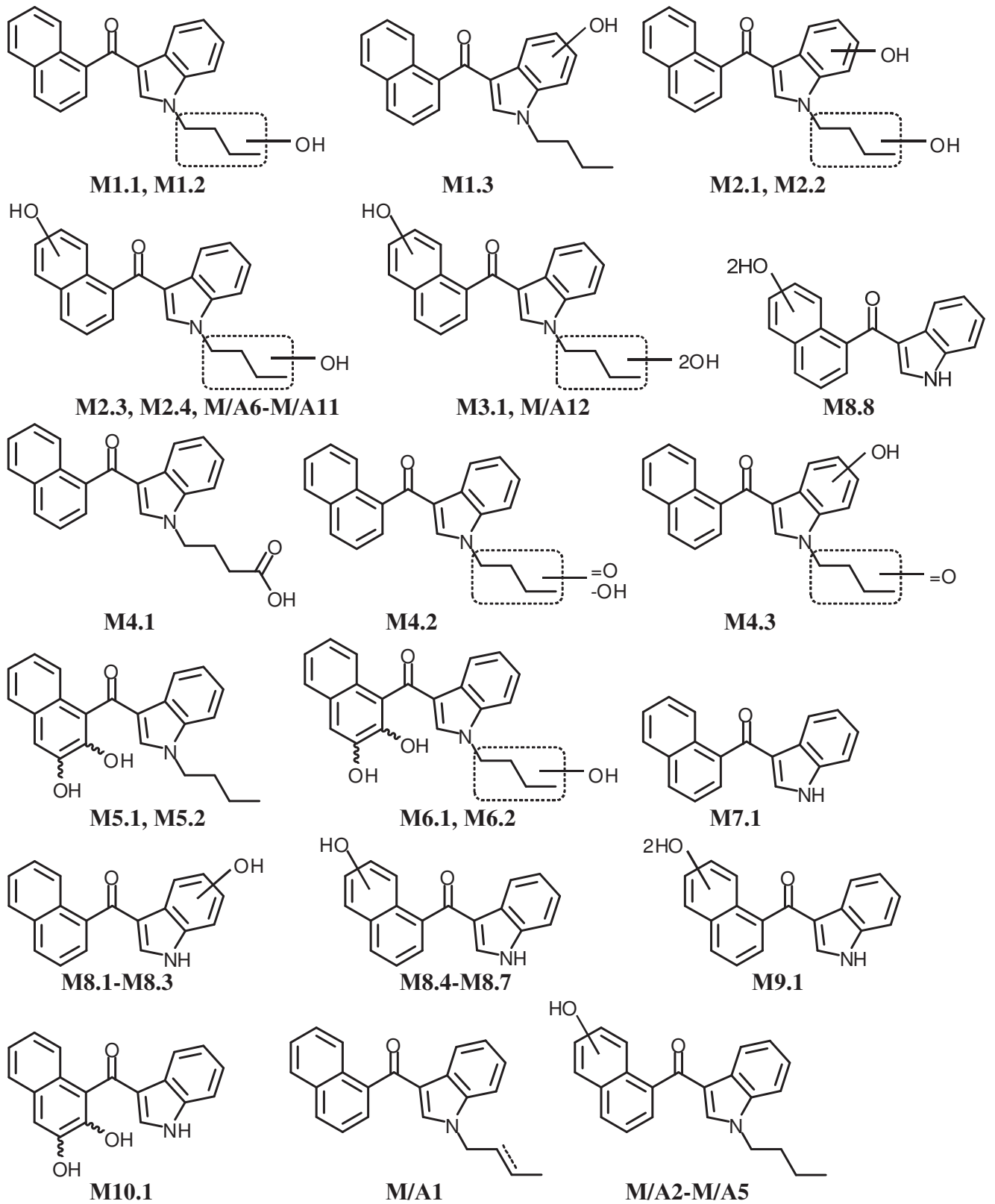


Рис. 4.25. Структуры метаболитов и артефактов JWH-073.

Концентрирование метаболитов JWH-073 проводили методом полупрепаративной ВЭЖХ-ДМД (Приложение 1). 30 мл мочи обработали по схеме кислотного гидролиза. Сухой остаток растворили в элюенте (вода-ацетонитрил, 3:7 об.) и разделили на 8 фракций при

изократическом элюировании с очистной стадией (8.5 мин, ацетонитрил в течение 1 мин). Скорость потока была 1 мл/мин, вводимый объем 30 мкл. Времена отбора фракций, мин: (1) 1.2-1.5, (2) 1.5-1.8, (3) 1.8-2.2, (4) 2.2-4.2, (5) 4.2-6.2, (6) 6.2-8.2, (7) 8.2-10.2, (8) 10.2-12.0. Мертвый объем системы оценивали по удерживанию урацила (1.25 мин); удерживание нативного JWH-073 составляло 9.59 мин. Каждую фракцию упаривали в вакуумном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), до трети исходного объема, разводили водой в 2 раза и экстрагировали этилацетатом при соотношении объемов фаз 1:1. Отделенные органические фазы упаривали досуха и анализировали методом ГХ-МС.

Моногидроксилированные метаболиты **M1.1-M1.3** и артефакты **M/A2-M/A5** (M.w. = 343). Из трех моногидроксилированных метаболитов два соединения (**M1.1** и **M1.2**), которым соответствовали наиболее интенсивные хроматографические пики (Рисунки 4.26 и 4.27) имели гидроксильные группы на боковой N-бутильной цепи. У метаболита **M1.3** гидроксильная группа находится на индольном кольце.

Таблица 4.6. Индексы удерживания дезалкилированных метаболитов JWH-073 (метильные дериваты) для слабополярной и среднеполярной фаз в трех температурных режимах. Обнаружение метаболитов в моче человека (Ч.) и крысы (К.).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺⁺	HP-5ms			DB-17ms			Ч./К
				Реж. I	Реж. II	Реж. III	Реж. I	Реж. II	Реж. III	
1	M7.1 Me	C ₂₀ H ₁₅ NO	285	3075	3033	3101	3859	3795	3928	-/+
2	M8.1 2Me	C ₂₁ H ₁₇ NO ₂	315	3292	3249	3323	4130	4064	4199	+/-
3	M8.2 2Me	C ₂₁ H ₁₇ NO ₂	315	3332	3293	3364	4168	4104	4236	+/+
4	M8.3 2Me	C ₂₁ H ₁₇ NO ₂	315	3276	3232	3304	4073	4008	4141	-/+
5	M8.4 2Me	C ₂₁ H ₁₇ NO ₂	315	3343	3304	3375	4195	4132	4262	+/+
6	M8.5 2Me	C ₂₁ H ₁₇ NO ₂	315	3351	3311	3383	4206	4145	4272	+/+
7	M8.6 2Me	C ₂₁ H ₁₇ NO ₂	315	3304	3263	3328	4133	4070	4202	-/+
8	M8.7 2Me	C ₂₁ H ₁₇ NO ₂	315	3361	3320	3394	4222	4166	4294	-/+
9	M8.8 3Me	C ₂₂ H ₁₉ NO ₃	345	3465	3424	3496	4338	4332	4412	-/+

Таблица 4.7. Индексы удерживания дезалкилированных метаболитов JWH-073, характерных для человека (триметилсилильные дериваты).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	VF-5ms	
				Реж. I	Реж. III
1	M8.1 2TMS	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂ Si ₂	431	3238	3263
2	M8.2 2TMS	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂ Si ₂	431	3277	3303
3	M8.4 2TMS	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂ Si ₂	431	3304	3331
4	M8.5 2TMS	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂ Si ₂	431	3324	3350

ЭИ и ЭР фрагментация моногидроксилированных метаболитов JWH-073 подобна аналогичным формам JWH-018 (Рисунки 4.33-4.35). Признаком неизмененного нафталинового

цикла является наличие ионов, m/z 127 и 155 (пик первого малоинтенсивен при ЭР). При ЭИ фрагментация боковой цепи также приводит к появлению m/z 270 и 284, свидетельствующих о наличии неизмененного ароматического остатка (и α -метиленовой группы боковой цепи). Подобно случаю JWH-018, метаболит с гидроксильной группой на индольном цикле также характеризуется большим удерживанием в условиях ЖХ, что объясняется наличием неокисленной боковой цепи, вносящей значительный вклад в удерживание.

Исходя из термоллиза TFA дериватов в условиях ГХ, можно с уверенностью отметить, что гидроксильная группа у метаболита **M1.2** расположена на (ω)-атоме углерода боковой цепи, а у метаболита **M1.1** – в положениях C2 или C3. Порядок выхода этих метаболитов в условиях ГХ и ЖХ соответствует подобным метаболитам JWH-018. Несколько необычный ЭИ спектр TMS деривата **M1.1** (наличие интенсивного пика иона-радикала m/z 285, $C_{20}H_{15}NO^+$) объясняется особенностями фрагментации и соответствует спектру свободного 3-гидроксипропилового производного JWH-073, опубликованного впоследствии фирмой-производителем аналитических стандартов – метаболитов каннабимиметиков Cayman Chemicals (www.caymanchem.com).

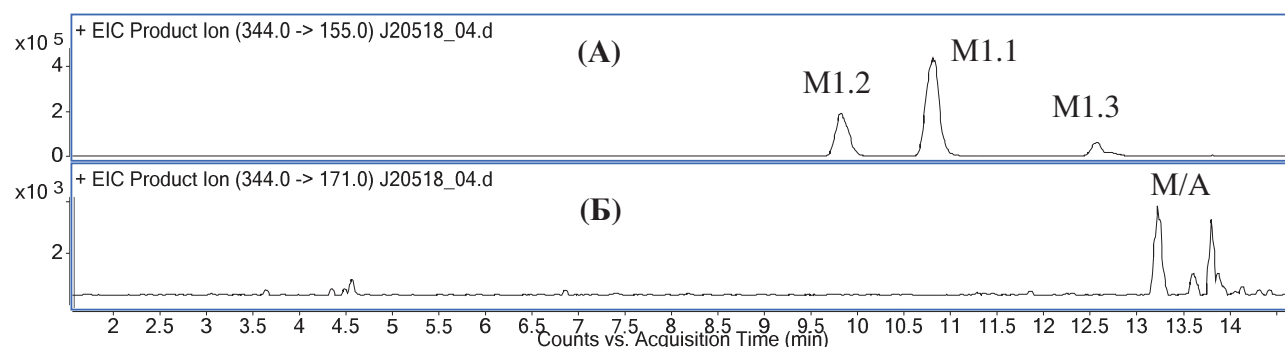


Рис. 4.26. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Моногидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильных групп на боковой цепи и индольном кольце (А). Возможные артефакты, имеющие гидроксильную группу на нафталиновом остатке (Б).

Четыре соединения (**M/A2-M/A5**), имеющие гидроксильную группу на нафталиновом остатке были выявлены в образцах мочи только после проведения кислотного деконъюгирования и отсутствовали в образцах, деконъюгированных ферментативным методом. Эти соединения следует признать артефактами предподготовки, образовавшимися при дегидратации дигидродиольных метаболитов (группа **M5**, см. далее). Положение гидроксильной группы у **M/A2-M/A5** однозначно определяется наличием пиков ионов, m/z 144 и 372 (характерных и для производных JWH-018), а также 200, соответствующего оксометилбутилиндольному фрагменту (Рисунки 4.34 и 4.35). По крайней мере, два соединения

с гидроксильной группой на нафталиновом остатке были выявлены методом ЖХ-МС/МС после ферментативного деконъюгирования, Рисунок 4.26. Но, поскольку их содержание весьма невелико, а возможный механизм образования очевиден, они также отнесены к артефактам пробоподготовки, полученным в результате случайной дегидратации.

Дигидроксилированные метаболиты **M2.1-M2.4** и артефакты **M/A6-M/A11** (M.w. = 359). Четыре дигидроксилированных соединения (**M2.1-M2.4**) с одной гидроксильной группой на нафталиновом остатке были найдены как в продуктах кислотного, так и ферментативного гидролиза, и, следовательно, могут считаться метаболитами (Рисунки 4.27 и 4.28).

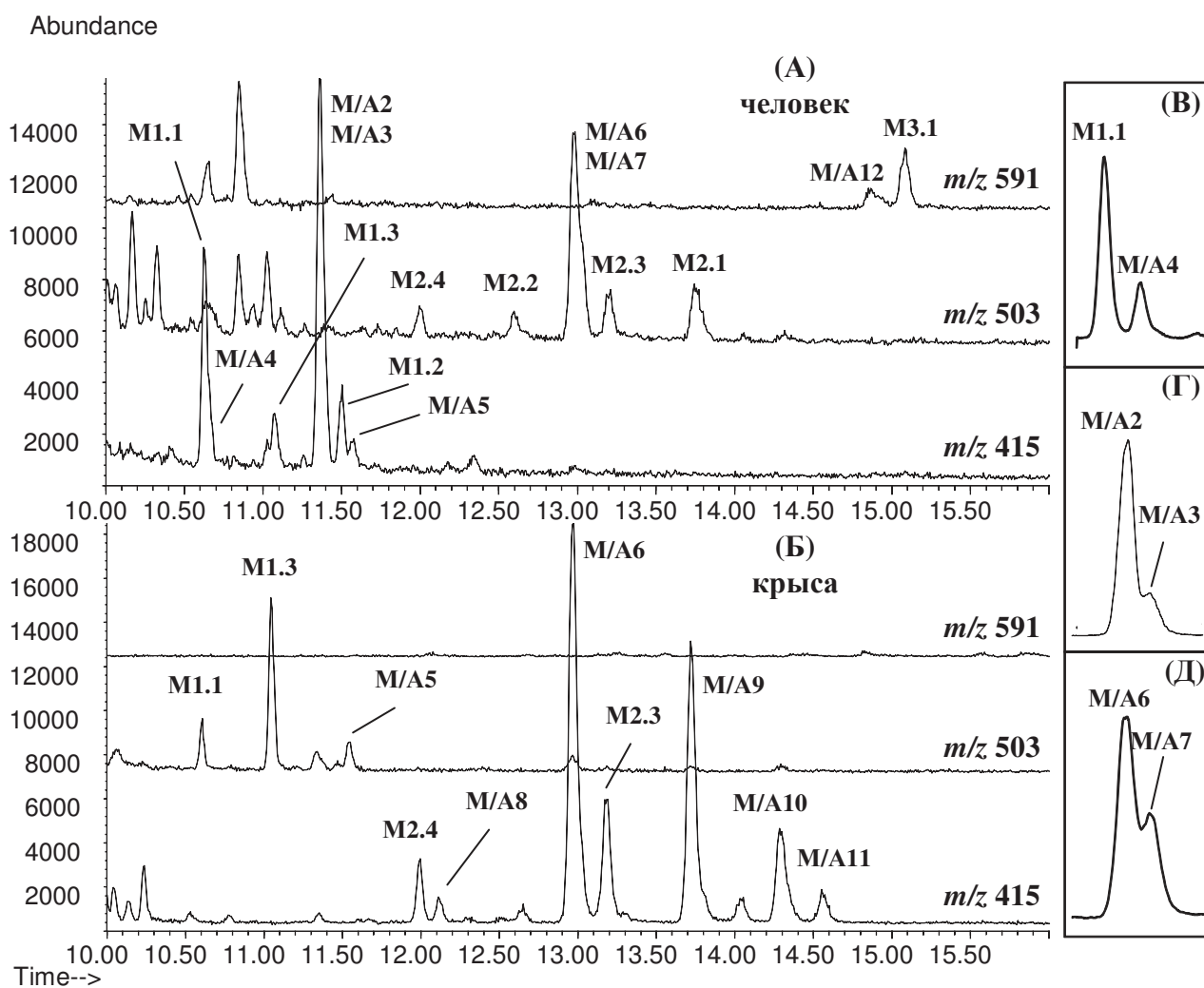


Рис. 4.27. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека (А) и крысы (Б), кислотный гидролиз, TMS, режим III. Разделение «критических пар» аналитов, режим I (В).

В данном случае детального сопоставления между соединениями, наблюдаемыми различными хроматографическими методами, не проводили, хотя согласно составу фракций (Таблица 4.5) можно предположить, что пики с меньшим ЖХ удерживанием соответствуют

метаболитам **M2.1** и **M2.3** (Рисунок 4.28, (А) и (Б), соответственно). В ЭИ спектрах **M2.1** и **M2.2** присутствуют пики ионов, m/z 127 и 155, свидетельствующие о наличии неизмененного нафталинового остатка, а в спектрах **M2.3** и **M2.4** эти пики отсутствуют, но имеется пик иона, m/z 243 – гидроксированный оксометилнафталиновый фрагмент. Все ЭИ спектры дигидроксилированных метаболитов содержат пик интенсивного ион-радикала, m/z 373 (у **M2.1** – ион, m/z 372) и иона, m/z 358, указывающих на гидроксирование ароматического остатка. ЭР спектры дигидроксилированных метаболитов зарегистрированы в максимумах хроматографических полос и находятся в соответствии с предложенными структурами.

Артефакты **M/A6-M/A11**, образующиеся при кислотном гидролизе мочевых образцов выявляли только методом ГХ-МС; их пики весьма интенсивны, что делает эти соединения удобными для обнаружения, несмотря на их природу. Поскольку артефакты являются изомерами дигидроксилированных метаболитов по положению гидроксильных групп в пределах остатков, то и их ЭИ спектры имеют те же особенности. Следует отметить, что одна из гидроксильных групп у всех выявленных соединений всегда расположена на боковой цепи, а следовательно, гидроксирование алифатического остатка является предпочтительным.

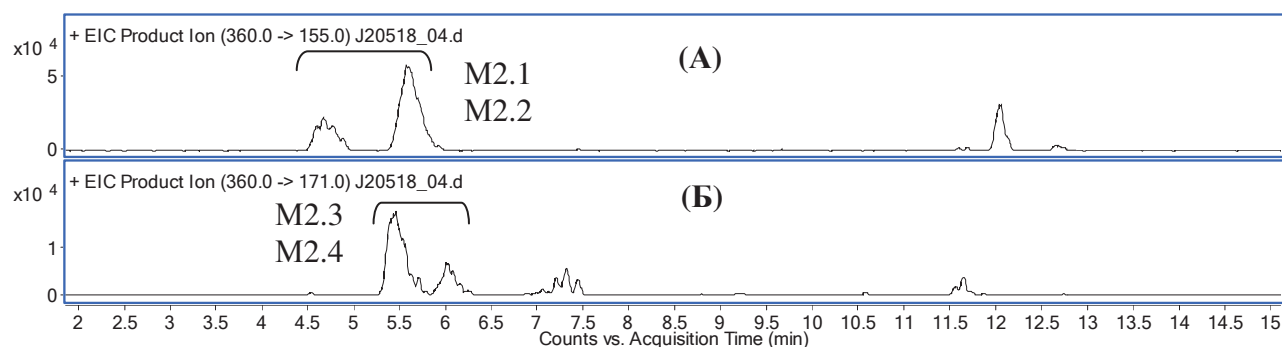


Рис. 4.28. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Дигидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильных групп на боковой цепи и индольном цикле (А) и на боковой цепи и нафталиновом остатке (Б).

Рассматривая различия метаболических профилей JWH-073 для человека и для крысы, важно отметить преобладание кратно окисленных соединений для крыс. Как уже отмечалось для случая JWH-018, метаболизм нафтоиндольных производных для крыс характеризуется большей глубиной – большей степенью модификации исходной структуры – нежели для человека.

Тригидроксилированный метаболит **M3.1** и артефакт **M/A12** (M.w. = 375). Один тригидроксилированный метаболит был найден в образцах мочи человека, Рисунки 4.27 и 4.29. Его ЭИ и ЭР спектры содержат все перечисленные выше признаки моногидроксилирования нафталинового остатка (ион, m/z 143 представляет моногидроксилированный нафталиновый

остаток), хотя положение двух других гидроксильных групп является не очевидным. Однако, при метилировании и последующем триметилсилилировании образца мочи содержащего **M3.1** был найден монометилированный и ди-триметилсилилированный продукт, что позволяет сделать заключение о дигидроксилировании боковой цепи.

ЭИ спектр артефакта **M/A12** подобен спектру **M3.1**, и при двукратной дериватизации образуется подобный же монометильный дериват.

Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи M4.1-M4.3 (M.w. = 357). Все эти метаболиты были выявлены только методом ЖХ-МС/МС; в их ЭР спектрах присутствует интенсивный пик иона, m/z 155. Малоинтенсивный пик иона, m/z 230 (**M4.1** и **M4.3**) свидетельствует о наличии гидроксильной и карбонильной групп на оксометилбутилиндольном остатке. Основываясь на ЖХ удерживании **M4.1** (оно немного ниже, чем у моногидроксилированного **M1.2**, и этот порядок отмечен нами для многих каннабимиметиков, см. далее), можно предположить, что данный метаболит представляет собой карбоксилированное производное JWH-073. Такое предположение подтверждается рядом публикаций [289, 295, 296, 299, 301]. В спектре **M4.2** присутствует пик иона, m/z 284, указывающий на локализацию обоих атомов кислорода на боковой цепи. А в спектре **M4.4** имеется интенсивный пик иона, m/z 286, что (вместе с ионом, m/z 155) позволяет предположить наличие одного кислородного атома на индольном остатке.

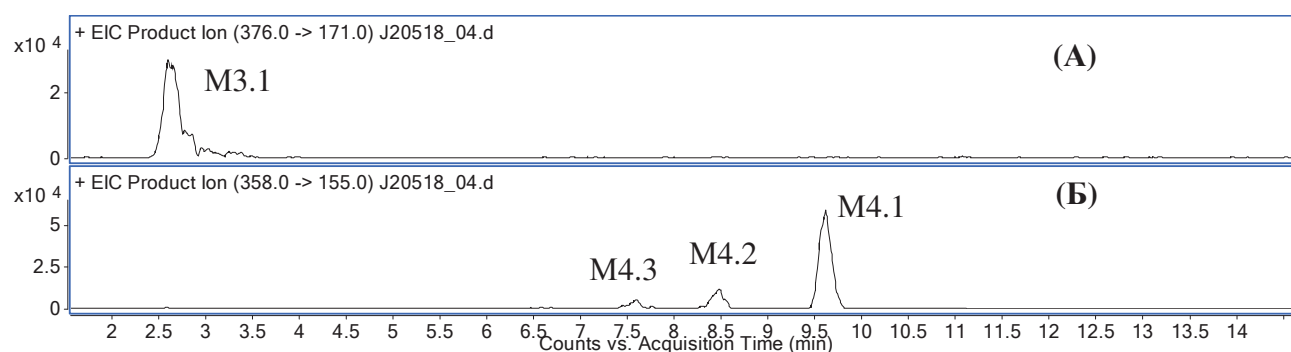


Рис. 4.29. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Тригидроксилированный метаболит с расположением гидроксильных групп на боковой цепи и нафталиновом остатке (А). Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи (Б).

Дигидродиольные метаболиты M5.1 и M5.2 (M.w. = 361). *Дигидродиольные моногидроксилированные метаболиты M6.1 и M6.2* (M.w. = 377). Эти метаболиты также были выявлены только методом ЖХ-МС/МС (Рисунок 4.30) и только после ферментативного деконъюгирования из-за легкой дегидратации дигидродиола, протекающей как при нагревании в присутствии соляной кислоты, так и в путях масс-спектрометра.

В ЭР спектрах всех дигидродиольных метаболитов присутствуют пики ионов: m/z 189, отвечающий гидроксильному и гидратированному оксометилнафталиновому фрагменту и m/z 171, продукт его дегидратации в масс-спектрометре. Ион, m/z 200, соответствует неизмененному оксометилбутилиндольному фрагменту.

Мало удерживающиеся дигидродиольные метаболиты **M6.1** и **M6.2** имеют дополнительную гидроксильную группу на боковой цепи, о чем свидетельствует наличие пиков ионов, m/z 216 – моногидроксильное оксометилиндольное фрагмента и m/z 300 – моногидроксильное ароматического остатка; последний ион образуется после дегидратации дегидродиола.

Судя по интенсивности ЖХ пиков дигидродиольных форм и ГХ пиков их дегидратированных артефактов, данный метаболический путь является одним из основных. Можно также отметить обилие этих соединений в моче крыс. Артефакты дигидродиольных метаболитов удобны в качестве биологических маркеров JWH-073 при проведении качественного анализа в его дешевом варианте – с кислотным гидролизом образцов мочи и последующим ГХ-МС обнаружением. Тем не менее – к сожалению – практической ценности в качестве объектов количественного определения дигидродиольные метаболиты не представляют из-за малой стабильности, хотя могут использоваться как маркеры при качественном подтверждающем анализе методом ЖХ-МС/МС.

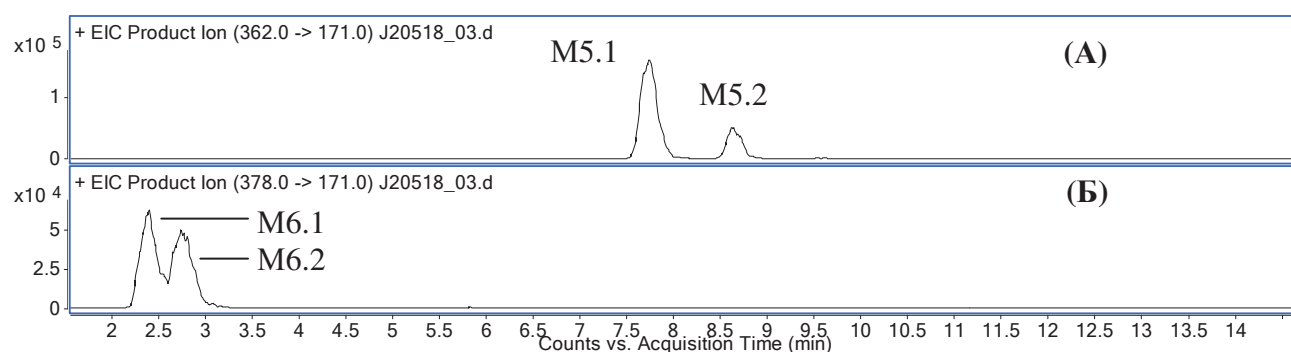


Рис. 4.30. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Дигидродиольные метаболиты (А). Дигидродиольные метаболиты с гидроксильной группой на боковой цепи (Б).

Дезалкилированный метаболит M7.1 (M.w. = 287). Дезалкилированные моногидроксильные метаболиты M8.1-M8.7 (M.w. = 303). Дезалкилированный дигидроксильный метаболит M9.1 (M.w. = 319). Как и для случая JWH-018, простейший дезалкилированный метаболит был найден только в моче крыс. Это соединение наблюдали только методом ГХ-МС после метилирования. Ион, m/z 158 в его ЭИ спектре соответствует N-

метилованному оксометилиндольному фрагменту, причем ион, m/z 268, по-видимому, следует интерпретировать тетрациклической структурой (Рисунок 4.35).

Гидроксилированные дезалкилированные метаболиты в моче человека (**M8.1**, **M8.2**, **M8.4** и **M8.5**) наблюдали методом ЖХ-МС/МС после ферментативного деконъюгирования, Рисунок 4.31. В данном случае сопоставления между соединениями, наблюдаемыми методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС не проводили. Оба пика на хроматограмме, Рисунок 4.31А имеют подобные ЭР спектры, в которых основными являются пики ионов, m/z 155 (неизменный нафталиновый остаток) и m/z 160, указывающий на моногидроксилирование индольного остатка. Гидроксилирование нафталинового остатка у метаболитов **M8.4** и **M8.5** опознается по наличию интенсивного пика иона, m/z 171 (моногидроксилированный оксометилнафталиновый фрагмент) в спектре и пика иона, m/z 144 – неизменный индольный остаток.

На Рисунке 4.32 приведены хроматограммы (ГХ-МС) образцов мочи людей, принимавших JWH-073 и JWH-018 и крысы, получившей JWH-018 (дериватизация метилированием). Как и следовало ожидать, изменение длины боковой цепи с 5 до 4 метиленовых звеньев почти не повлияло на метаболический профиль в области дезалкилированных форм. Набор метаболитов в моче крысы весьма подобен таковому для людей, за исключением отсутствия **M8.1** и наличия минорных **M8.3**, **M8.6-M8.8**. Последний метаболит (найденный только в моче крыс) дигидроксилирован по нафталиновому остатку. Главным признаком моногидроксилирования нафталинового остатка являлось наличие интенсивных пика иона, m/z 158 (неизменный N-метилованный индольный остаток), а многогидроксилирования индольного остатка - m/z 188. В ЭИ спектре дигидроксилированного **M8.8** присутствует пик иона, m/z 158, что в совокупности с молекулярной массой свидетельствует о локализации обеих гидроксильных групп на нафталиновом остатке.

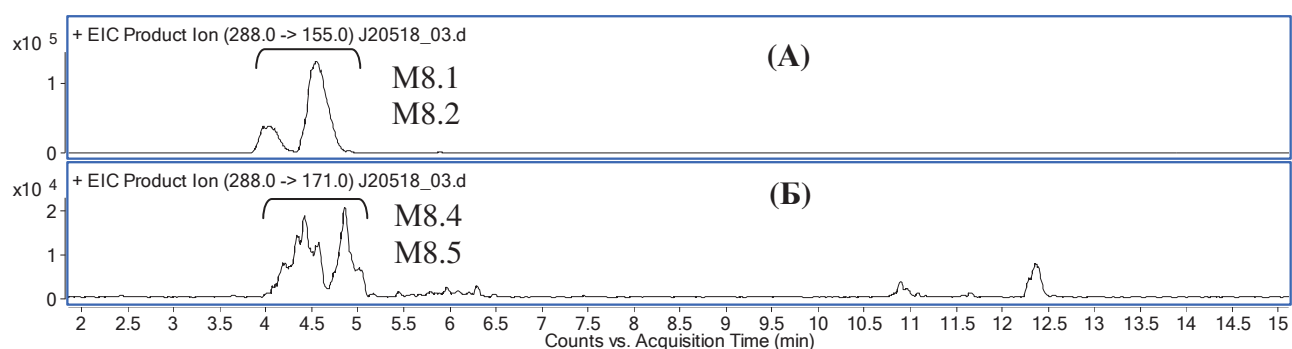


Рис. 4.31. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Дезалкилированные моногидроксилированные метаболиты с гидроксильной группой, расположенной на индольном (А) и нафталиновом (Б) остатках.

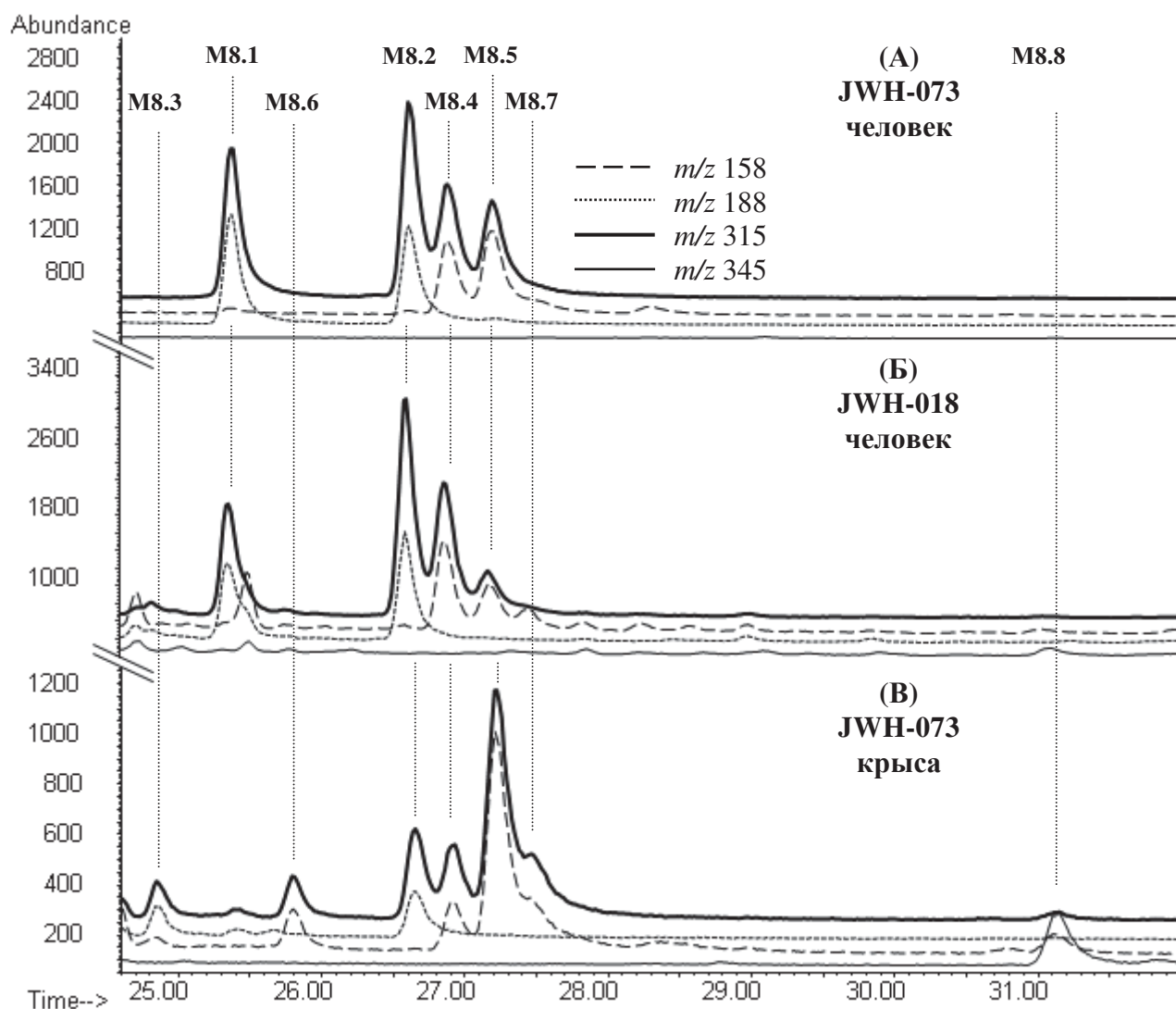


Рис. 4.32. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека, употреблявшего JWH-073 (А) и JWH-018 (Б). Хроматограмма образца мочи крысы, получившей JWH-018 (B). Кислотный гидролиз, дериватизация метилированием.

Несколько специфичный характер индольного атома азота, объясняемый его участием в ароматической структуре, и, следовательно, делокализацией свободной электронной пары, оказывает существенное влияние на свойства соответствующих дериватов. В предыдущем разделе, посвященном метаболизму JWH-018, приведены ацетатные дериваты дезалкилированных форм как иллюстрация возможности их использования. Наиболее характеристичными ионами для триметилсилильных дериватов дезалкилированных моногидроксилированных метаболитов следует считать ионы, m/z 216 и 304, указывающие на наличие неизмененного и гидроксилированного индольных остатков, соответственно, в N-триметилсилильной форме. Ионы, m/z 342 могут быть интерпретированы как следствие элиминирования фрагмента $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$. Однако, ни N-ацетатные, ни N-триметилсилильные

дериваты не могут считаться приемлемыми из-за их термической и химической нестабильности.

Эти особенности наиболее заметны при обнаружении дезалкилированных форм в условиях низкого содержания. N-триметилсилильные дериваты элюируются в виде зон с затянутым тылом, вблизи которого можно обнаружить хроматографический артефакт – соответствующий аналит со свободным индольным атомом азота. Ацетильные дериваты ведут себя подобно, и – также, как и TMS дериваты – гидролизуются в растворах, содержащих примеси воды. Замедлить этот процесс можно растворением ацетатной смеси в липофильных растворителях (например, в этилацетате), а не гидрофильных (спирты).

Метилирование индольного азота позволяет получать стабильные дериваты, элюирующиеся в виде узких и почти симметричных зон. Недостатками метилирования можно считать методические сложности (наиболее известная методика предполагает экстракцию, Приложение 1), а также затруднения при метилировании алифатических гидроксильных групп. В этом случае последние приходится дериватизировать дополнительно посредством ацетилирования или – что гораздо удобнее – триметилсилилирования. С другой стороны, подобная селективность метилирования может быть использована для дифференциации гидроксильных групп – метод, применяемый нами.

Несмотря на то, что дезалкилированные метаболиты характеризуются интенсивными хроматографическими пиками, их обнаружение может представить лишь частичную информацию о структуре исходного соединения. С другой же стороны, при обнаружении нафтоиндолов (и дезалкилированных метаболитов других каннабимиметиков, не имеющих алифатических гидроксильных групп) метилирование удобно по причине отсутствия необходимости в проведении триметилсилилирования, поскольку элюирование TMS дериватов желательно проводить на отдельной ГХ-МС системе.

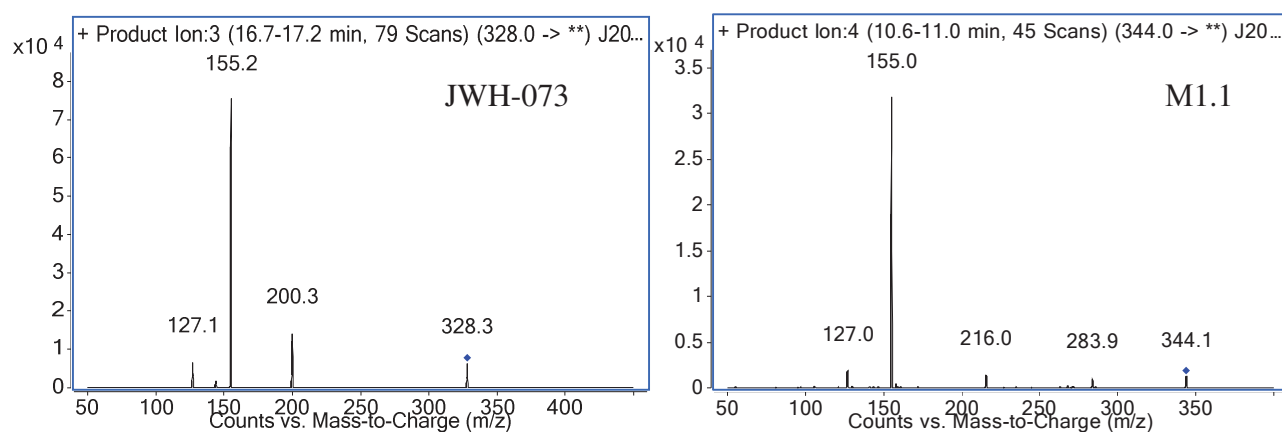


Рис. 4.33. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) JWH-073 и его метаболита.

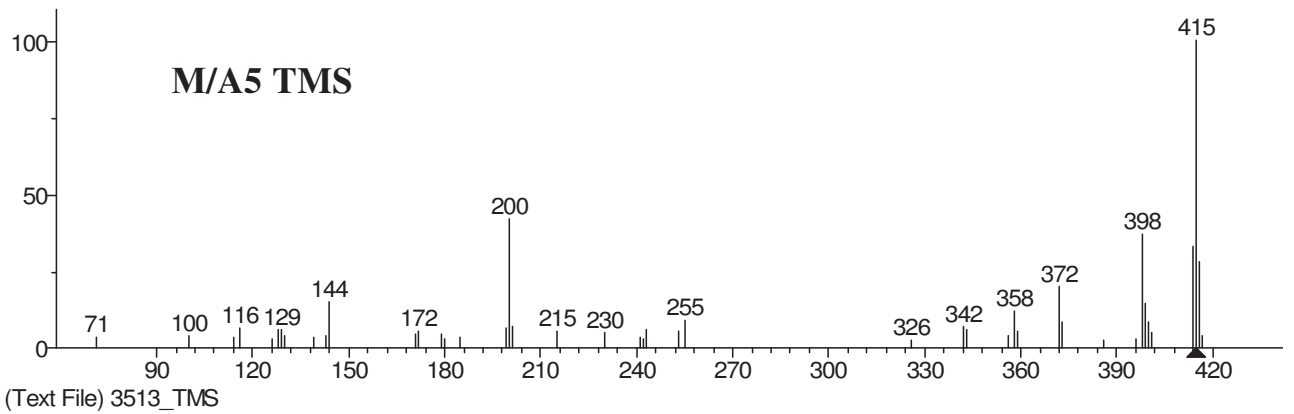
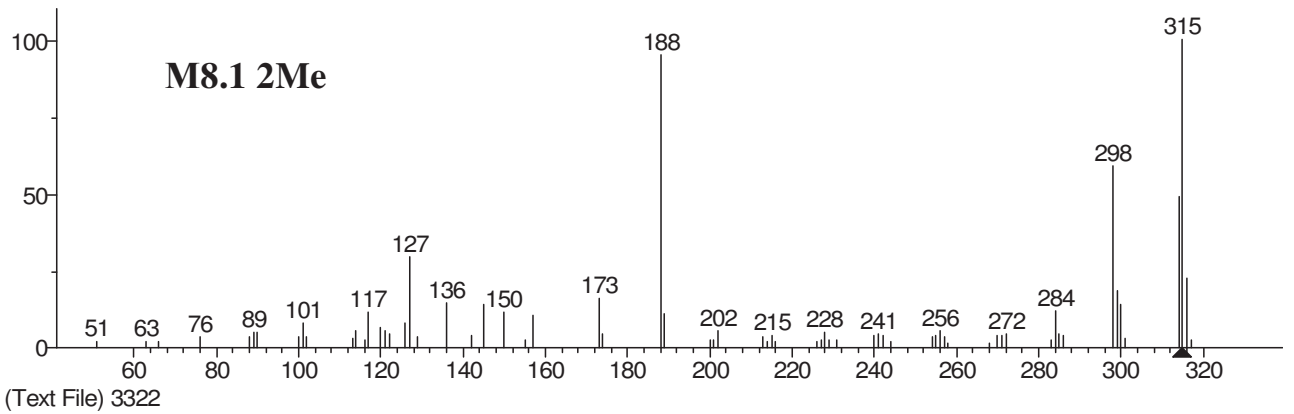
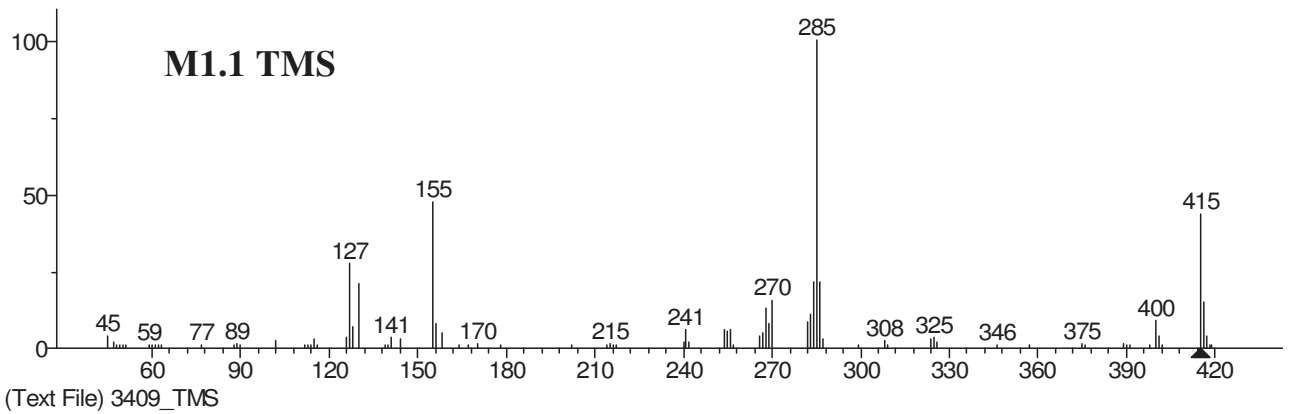
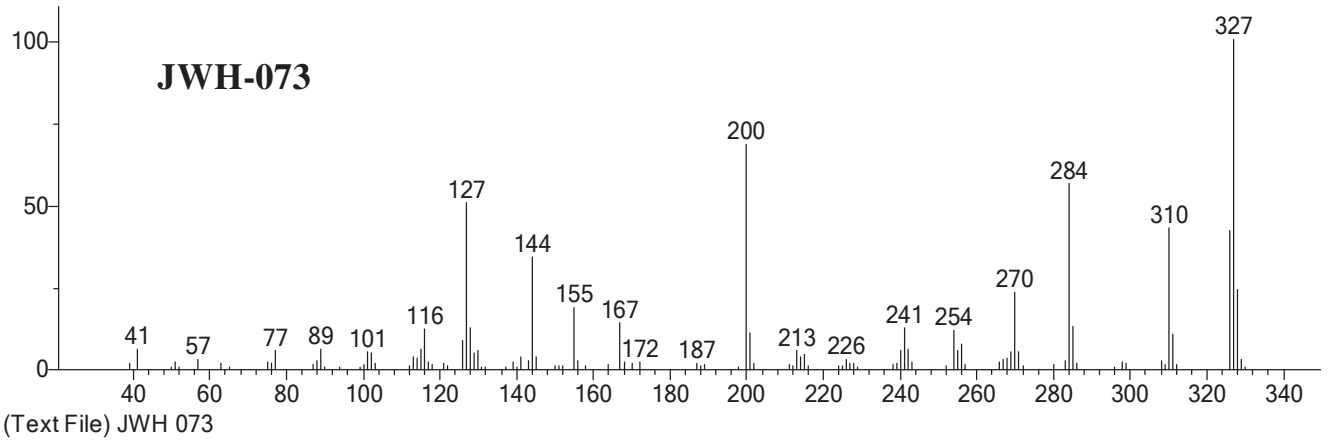


Рис. 4.34. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) JWH-073, его метаболитов и артефакта.

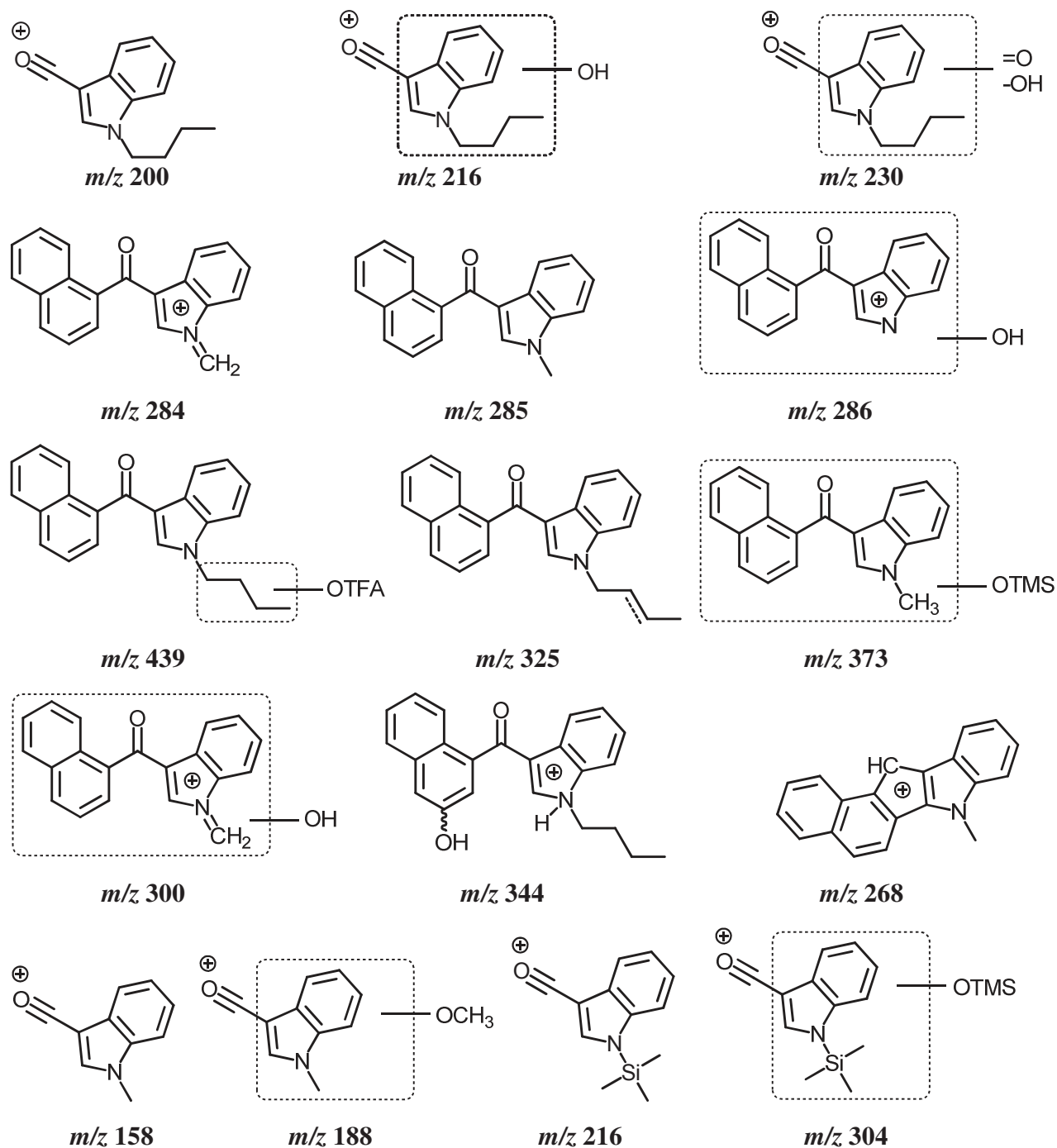


Рис. 4.35. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов и артефактов JWH-073 и JWH-018.

Полуколичественные определения. Как уже отмечалось выше, определение дегидратированных артефактов JWH-073 методом ГХ-МС после кислотного гидролиза является вполне приемлемым с методической точки зрения. В Таблице 4.8 приведены относительные (в % от максимальной) площади ГХ-МС пиков наиболее интенсивных метаболитических форм,

наблюдаемых в образцах мочи после проведения кислотного деконъюгирования. Хроматограммы получали в режиме SIM при регистрации ионов:

- для производных JWH-073 и дезалкилированных форм JWH-018: **M1.1** (270, 285, 415); **M1.2, M1.3, M/A2, M/A3** (372, 398, 415); **M/A6, M/A7, M2/3** (356, 373, 503), TMS и **M8.1-M8.5** (158, 188, 315), Me.

- для моногидроксилированных метаболитов JWH-018: ионы (270, 285, 429).

В первой части таблицы (Гидроксилированные метаболиты и артефакты JWH-073) приведены относительные площади пиков окисленных форм, которые могут быть надежно обнаружены в моче человека после дериватизации триметилсилилированием – т.е. без учета дезалкилированных метаболитов.

Наибольшими площадями характеризуются моногидроксилированные метаболит **M1.1** и артефакты **M/A2, M/A3** (соэлюирующиеся в ГХ режиме III), и обнаружение этих соединений вполне целесообразно при анализе образцов мочи. Смесь **M/A2+M/A3** может быть использована для первичного обнаружения, а метаболит **M1.1** – для подтверждающего, хотя данный выбор может быть инвертирован.

Во второй части таблицы (Гидроксилированные и дезалкилированные с гидроксилированием метаболиты и артефакты JWH-073) приведены результаты анализа образцов мочи человека и крысы с последовательной дериватизацией (метилирование и триметилсилилирование), учитывающей присутствие дезалкилированных метаболитов. Для образцов мочи человека относительные площади дезалкилированных метаболитов весьма велики. В образце мочи крысы наибольшей относительной площадью характеризуются соэлюирующаяся смесь артефактов **M/A6+M/A7** и дезалкилированный **M8.5**, в то время как относительное содержание моногидроксилированных форм невелико.

В третьей части таблицы (Основные гидроксилированные и дезалкилированные с гидроксилированием метаболиты JWH-018) для сравнения приведены результаты анализа мочи человека, употреблявшего JWH-018 (последовательная дериватизация Me и TMS), причем учтены только моногидроксилированные и дезалкилированные формы.

Относительное содержание дезалкилированных метаболитов значительно меньше, чем для JWH-073. Эту разницу можно объяснить меньшей длиной боковой цепи у JWH-073 и, следовательно, меньшей ее доступностью для гидроксилирования.

Профили экскреции метаболитов и артефактов JWH-073 (Рисунок 4.36) измеряли тем же способом, что и для JWH-018.

Полученные диаграммы позволяют сделать заключение о быстрой экскреции метаболитов: во втором образце мочи (отобранном через 11 часов после употребления) содержание всех наблюдаемых форм снижается почти в 6 раз по сравнению с первым образцом

(6 часов). Относительное содержание форм несколько меняется со временем: если в первых образцах мочи преобладал моногидроксилированный **M1.1**, то далее (24 часа) основными компонентами становится артефакты **M/A2+M/A3**. Этот факт, а также длительная экскреция метаболитов после крутого спада позволяет предположить депонирование самого JWH-073 и/или его метаболитов в тканях организма. Присутствие смеси **M/A2+M/A3** в моче курильщика наблюдали в течение 165 часов методом ГХ-МС (режим SIM). Очевидно, что применение более чувствительных методов анализа (например, ЖХ-МС/МС, режим MRM) позволило бы значительно увеличить время наблюдения.

Таблица 4.8. Относительные (% от наибольшей) площади пиков мочевых метаболитов (JWH-073, JWH-018) и артефактов (JWH-073).

Образец	M1.1	M1.2	M1.3	M/A2+M/A3	M/A6+M/A7	M2.3	M8.1	M8.2	M8.4	M8.5
Гидроксилированные метаболиты и артефакты JWH-073										
1 (человек)	100	3	1	74	77	11	н/о	н/о	н/о	н/о
2	100	4	5	25	52	8	н/о	н/о	н/о	н/о
3	100	<1	9	55	27	<1	н/о	н/о	н/о	н/о
4	100	<1	<1	67	100	<1	н/о	н/о	н/о	н/о
5	100	<1	<1	66	66	<1	н/о	н/о	н/о	н/о
6	85	<1	<1	100	73	<1	н/о	н/о	н/о	н/о
7	80	<1	<1	100	78	<1	н/о	н/о	н/о	н/о
8	77	5	1	100	79	12	н/о	н/о	н/о	н/о
9	76	7	<1	100	80	45	н/о	н/о	н/о	н/о
10	66	5	1	100	67	12	н/о	н/о	н/о	н/о
11	66	<1	<1	100	34	<1	н/о	н/о	н/о	н/о
12	61	<1	<1	100	39	<1	н/о	н/о	н/о	н/о
13	58	3	1	100	63	11	н/о	н/о	н/о	н/о
14	54	2	1	100	76	14	н/о	н/о	н/о	н/о
15	41	2	1	100	62	12	н/о	н/о	н/о	н/о
16	23	3	<1	100	46	18	н/о	н/о	н/о	н/о
Гидроксилированные и дезалкилированные с гидроксилированием метаболиты и артефакты JWH-073										
17 (человек)	100	<1	<1	100	61	7	68	98	83	31
18	100	7	8	78	95	8	46	69	84	21
19	97	5	3	52	74	8	49	100	74	31
20	79	5	2	17	29	3	50	100	71	25
21 (крыса)	10	–	н/о	–	100	32	–	18	18	74
Основные гидроксилированные и дезалкилированные с гидроксилированием метаболиты JWH-018										
1 (человек)	100	46	–	–	–	–	11	22	20	6
2	100	38	–	–	–	–	21	39	35	10
3	100	37	–	–	–	–	13	20	22	11

Очевидно замедленная экскреция для варианта орального употребления (Рисунок 4.36Б) объяснима медленным всасыванием JWH-073. В данном случае следует отметить, что выводы ряда работ [293, 316], отмечавших активность метаболитов нафтоиндолов по отношению к

CBR1 могут быть подвергнуты некоторому сомнению в плане формирования действительного психоактивного отклика. Заключение этих работ были сделаны на основании эффекторного отклика CBR1 в присутствии метаболитов, что может расцениваться лишь как модель *in vitro*. Согласно нашим предположениям – поскольку соединения, абсорбированные в желудочно-кишечном тракте, быстро трансформируются в печени – то в крови преобладают метаболиты. Малая интенсивность или отсутствие индивидуальных ощущений (что отмечается в большинстве подобных случаев, см. далее) свидетельствует о незначительной психоактивности метаболитов.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [32, 282, 307, 308, 310, 311, 317, 318].

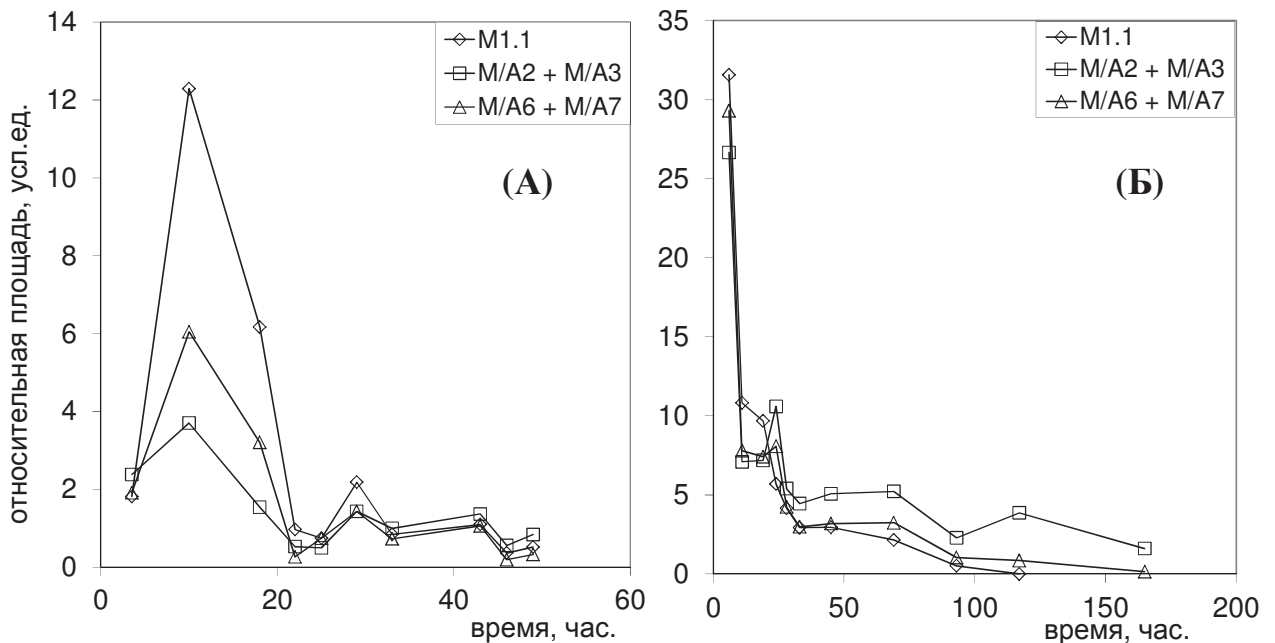


Рис. 4.36. Диаграммы экскреции метаболитов **M1.1** и артефактов (суммы **M/A2**, **M/A3** и **M/A6**, **M/A7** JWH-073 с мочой, случаи **C2**, пероральный прием (A) и **C3**, курение (B). Метод ГХ-МС, режим III, кислотный гидролиз, TMS.

4.5. Выявление метаболитов JWH-210

JWH-210 ((4-этилнафталин-1-ил)(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метанон, Рисунок 4.37) был синтезирован и охарактеризован группой Huffman [319]. В сентябре 2009 г. JWH-210 обнаружили в продуктах, продаваемых на рынке психоактивных средств [204, 206, 240]. Нативный JWH-210 определяют методом ЖХ-МС/МС в сыворотке крови [270], слюне [273] и волосах [277].

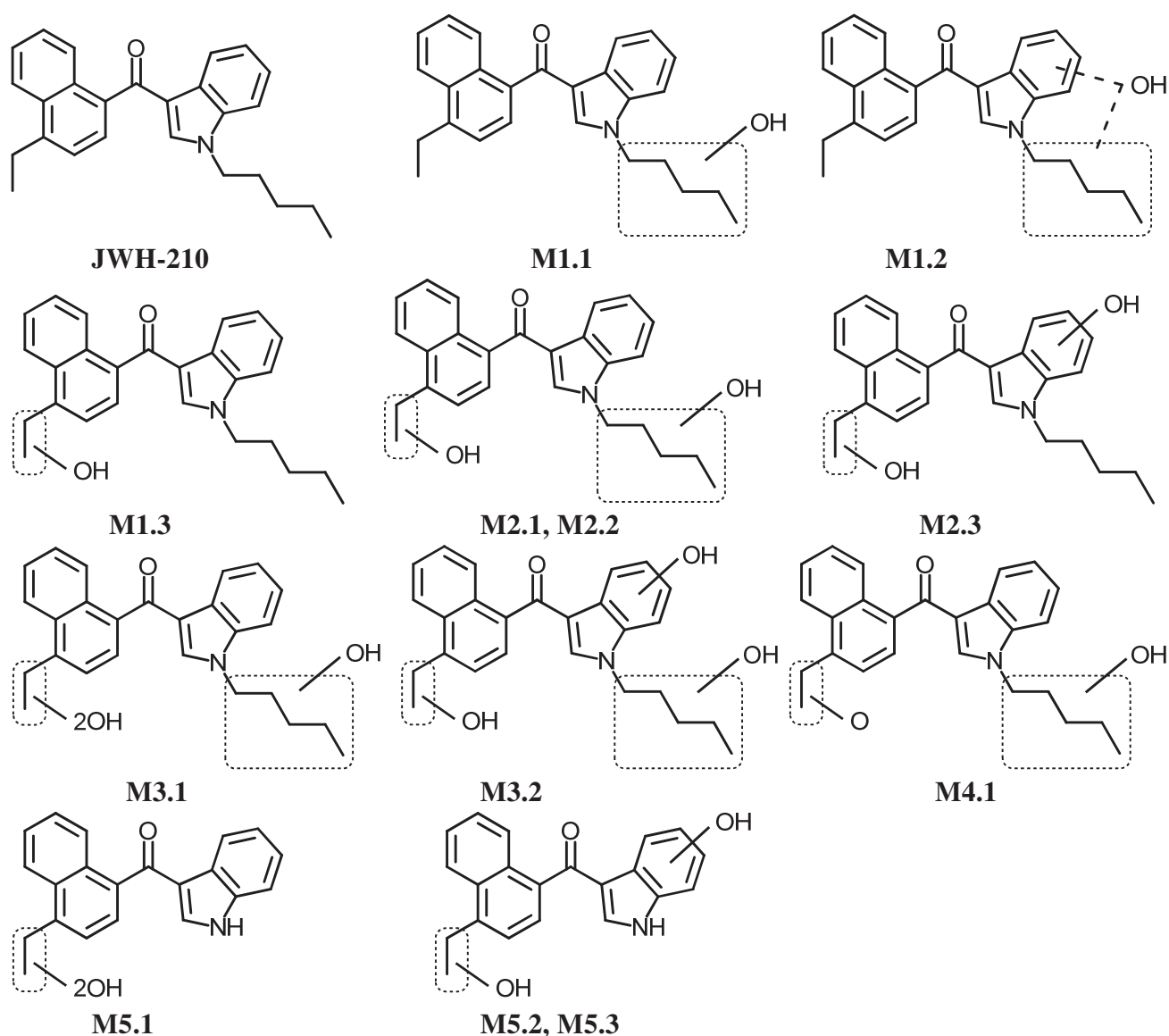


Рис. 4.37. Структуры JWH-210 и его метаболитов.

Существенным структурным отличием третьего нафтоиндольного каннабимиметика - JWH-210 - от других рассмотренных выше нафтоиндолов является наличие этильного заместителя в 4-м положении нафтильного остатка. Это отличие проявляется, в первую очередь, в чрезвычайно высокой аффинности JWH-210 к рецептору CB1 ($K_i=0.46$) [319]. Как

будет показано далее, более высокая липофильность этого соединения выражается и в изменении его метаболического профиля.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров (21) обрабатывали так же, как и для варианта JWH-018 (Гл. 4.3).

Случаи, использованные для измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

C1 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 139 ч.

C2 – курение. Мочу собирали в течение 7 суток, однако при последующем анализе метаболиты JWH-210 наблюдали не позже 39 ч. после приема.

Подготовка проб и условия анализа. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 100 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных и метилированных образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS образцов. Для подтверждения положения гидроксильных групп гидролизованные образцы мочи дериватизировали последовательно метилированием и триметилсилилированием.

Всего охарактеризовали 12 соединений, структурные формулы которых приведены на Рисунке 4.37, индексы удерживания дериватов – в Таблице 4.9. Ни в одном из образцов не нашли нативный JWH-210. Образцы мочи деконъюгировали кислотным или ферментативным методами (Приложение 1), экстрагировали и анализировали методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Исходный JWH-210 не был обнаружен ни в одном из образцов.

Концентрирование метаболитов JWH-210 проводили методом полупрепаративной ВЭЖХ-ДМД (Приложение 1). 50 мл мочи обработали по схеме кислотного гидролиза. Сухой остаток растворили в этилацетате (0.5 мл) и для предварительной очистки пропускали через патрон AccuBond SPE ODS-C18 (200 мг × 3 мл, Agilent), предварительно промытый 6 мл этилацетата. Сорбент промывали 2 мл этилацетата, объединенные элюаты упаривали. Сухой остаток растворили в ацетонитриле (0.5 мл) и разделили на 6 фракций при изократическом элюировании (вода-ацетонитрил 1:9 об.). Скорость потока была 1 мл/мин, вводимый объем 50 мкл. Времена отбора фракций, мин: (1) 1.4-1.8, (2) 1.8-2.3, (3) 2.3-2.8, (4) 2.8-3.3, (5) 3.3-3.8, (6) 3.8-4.3. Мертвый объем системы оценивали по удерживанию урацила (1.25 мин); удерживание нативного JWH-210 составляло 4.91 мин. Каждую фракцию упаривали в вакуумном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) досуха и анализировали методом ГХ-МС.

Таблица 4.9. Индексы удерживания метаболитов JWH-210 для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	EVDX-5ms		VF-5ms		Фр. №
				Реж. I	Реж. III	Реж. I	Реж. III	
1	JWH-210	C ₂₆ H ₂₇ NO	369	3479	3517			-
2	M1.3 TMS	C ₂₉ H ₃₅ NO ₂ Si	457	3520	3542	3535	3564	3
3	M2.1 2TMS	C ₃₂ H ₄₃ NO ₃ Si ₂	545	3709	3732	3721	3746	2
4	M2.2 2TMS	C ₃₂ H ₄₃ NO ₃ Si ₂	545	3797	3821	3810	3835	2
5	M2.3 2TMS	C ₃₂ H ₄₃ NO ₃ Si ₂	545	3733	3750	3745	3764	2
6	M2.3 MeTMS	C ₃₀ H ₃₇ NO ₃ Si	487	-	-	3754	3784	2
7	M3.1 3TMS	C ₃₅ H ₅₁ NO ₄ Si ₃	633	3845	3861	3855	3873	1,2
8	M3.2 3TMS	C ₃₅ H ₅₁ NO ₄ Si ₃	633	3908	3918	3918	3929	1
9	M3.2 Me2TMS	C ₃₃ H ₄₅ NO ₄ Si ₂	575			3927	3952	1
10	M4.1 TMS	C ₂₉ H ₃₃ NO ₃ Si	471	3776	3810	3828	3793	2
11	M5.1 2TMS	C ₂₈ H ₃₅ NO ₃ Si ₂	489	-	-	3490	3516	1
12	M5.2 MeTMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃ Si	431	-	-	3559	3595	1
13	M5.3 MeTMS	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃ Si	431	-	-	3588	3621	1

МС фрагментация исходного JWH-210. Как ЭИ, так и ЭР фрагментация этого соединения подобна другим рассмотренным нафтоиндолам (Рисунки 4.46-4.48). Наличие этилнафталинового остатка проявляется в ЭИ спектре присутствием ионов, m/z 155 и 183 (отличающимися от случая незамещенного нафталинового остатка дополнительной массой двух метиленовых групп, 28 Да). Оксометилпентилиндольному фрагменту соответствует ион, m/z 214. Два тяжелых иона, m/z 298 и 312, образуются при полном или частичном элиминировании боковой N-пентильной цепи, соответственно. Ионы, m/z 155, 183 и 214 присутствуют и в ЭР спектре.

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.3 (M.w. = 385). Содержание моногидроксилированных метаболитов JWH-210 во всех рассмотренных мочевых образцах было крайне мало, и этот факт мы объясняем значительной (по сравнению с большинством других распространенных каннабимиметиков) гидрофобностью JWH-210.

Метаболиты **M1.1** и **M1.2** были выявлены только методом ЖХ-МС/МС, Рисунок 4.38. ЭР спектры обоих соединений состоят из одного иона, m/z 183, соответствующего оксометилэтилнафталиновому фрагменту (Рисунок. 4.48). При отсутствии дополнительных данных, предположение о локализации гидроксильной группы на N-пентильной цепи у **M1.1** основано только на его малом удерживании (по сравнению с другими метаболитами) и высокой вероятности присутствия в образцах. Эти предположения уже не могут применяться для детализации структуры **M1.2**, и поэтому на данном этапе исследований можно лишь утверждать, что гидроксильная группа находится на его пентилиндольном остатке.

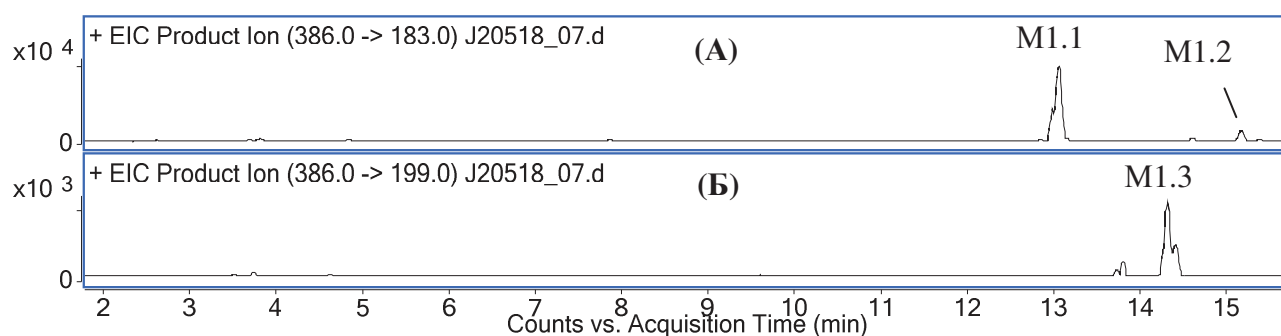


Рис. 4.38. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильных групп на пентилиндольном (А) и на этилнафталиновом остатках (Б).

Метаболит **M1.3** был выявлен также методом ГХ-МС, Рисунок 4.39. Ион, m/z 199 в его ЭР спектре указывает на гидроксирование этилнафталинового остатка, а ион, m/z 214 — явный признак неизмененного пентилиндольного остатка. ЭИ фрагментация **M1.3** (наличие пиков ионов, m/z 144 и 214) соответствует этим заключениям. Дальнейшая детализация структуры **M1.3** была выполнена после проведения последовательной дериватизации (метилирование и триметилсилилирование), в результате которой был найден только TMS дериват и, следовательно, гидроксильная группа с большей вероятностью находится на этильной цепи.

Полученные результаты находятся в противоречии с работой [320], авторы которой предлагают обнаружение моногидроксилированных метаболитов JWH-210. Как будет показано далее, основными компонентами метаболического профиля JWH-210 являются его кратно окисленные формы.

Дигидроксилированные метаболиты M2.1-M2.3 (M.w. = 401). Интенсивный пик иона, m/z 199, присутствует в ЭР спектрах всех трех дигидроксилированных метаболитов (Рисунки 4.40 и 4.48), что свидетельствует о моногидроксилировании этилнафталинового остатка; дополнительным свидетельством можно считать наличие ионов, m/z 230 (моногидроксилированный оксометилпениндольный фрагмент) в спектрах **M2.1** и **M2.3**. Положение второй гидроксильной группы определяли на основании спектров ЭИ.

В ЭИ спектрах метаболитов **M2.1** и **M2.3** (Рисунки 4.41 и 4.47) присутствуют пики иона, m/z 271, отнесенного к моногидроксилированному этилнафталиновому остатку, а также ионов, m/z 153 и 181 (Рисунок 4.48), образующихся при элиминировании триметилсиланола от этильной цепи. Существование этих ионов можно объяснить энергетической выгодой сопряжения образующейся двойной связи с нафталиновым циклом. Ионы, m/z 386 и 400 образуются при частичном или полном элиминировании боковой N-пентильной цепи. Оба метаболита не образуют метильных дериватов, и по сумме изложенных фактов можно с

уверенностью заключить, что вторая гидроксильная группа у **M2.1** и **M2.3** находится на N-пентильной цепи.

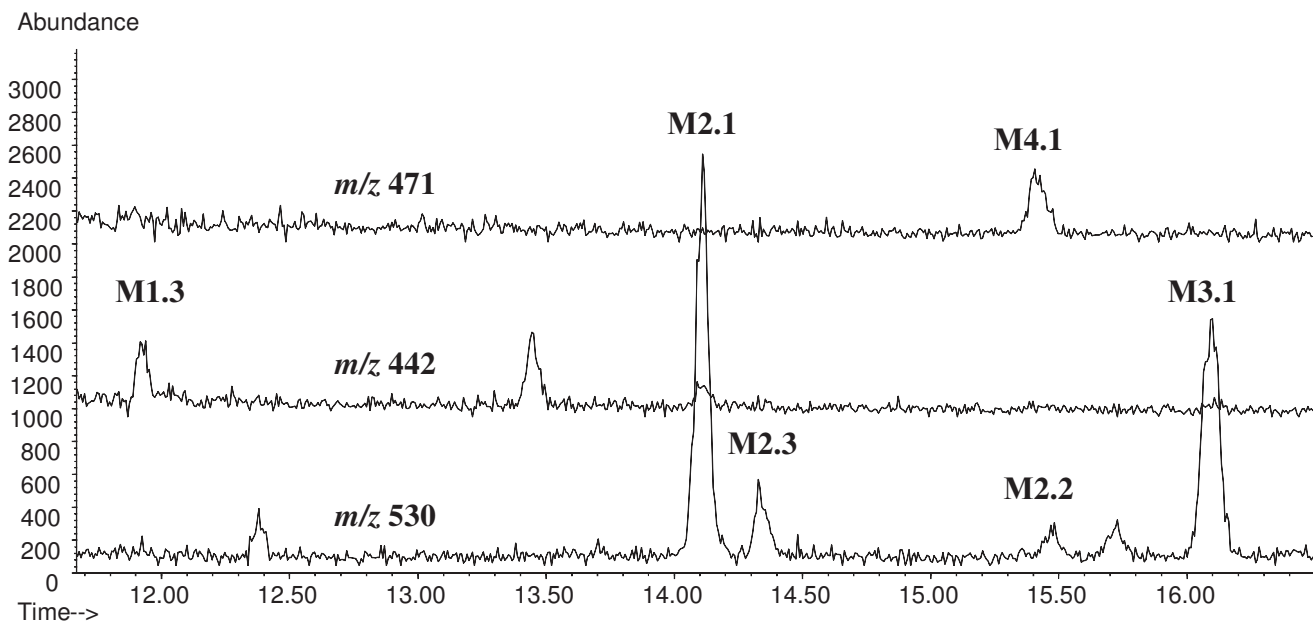


Рис. 4.39. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз (колонка VF-5ms, режим III).

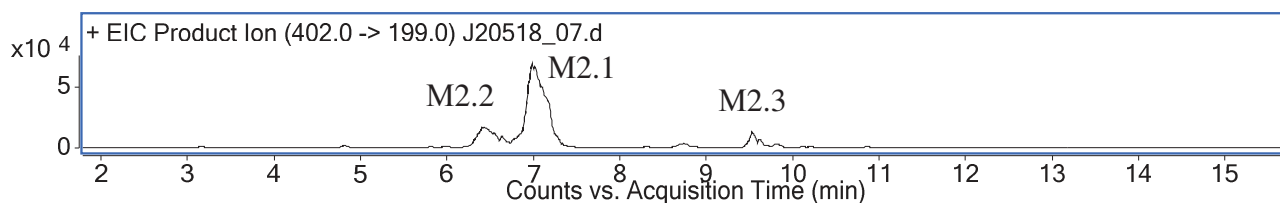


Рис. 4.40. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Дигидроксильрованные метаболиты.

Третий метаболит (**M2.2**), напротив, образует монометильный дериват, в ЭИ спектре которого присутствуют пики ионов, m/z 216 и 244, свидетельствующие о наличии гидроксильной группы на пентилиндольном остатке и пик иона, m/z 430, ограничивающий ее локализацию ароматической системой. Дополнительной аргументацией в пользу представленной структуры служит наличие пиков ионов, m/z 153 и 181 в ЭИ спектре TMS деривата **M2.2**. Хроматографические пики метаболита **M2.1** наиболее интенсивны как на жидкостных, так и на газовых хроматограммах, что делает это соединение удобным для обнаружения, несмотря на значительное ГХ удерживание.

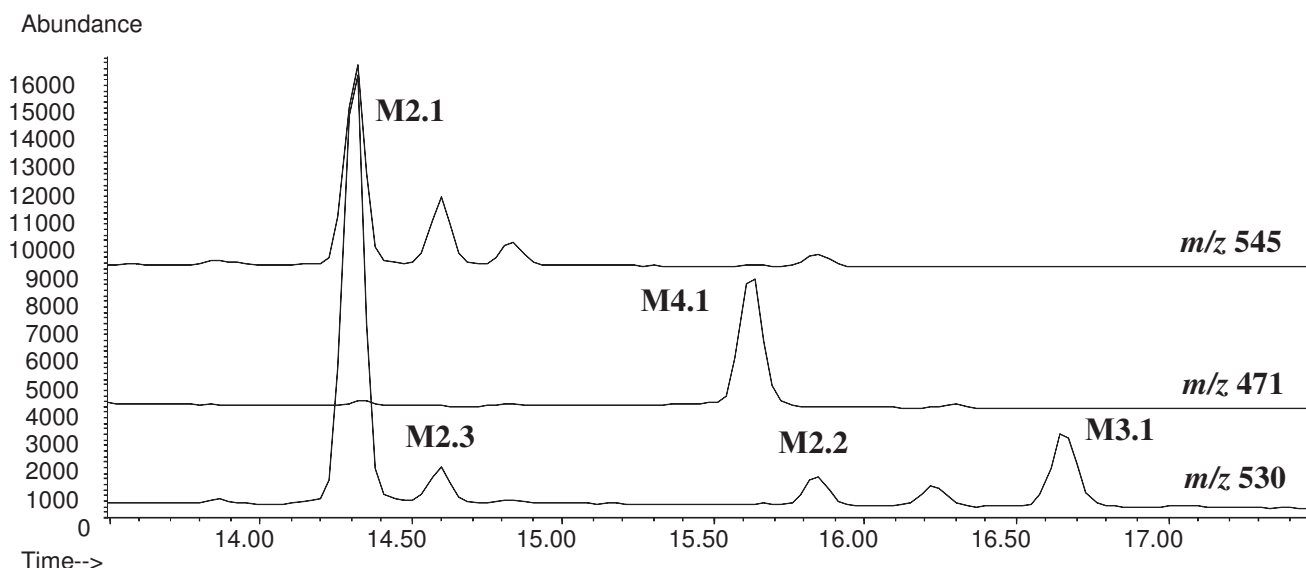


Рис. 4.41. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ-фракции (2) (колонка EVDX-5ms, режим III).

Тригидроксилированные метаболиты **M3.1** и **M3.2** (M.w. = 417). Метаболиту **M3.1** соответствуют интенсивные хроматографические пики, Рисунки 4.42 и 4.43. Судя по наличию пика иона, m/z 215, в его ЭР спектре, две гидроксильные группы локализованы на этилнафталиновом остатке.

ЭИ спектр **M3.1** представлен, в основном, чрезвычайно интенсивным пиком стабильного иона, m/z 530. Его наличие позволяет предположить элиминирование метиленокситриметилсиланового радикала ($[C_4H_{11}OSi]^+$) и формирования сопряжения (Рисунок 4.48), что допускает вывод о локализации обеих гидроксильных групп на этильной цепи. Хроматомасс-спектрометрические данные – сами по себе – не предоставляют возможности дальнейшей детализации структуры. Однако, метаболит **M3.1** не метилируется, и этот факт вместе с обоснованным ранее наблюдением о преимущественном гидроксировании алифатических остатков позволяет предположить, что оставшаяся гидроксильная группа находится на боковой N-пентильной цепи.

Наблюдаемое содержание второго тригидроксилированного метаболита (**M3.2**) гораздо ниже, нежели **M3.1**, и поэтому **M3.2** непосредственно наблюдали только методом ЖХ-МС/МС, а ГХ-МС – в ВЭЖХ фракции 1, Рисунок 4.43.

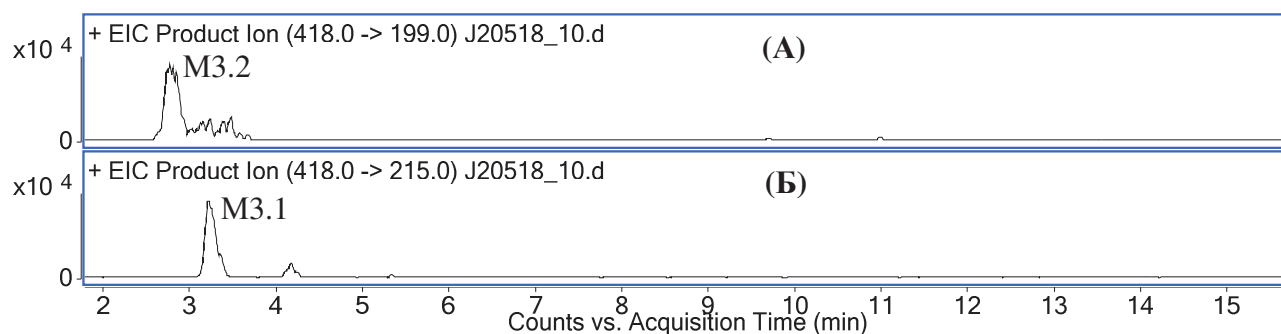
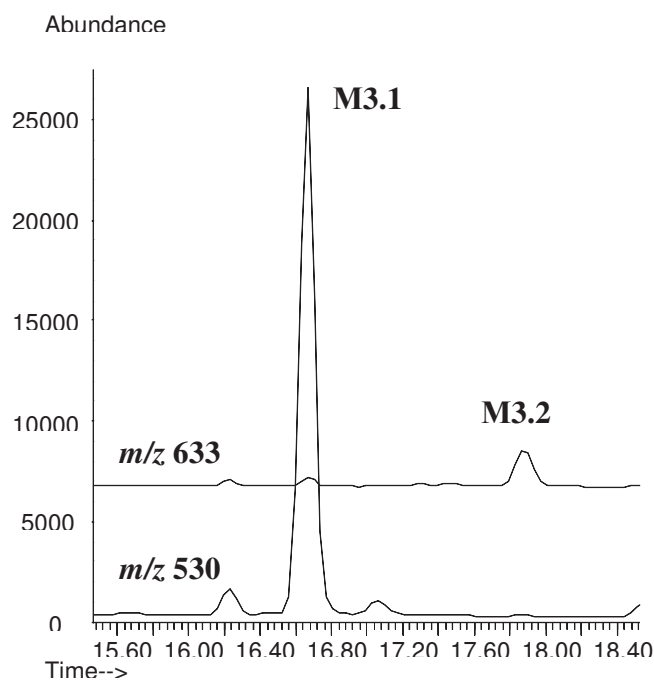


Рис. 4.42. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз. Тригидроксилированные метаболиты с двумя (А) и одной (Б) гидроксильными группами на пентилиндольном остатке.

Рис. 4.43. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ-фракции (1) (колонка EVDX-5ms, режим III).



Характер ЭР спектра этого метаболита (ион, m/z 199) указывает на моногидроксилирование этилнафталинового остатка. Об этом же свидетельствует и ЭИ фрагментация его TMS деривата: в спектре присутствуют пики ионов, m/z 153, 181 и 271. Определить положение двух оставшихся гидроксильных групп позволяет наличие в спектре ЭИ пиков ионов, m/z 474 и 488, свидетельствующих о дигидроксилировании этилнафталиноксометилиндольного остатка, а также образование монометильного деривата. Последний факт указывает на то, что этилнафталиновый остаток гидроксильнован по этильной цепи. В ЭИ спектре монометильного (TMS) деривата присутствует пики иона, m/z 271, а также m/z 416 и 430, свидетельствующие о дигидроксилировании этилнафтоилиндольного остатка.

Моногидроксилированный метаболит с карбонильной группой на этильной цепи M4.1 (M.w. = 399). ЭР спектр **M4.1** (Рисунок 4.44) представлен единственным пиком иона, m/z 197. Весьма интенсивный пик этого же иона присутствует в ЭИ спектре его TMS деривата; оба представленных факта свидетельствуют о наличии карбонильной группы на этильной цепи.

Присутствие пиков ионов, m/z 326 и 312 в ЭИ спектре, указывают не только на наличие карбонильной группы, но и на моногидроксилирование боковой N-пентильной цепи. Следует отметить, что карбоксилированный (изобарный **M4.1**) метаболит – не выявлен. Возможно, его концентрация весьма низка или он вообще отсутствует в метаболической смеси, и это можно считать важным отличием метаболизма JWH-210 от JWH-018, JWH-073 и ряда других каннабимиметиков, рассмотренных далее. Содержание метаболита **M4.1** в образцах, полученных после кислотного или ферментативного гидролиза было сопоставимо, и следовательно, он не является артефактом пробоподготовки. Учитывая возможную дегидратацию, присутствие **M4.1** хорошо согласуется с выявлением **M3.1**, дигидроксилированного по этильной цепи.

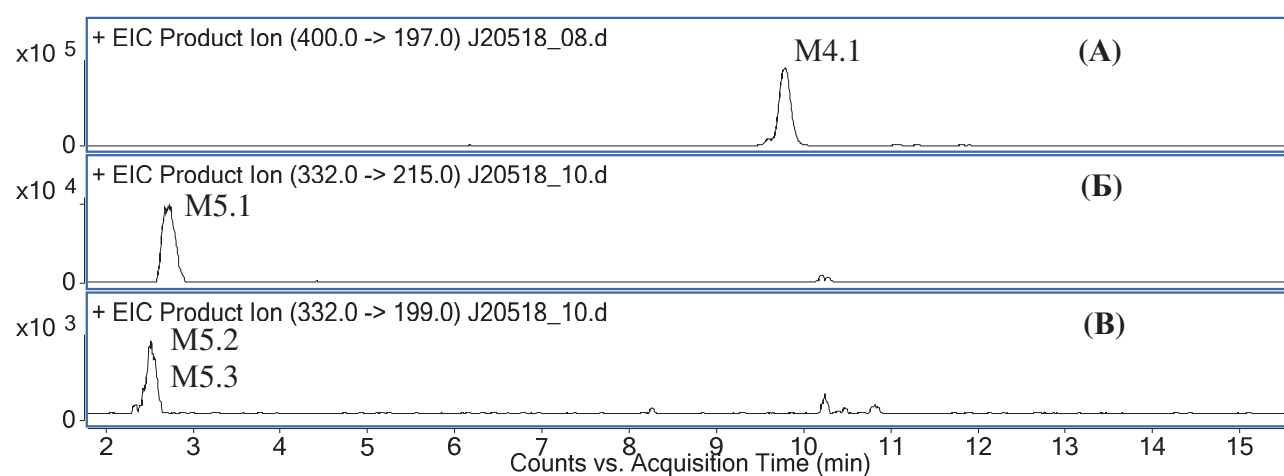


Рис. 4.44. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Моногидроксилированный метаболит с карбонильной группой на этильной цепи (А). Дезалкилированные метаболиты (Б, В).

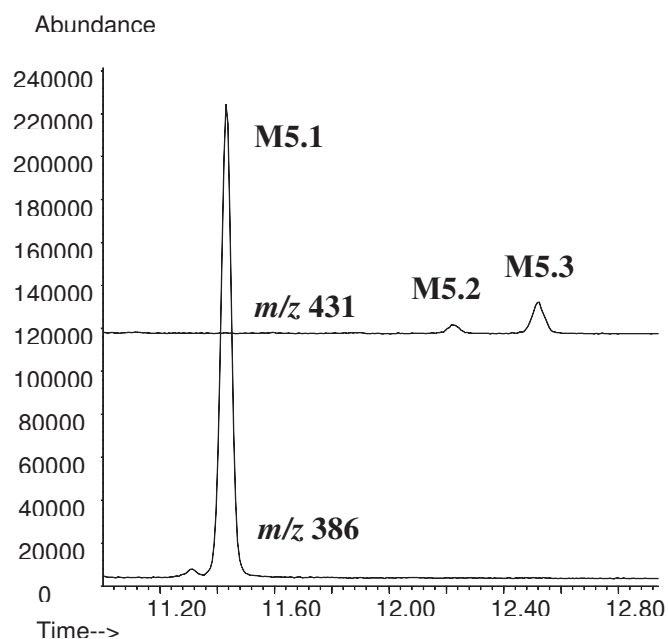
N-Дезалкилированные дигидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на этильной цепи **M5.1-M5.3** (M.w. = 331). Моногидроксилированные *N*-дезалкилированные метаболиты JWH-210 не выявили, что также может быть связано со значительной гидрофобностью нативного соединения.

Из дигидроксилированных форм наиболее интенсивными хроматографическими пиками в режимах ГХ и ЖХ характеризуется метаболит **M5.1** (Рисунки 4.44 и 4.45). Для ГХ-МС метода приведены хроматограммы фракции, поскольку наблюдение **M5.1** и – тем более – минорных **M5.2** и **M5.3** в мочевых образцах затруднительно из-за малого содержания и матричных влияний.

В ЭР спектре **M5.1** (так же, как и для тригидроксилированного **M3.1**) присутствует интенсивный пик иона, m/z 215 (дигидроксилирование этилнафталинового остатка); можно

отметить, что подобная фрагментация характерна только для этих двух метаболитов. Ион, m/z 144 (неизмененный индольный остаток) подтверждает дигидроксилирование этилнафталинового остатка. **M3.1** метилируется только по индольному азоту, а ЭИ фрагментация его MeTMS деривата весьма подобна тому же **M3.1**: присутствие чрезвычайно интенсивного пика иона, m/z 386 также можно отнести к элиминированию метиленокситриметилсиланового радикала от дигидроксилированной (TMS) этильной цепи. Остальные пики ЭИ спектра **M5.1** малоинтенсивны; следует отметить только присутствие иона, m/z 158, соответствующего N-метилованному оксометилиндольному фрагменту.

Рис. 4.45. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ-фракции (1) (колонка VF-5ms, режим III).



Метаболиты **M5.2** и **M5.3** создаются в примененных ЖХ условиях, и ЭР спектр зарегистрирован в максимуме хроматографической зоны. Из двух ионов спектра (m/z 160 и 199) первый свидетельствует о моногидроксилировании индольного, а второй - этилнафталинового остатков.

Полюколичественные определения. Метаболические профили JWH-210, получаемые после кислотного и ферментативного деконъюгирования, были в целом, похожи. Экскрецию метаболитов исследовали тем же способом, что и для JWH-018 (кислотное деконъюгирование и определение TMS дериватов методом ГХ-МС). Хроматограммы регистрировали в режиме SIM, площади пиков метаболитов измеряли по сумме их пиков на ион-хроматограммах (m/z 442, 456, 457, 471, 528, 530, 543, 545, 618 и 633), пика папаверина – по m/z 338. Диаграммы экскреции приведены на Рисунке 4.49. В целом, они подобны диаграммам для JWH-073, что позволяет использовать те же объяснения наблюдаемых процессов.

После ингаляционного приема (курения) JWH-210, наиболее концентрированной найдена первая порция мочи, собранная через 6 ч. Далее содержание метаболитов быстро

снижается - почти в 4 раза. В целом, скорость дальнейшего снижения уменьшается, однако определяемые площади пиков метаболитов (изначально невысокие) становятся слишком малыми для уверенного измерения. После перорального приема (случай I) максимальная концентрация метаболитов была достигнута примерно в промежутке 9.5-22 часа, что – как и для JWH-073 – можно объяснить медленной абсорбцией JWH-210 в желудочно-кишечном тракте. Далее концентрации метаболитов резко снижаются (примерно в 3 раза). Медленный последующий спад наблюдали до 91 часа после приема (метаболит **M3.1**).

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [311, 321].

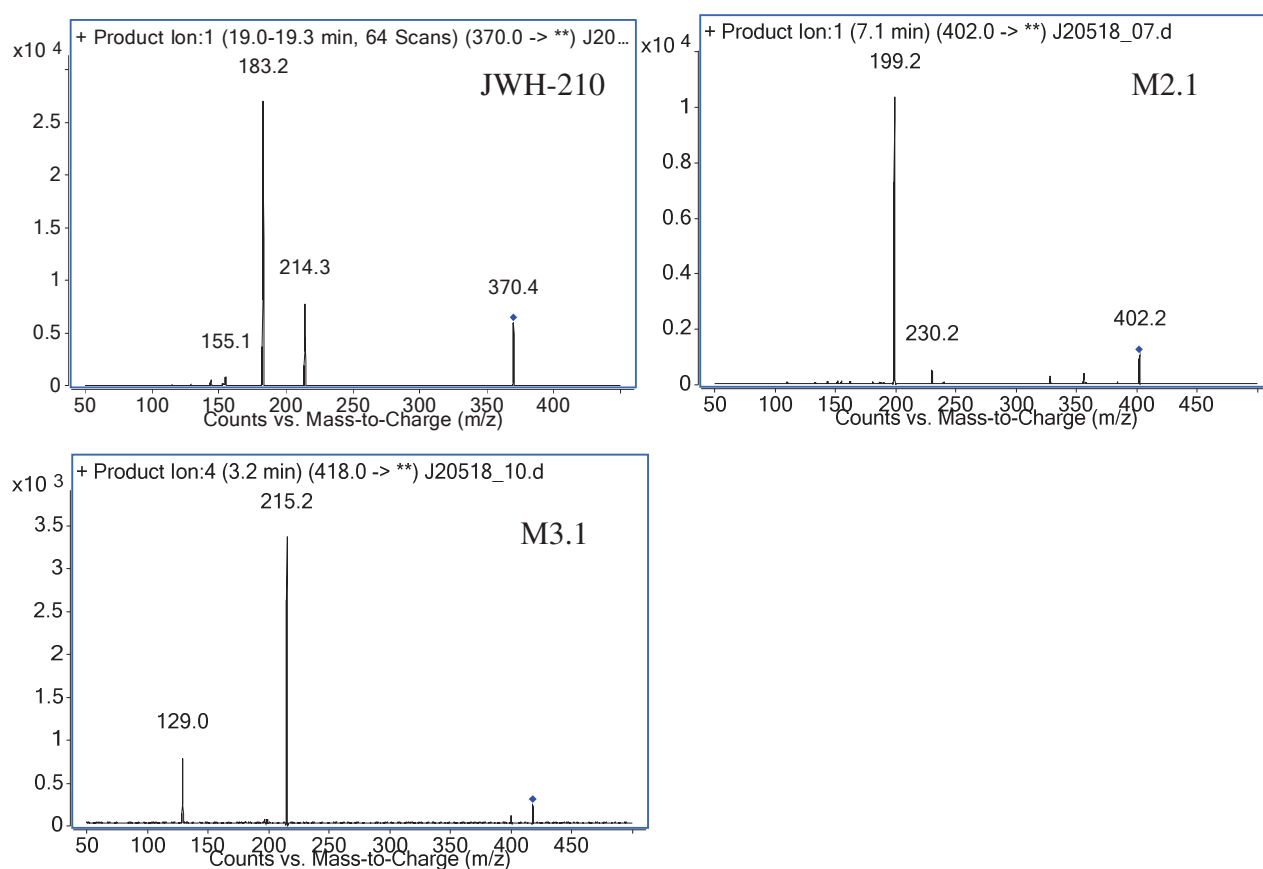


Рис. 4.46. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) JWH-210 и его метаболитов.

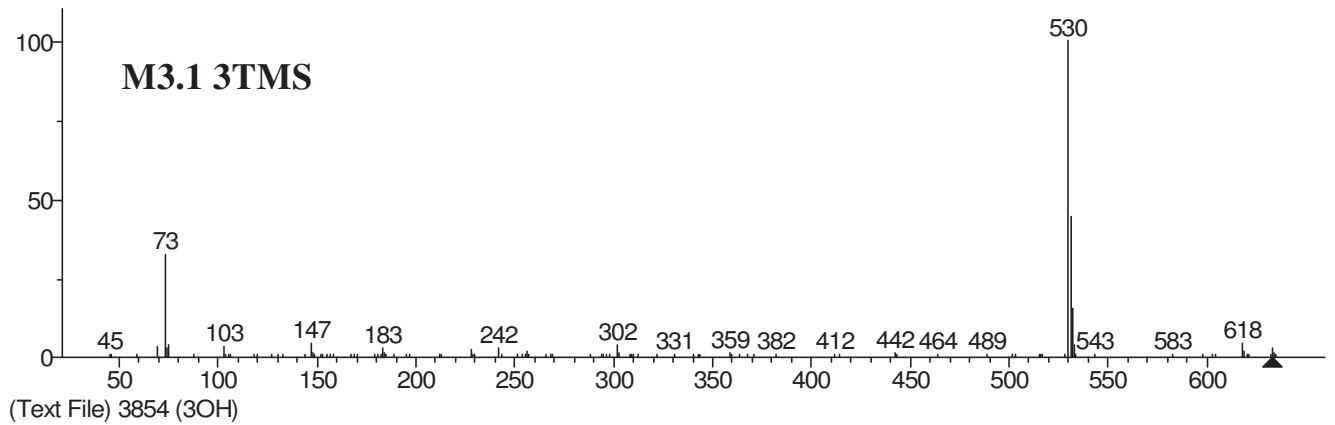
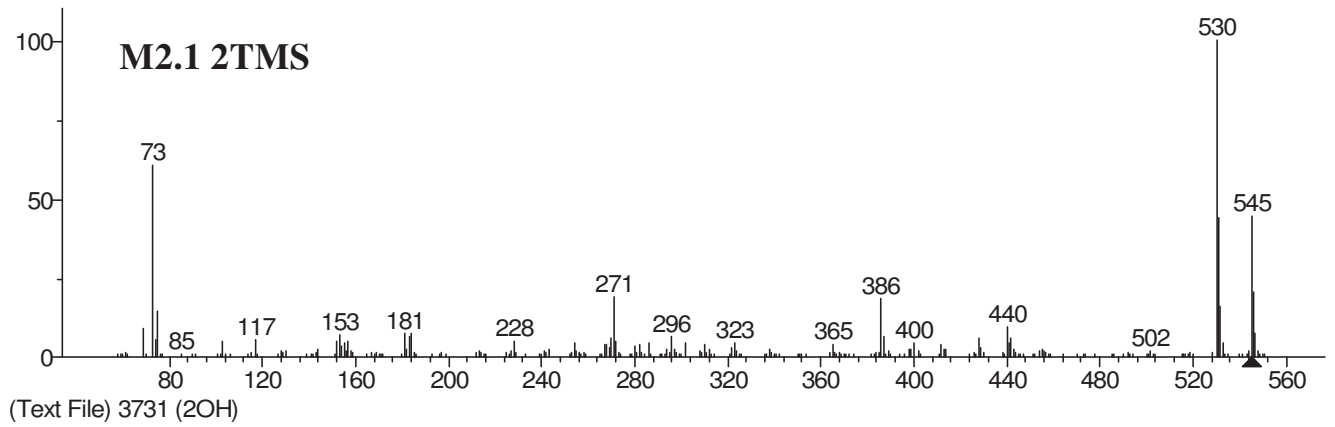
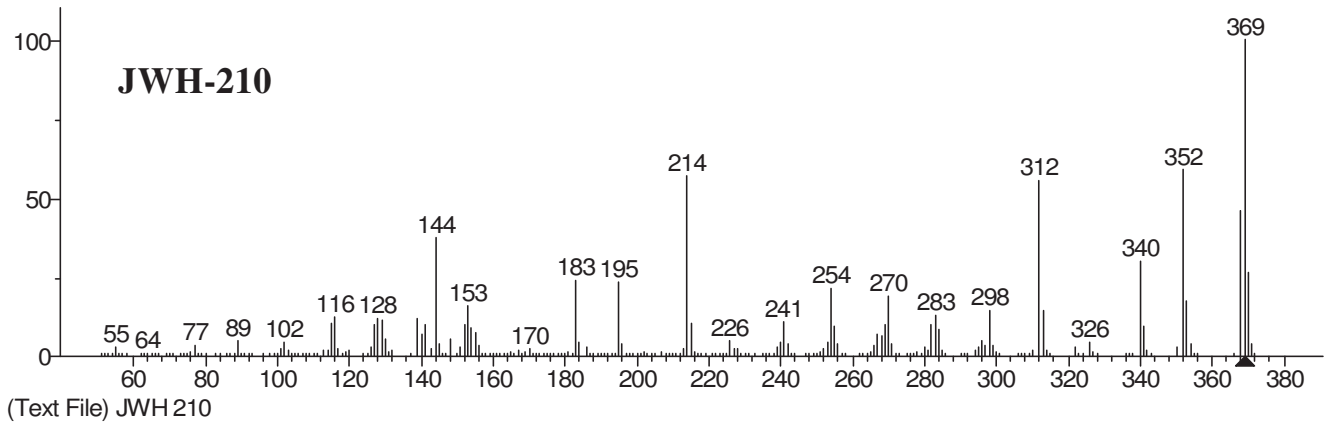


Рис. 4.47. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) JWH-210 и его метаболитов.

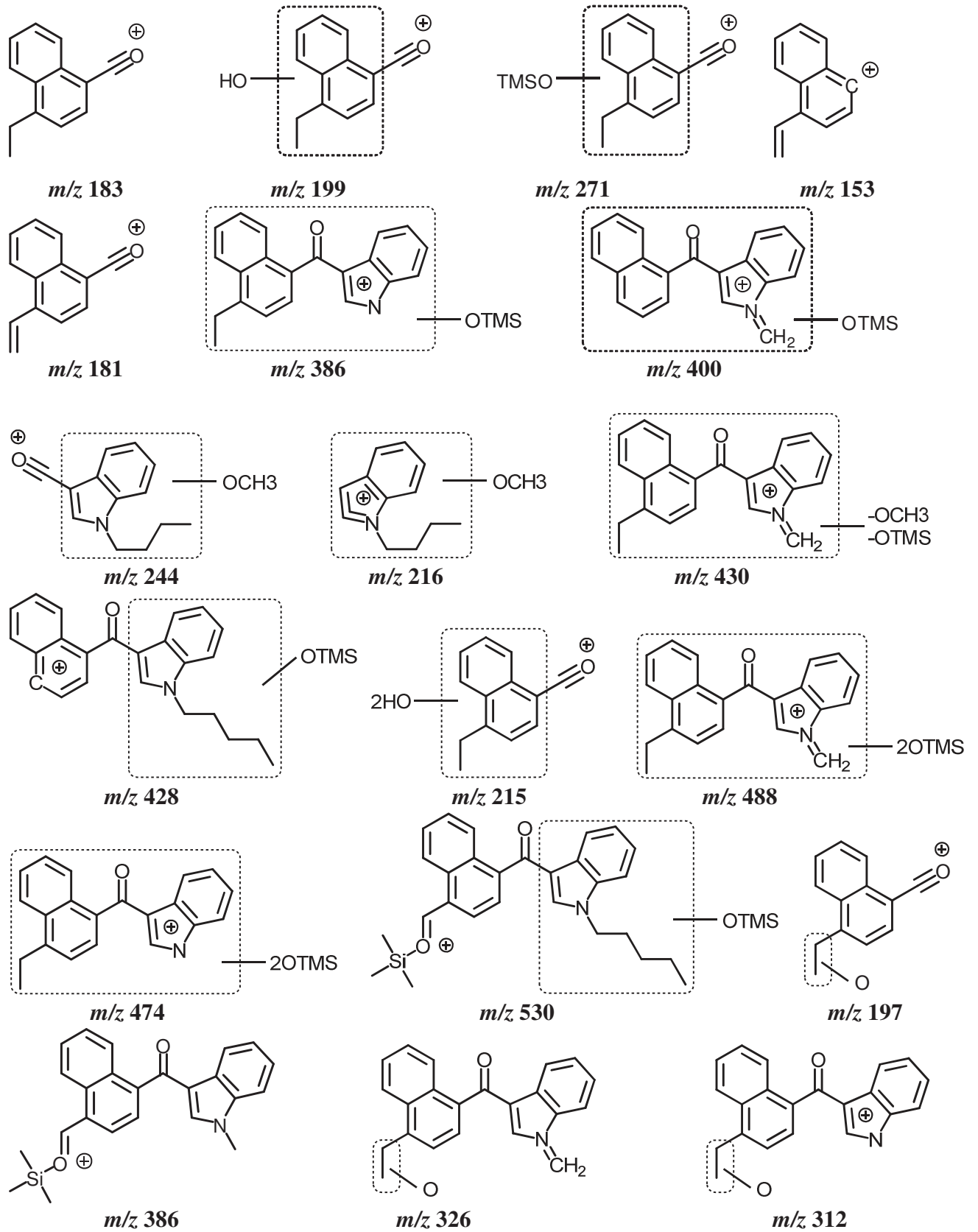


Рис. 4.48. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов JWH-210.

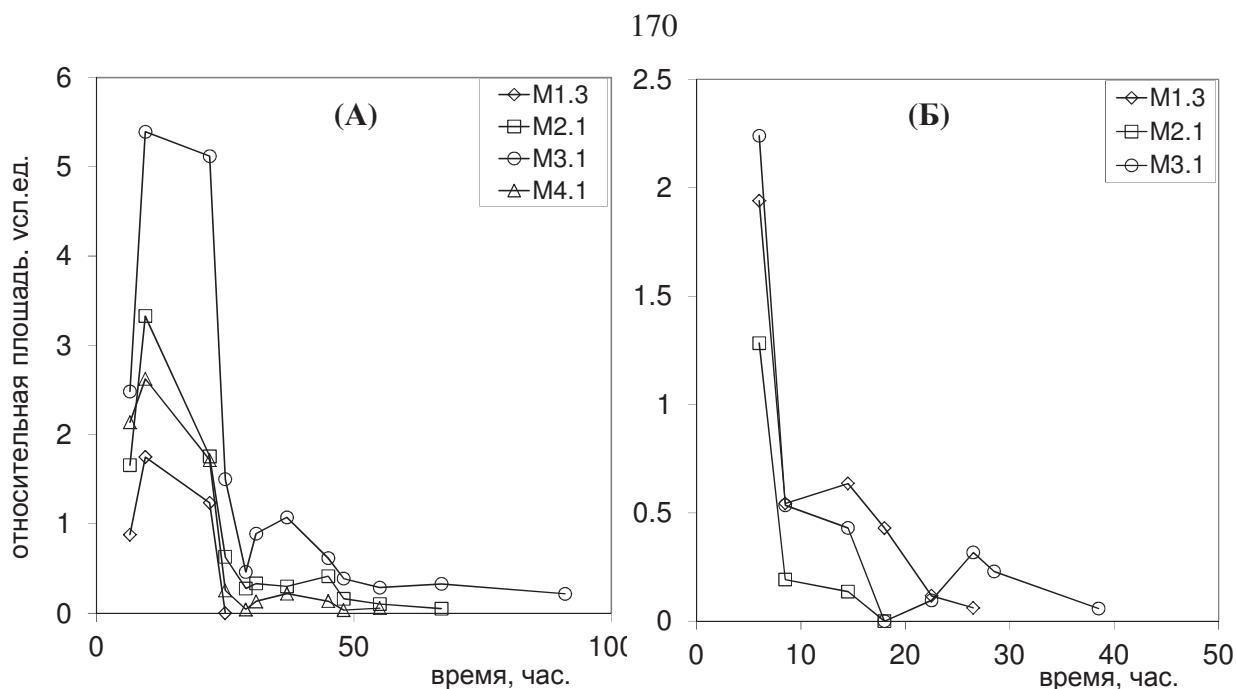


Рис. 4.49. Диаграммы экскреции метаболитов JWH-210 с мочой. Случаи C1, пероральный прием (А) и C2, курение (Б). Метод ГХ-МС, режим III, кислотный гидролиз, TMS.

4.6. Выявление метаболитов JWH-250

Ряд фенилацетилиндольных каннабимиметиков, и в их числе JWH-250 (2-(2-метоксифение)-1-(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)этанон) - одно из самых распространенных соединений на рынке психотропных средств – был синтезирован Huffman *et al.* [322]. Отличительная структурная особенность фенилацетилиндролов состоит в наличии бензильного остатка, причем между ароматическими частями структуры присутствует дополнительная – метиленовая группа, Рисунок 4.50. JWH-250 был обнаружен и идентифицирован в продаваемых продуктах германской федеральной криминальной полицией в мае 2009 г; впоследствии эти результаты были подтверждены другими исследователями [201, 202, 205]. Согласно постановлению Правительства РФ (№ 540 от 7 июля 2011 г.), оборот JWH-250 на территории России запрещен.

Несмотря на сравнительно раннее обнаружение, пик распространения этого соединения в странах Западной Европы, Японии и в РФ приходится на период, последующий запрету ряда нафтоиндрольных каннабимиметиков (в том числе, JWH-018 JWH-073). Фенилацетилиндролы, и, в первую очередь, JWH-250 заменили эти соединения на рынке психотропных средств в РФ.

Константа аффинности JWH-250 к CB1R ($K_i=11$ нМ) [321] близка к таковой для JWH-018 и JWH-073, но по ряду признаков (несколько большее содержание в нативного соединения курительных смесях [202, 205] и заметно большее содержание метаболитов в образцах мочи, характер отзывов курильщиков) можно предположить, что его фактическую активность по сравнению с указанными нафтоиндрололами несколько ниже.

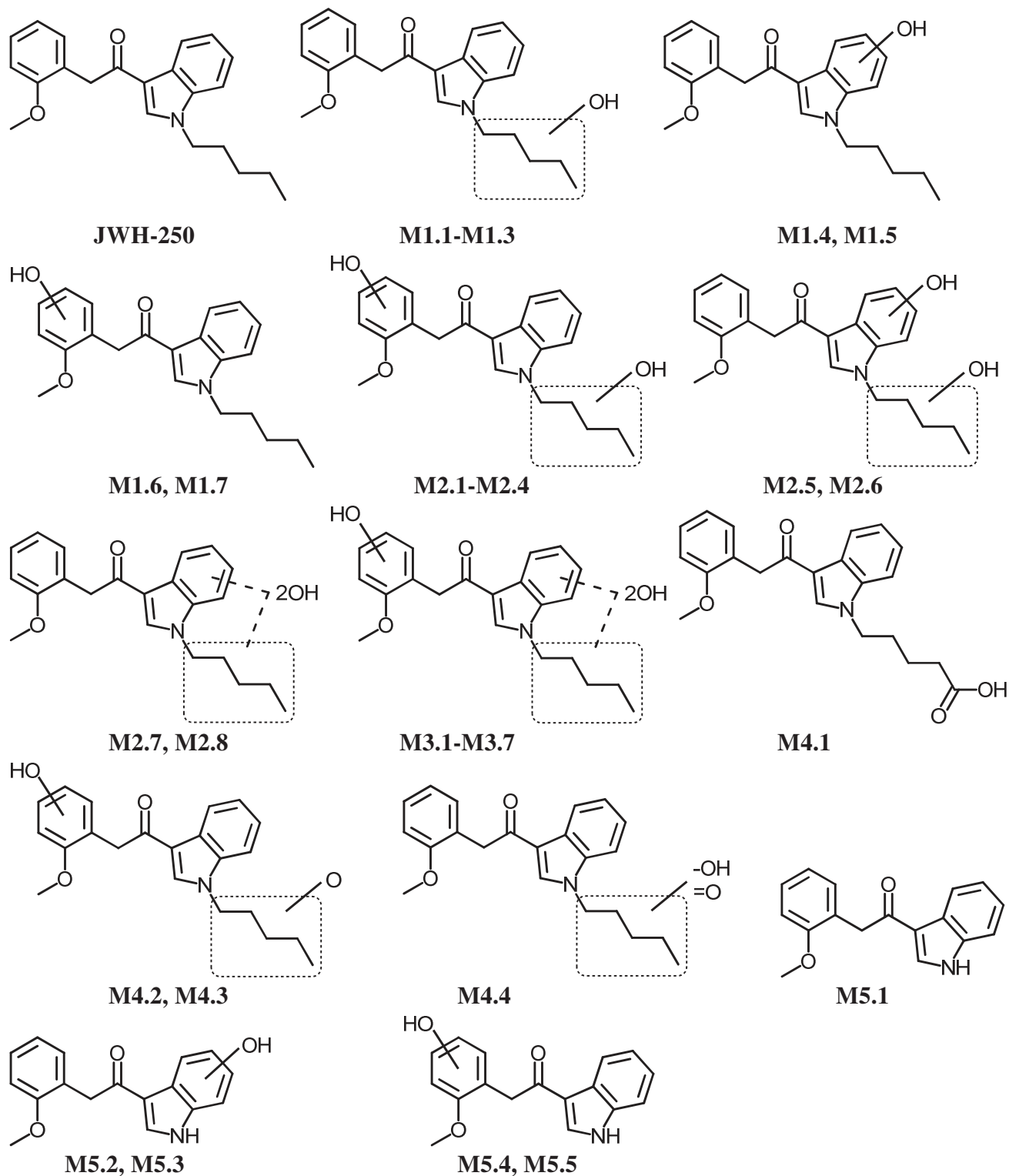


Рис. 4.50. Структуры JWH-250 и его метаболитов.

Метаболический профиль JWH-250 исследовали на основе следующих биоматериалов:

- образцы мочи (3) крыс, получивших JWH-250;
- образцы мочи (95) и сыворотки крови (1) персон, доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями.

Для определения ХМС характеристик, химических свойств и для проведения испытаний на крысах у анонимных распространителей через Интернет были куплены три образца, представляющих собой белые порошки и содержащие более 90% JWH-250. Подлинность и примерное содержание целевого вещества оценивали методами ГХ-МС, ВЭЖХ-ДМД и ТСХ. Для испытаний использовали только один образец JWH-250 из трех.

Испытания на крысах. Использованы три аутбредные крысы-самцы Wistar весом 280 – 300 г, лишённые доступа к корму за сутки до эксперимента. Суспензию JWH-250 в 1.5% крахмальном геле вводили внутривентрикулярно, с помощью зонда при дозировке 100 мг/кг. Через 15-20 мин. после введения суспензии отмечено существенное снижение двигательной активности животных в тесте «Открытое поле», сопровождавшееся увеличением актов груминга и стереотипными движениями головой. Через 30 мин. после введения суспензии животных помещали на сутки в метаболические кюветы со свободным доступом к воде. Образцы мочи каждой крысы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин и хранили центрифугаты при -20°C не более двух недель.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, сортировали так же, как и для случая JWH-018.

Случаи, использованные для поиска метаболитов в крови и измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

C1 – мочу собирали в течение 138 ч.

C2 – мочу собирали в течение 187 ч.

C3 – кровь (20 мл) собирали через 2.3 ч., мочу – в течение 120 часов после приема.

Подготовка проб и условия анализа. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при использовании системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных, ацетилированных, трифторацетилированных и метилированных образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS и образцов. Для подтверждения положения гидроксильных групп гидролизованные образцы мочи дериватизировали последовательно метилированием и триметилсилилированием. Было найдено, что дериватизация метилированием нецелесообразна для JWH-250 (и для других рассмотренных далее фенилацетилиндролов) из-за частичного метилирования метиленовой группы в метоксифенилацетильном остатке.

Кровь центрифугировали при 3000 об/мин. К 1 мл сыворотки добавляли 3 мл воды и обрабатывали подобно образцам мочи с кислотным деконъюгированием. Сухой остаток силилировали для анализа методом ГХ-МС.

Кроме использованного варианта подготовки проб, включающего ЖЖЭ, также разработали метод ТФЭ. Для этого применяли патроны Accu Bond C18 (3 мл × 200 мг), Agilent Technologies, заполненные обращенно-фазовым сорбентом. К деконъюгированному и подщелоченному образцу мочи (Приложение 1) добавляли 3 мл воды и 0.6 мл ацетонитрила и наносили на предварительно подготовленный патрон (промытый 6 мл ацетонитрила и 6 мл водного раствора аммиака, pH 10), затем промывали раствором 20 об.% ацетонитрила в воде (3 мл), сушили потоком воздуха в течение 0.5 мин и элюировали 3 мл ацетона. Метод ТФЭ разработали в качестве вспомогательного для оценки возможности его использования, поскольку его селективность в гидрофобном режиме мало отличается от ЖЖЭ.

Всего охарактеризовали 34 соединения (в том числе один ГХ артефакт), структурные формулы которых приведены на Рисунке 4.50, индексы удерживания дериватов – в Таблицах 4.10 и 4.11. Ни в одном из образцов не нашли нативный JWH-250. Образцы мочи деконъюгировали кислотным или ферментативным методами (Приложение 1), экстрагировали и анализировали методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС.

МС фрагментация исходного JWH-250. Фрагментация JWH-250 (и других рассмотренных фенилацетилиндролов) чрезвычайно зависит от способа, которым она достигается (Рисунки 4.60-4.62). Для обоих применяемых способов основным направлением фрагментации является разрыв связи C(O)-CH₂. Но в дальнейшем при ЭИ этот разрыв сопровождается сохранением заряда на оксометилпентилиндрольном остатке, приводя к появлению интенсивного пика иона, m/z 214. Пики молекулярных ионов фенилацетилиндролов малоинтенсивны, и для TMS дериватов, при их малом содержании, иногда удается зарегистрировать только продукты элиминирования метильной группы ($[M-15]^+$) – ионы, весьма характерные для триметилсилилированных соединений. Пики остальных ионов спектра (кроме m/z 144, обычного для оксометилиндрольных производных) также малоинтенсивны, что существенно снижает информативность спектра. При ЭР и последующем возбуждении полученного молекулярного иона в ячейках соударений, заряд сохраняется на замещенном бензильном остатке, и поэтому в ЭР спектре JWH-250 наиболее интенсивен пик иона, m/z 121.

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.6 (M.w. = 351). Все эти соединения (Рисунки 4.51 и 4.52) выявляли на основании уже изложенных закономерностей и при учете особенностей фрагментации фенилацетилиндролов. В ЭР спектрах метаболитов **M1.1-M1.5** (Рисунок 4.60) наиболее интенсивен пик иона, характерного и для исходного JWH-250 (m/z 121). Вместе с ионом, m/z 91 (пик которого малоинтенсивен), присутствующем не во всех спектрах, он свидетельствует о наличии неизмененного метоксибензильного остатка.

ЭИ спектры триметилсилилированных **M1.1-M1.3** (Рисунки 4.52 и 4.61) содержат интенсивный пик иона, m/z 302, и меньший – m/z 144, что прямо указывает на

моногидроксилирование боковой N-пентильной цепи. ГХ-МС трифторацетилированной смеси метаболитов – как и для случаев JWH-018 JWH-073 - выявила термическую нестабильность метаболита **M1.1**, элиминирующего трифторуксусную кислоту при элюировании.

Таблица 4.10. Индексы удерживания метаболитов JWH-250 для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах. Обнаружение метаболитов в моче человека (Ч) и крысы (К).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺⁺	EVDX-5ms		VF-5ms		Ч./К.
				Реж. I	Реж. II	Реж. I	Реж. II	
1	JWH-250	C ₂₂ H ₂₅ NO ₂	335	3000	2974	-	-	-
2	M1.1 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₃ Si	423	3225	3200	3250	3221	+/-
3	M1.1 TFA	C ₂₄ H ₂₄ F ₃ NO ₄	447	3045	3024	-	-	+/-
4	M/A1	C ₂₂ H ₂₃ NO ₂	333	3033	3007	-	-	+/-
5	M1.2 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₃ Si	423	3312	3285	3338	3309	+/-
6	M1.2 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3409	3377	-	-	+/-
7	M1.3 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₃ Si i	423	3203	3173	3228	3200	+/-
8	M1.3 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3258	3229	-	-	+/-
9	M1.4 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₃ Si	423	3249	3228	3275	3250	+/-
10	M1.4 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3332	3308	-	-	+/-
11	M1.6 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₃ Si	423	3179	3152	3207	3176	+/-
12	M1.6 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3322	3295	-	-	+/-
13	M2.1 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₄ Si ₂	511	3372	3352	3394	3370	+/+
14	M2.1 2AC	C ₂₆ H ₂₉ NO ₆	451	3574	3545	-	-	
15	M2.2 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₄ Si ₂	511	3357	3333	3379	3351	+/+
16	M2.2 2AC	C ₂₆ H ₂₉ NO ₆	451	3498	3463	-	-	
17	M2.3 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₄ Si ₂	511	3350	3331	3368	3345	+/-
18	M2.4 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₄ Si ₂	511	3333	3311	3352	3327	-/+
19	M2.5 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₄ Si ₂	511	3438	3422	3456	3436	+/-
20	M2.6 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₄ Si ₂	511	3417	3402	3433	3415	+/-
21	M3.1 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	599	3455	3435	3470	3448	+/+
22	M3.2 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	599	3483	3462	3500	3476	+/+
23	M3.3 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	599	3499	3481	3511	3495	+/+
24	M3.4 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	599	3471	3454	3485	3466	+/-
25	M3.5 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	599	3536	-	3552	3532	+/+
26	M3.6 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	599	-	-	3567	3550	+/-
27	M3.7 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	599	-	-	3573	3557	+/-
28	M4.1 TMS	C ₂₅ H ₃₁ NO ₄ Si	437	-	-	3430	3401	-/+
29	M4.1 Me	C ₂₃ H ₂₅ NO ₄	379	-	-	3362	3327	
30	M4.2 TMS	C ₂₅ H ₃₁ NO ₄ Si	437	3354	3327	3376	3344	+/-
31	M4.3 TMS	C ₂₅ H ₃₁ NO ₄ Si	437	3339	3309	3360	3325	+/-
32	M5.1 TMS	C ₂₀ H ₂₃ NO ₂ Si	337	-	-	2800	2768	-/+
33	M5.2 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₃ Si ₂	425	-	-	3052	3032	+/+
34	M5.3 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₃ Si ₂	425	-	-	3022	3006	-/+
35	M5.4 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₃ Si ₂	425	-	-	2987	2960	+/+
36	M5.5 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₃ Si ₂	425	-	-	2968	2937	-/+

Образующийся ГХ артефакт отличается от исходного JWH-250 только наличием двойной связи на боковой цепи. В данном случае также следует сделать вывод о том, что гидроксильная группа у **M1.1**, характеризующегося наиболее интенсивными пиками как в условиях ГХ-МС, так и ЖХ-МС/МС, расположена не на (ω)-звене цепи. Ион, m/z 212 в ЭИ спектрах дериватизированных метаболитов, моногидроксилированных по пентилиндольному остатку при условии локализации гидроксильной группы на боковой цепи образуется аналогично, но в путях масс-спектрометра.

Таблица 4.11. Индексы удерживания метаболитов JWH-250 для двух фаз (слабо- и среднеполярной) в двух температурных режимах.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	HP-5ms		DB-17ms	
				Реж. I	Реж. II	Реж. I	Реж. II
1	JWH-250	C ₂₂ H ₂₅ NO ₂	335	3044	3015	3659	3615
2	M1.1	C ₂₂ H ₂₅ NO ₃	351	3256	3225	-	-
3	M1.1 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3323	3294	4036	3990
4	M1.1 TFA	C ₂₄ H ₂₄ F ₃ NO ₄	447	3072	3048	3629	3600
5	M/A1	C ₂₂ H ₂₃ NO ₂	333	3051	3027	3675	3628
6	M1.2	C ₂₂ H ₂₅ NO ₃	351	3352	3313	-	-
7	M1.2 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3432	3401	4195	4142
8	M1.3	C ₂₂ H ₂₅ NO ₃	351	3230	3200	-	-
9	M1.3 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3288	3256	3968	3922
10	M1.4	C ₂₂ H ₂₅ NO ₃	351	3329	3295	-	-
11	M1.4 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3357	3330	4056	4014
12	M1.6	C ₂₂ H ₂₅ NO ₃	351	3320	3287	-	-
13	M1.6 AC	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄	393	3345	3316	4058	4013
14	M2.1	C ₂₂ H ₂₅ NO ₄	367	3400	3354	-	-
15	M2.1 2AC	C ₂₆ H ₂₉ NO ₆	451	3608	3576	4398	4348
16	M2.2	C ₂₂ H ₂₅ NO ₄	367	3545	3505	-	-
17	M2.2 2AC	C ₂₆ H ₂₉ NO ₆	451	3534	3502	4285	4232
18	M4.1 Me	C ₂₃ H ₂₅ NO ₄	379	3358	3325	4135	4083
19	M4.2	C ₂₂ H ₂₃ NO ₄	365	3497	3460	-	-
20	M4.2 AC	C ₂₄ H ₂₅ NO ₅	407	3516	3479	-	-
21	M4.3 AC	C ₂₄ H ₂₅ NO ₅	407	3444	3404	-	-
22	M5.1 AC	C ₁₉ H ₁₇ NO ₃	307	2893	2859	3539	3490
23	M5.2 2AC	C ₂₁ H ₁₉ NO ₅	365	3233	3205	3965	3920
24	M5.4 2AC	C ₂₁ H ₁₉ NO ₅	365	3178	3144	3919	3871
25	M5.5 2AC	C ₂₁ H ₁₉ NO ₅	365	3095	3061	3793	3737

Метаболиты **M1.4** и **M1.5**, хроматографические пики которых малоинтенсивны, обладают большим ЖХ удерживанием по сравнению с **M1.1-M1.3**, а их ЭР спектры также свидетельствуют о наличии неизмененного метоксибензильного остатка. Метаболит **M1.4** заметен также на газовых хроматограммах, а его ЭИ спектр не содержит иона, m/z 144. Этот факт указывает на гидроксилирование индольного цикла, что было подтверждено

метилованием и ацетилованием (см. далее). Принадлежность минорного **M1.5** также к индольно-гидроксилированным формам предполагается на основании сходства ЖХ удерживания с **M1.4**, структурные особенности которого определены.

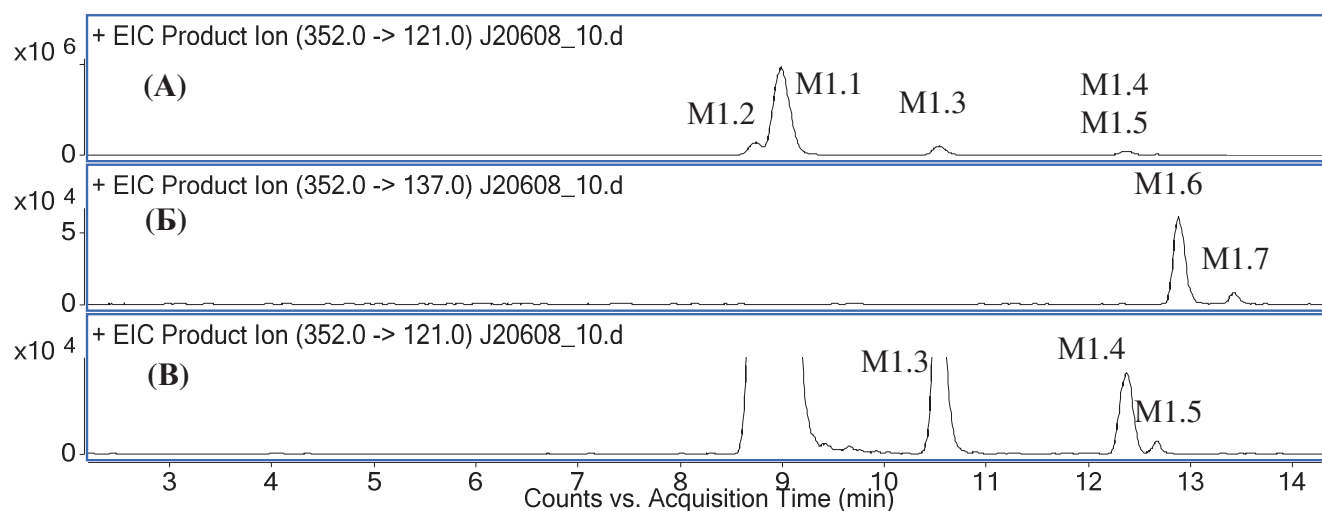


Рис. 4.51. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильной группы на пентилиндольном (А) и метоксибензильном (Б) остатках. Минорные метаболиты (В).

Два оставшихся метаболита, **M1.6** и **M1.7** характеризуются еще большим ЖХ удерживанием по сравнению с индольно-моногидроксилированными формами, а их ЭР спектры содержат интенсивный пик иона, m/z 137 (гидроксилирование метоксибензильного остатка), и малоинтенсивный пик, m/z 214, свидетельствующий о наличии неизменного пентилиндольного остатка. Метаболит **M1.6**, хроматографические пики которого более интенсивны, выявлен также методом ГХ-МС, и его спектр (наличие интенсивного пика иона, m/z 214) подтверждает гидроксилирование метоксибензильного остатка. Положение гидроксильной группы на ароматической части остатка подтверждено метилированием.

ГХ удерживание как JWH-250, так и его метаболитов несколько ниже, нежели у нафтоиндолов, что позволяет детектировать их с большей чувствительностью. Поскольку содержание JWH-250 в курительных смесях несколько выше, чем у нафтоиндолов, то эти два фактора позволяют в ряде случаев наблюдать метаболиты JWH-250 в мочевых образцах без дериватизации. Также, как и при анализе триметилсилилированных образцов, метаболит **M1.1** представлен наиболее интенсивным пиком.

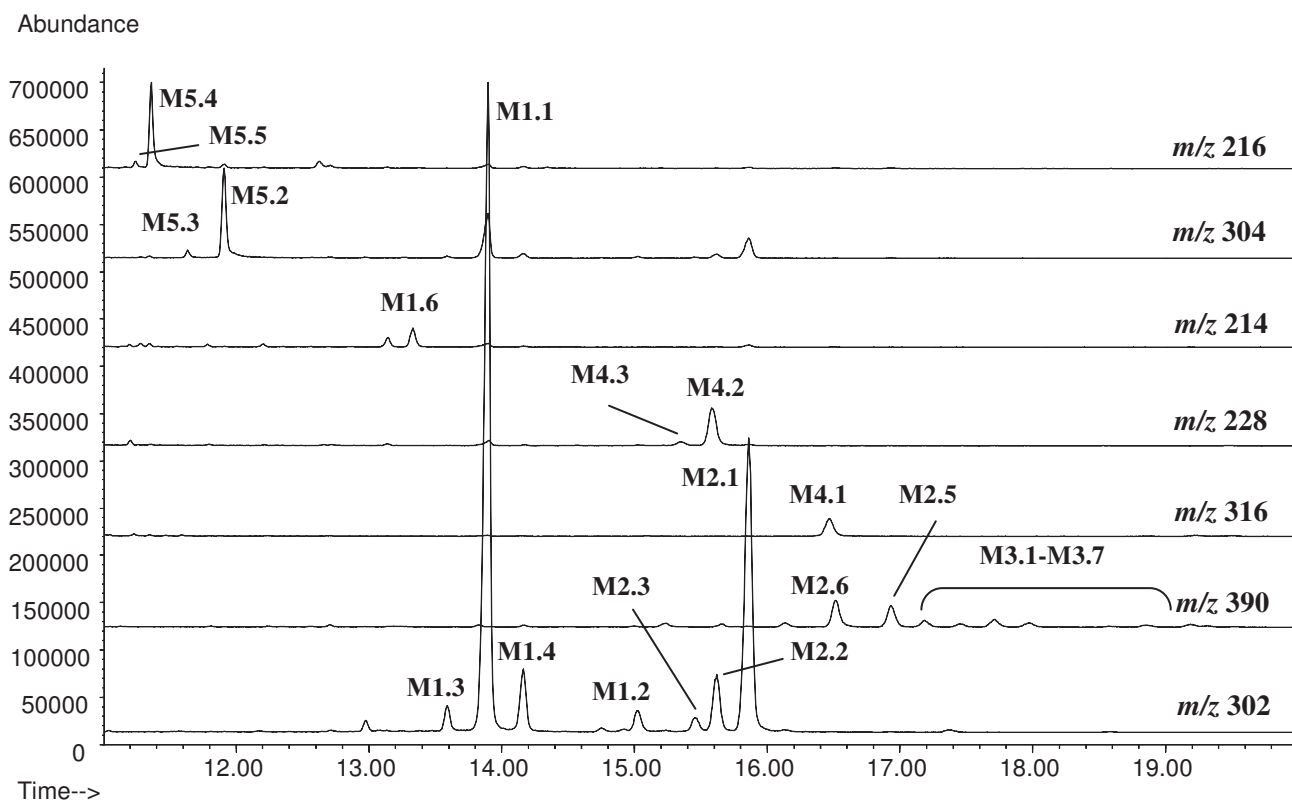


Рис. 4.52. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

Дериватизация ацетилированием приемлема, но не представляет никаких преимуществ перед триметилсилилированием. Ацетатные дериваты характеризуются большим удерживанием и элюируются в виде более широких (и затянутых в области тьла) зон, нежели TMS дериваты. Оба отличия приводят к снижению эффективной чувствительности определения. Следует отметить также, что обнаружение карбоксилированного метаболита (**M4.1**) в образцах, подвергнутых только ацетилированию, крайне маловероятно.

Моногидроксилированные метаболиты не были обнаружены в моче крыс.

Дигидроксилированные метаболиты M2.1-M2.8 (M.w. = 367). Любопытной особенностью метаболизма JWH-250 (и других рассмотренных фенилацетилндолов) у человека можно считать то, что их хроматографические пики обладают относительно высокой (хотя и меньшей, нежели у JWH-210) интенсивностью. Пользуясь в отсутствие аналитических стандартов этим критерием, следует заключить, что наиболее предпочтительным для вторичного гидроксилирования является ароматическая часть метоксибензильного остатка. К этой группе относятся метаболиты **M2.1-M2.3**, Рисунок 4.53.

Согласование пиков дигидроксилированных метаболитов, наблюдаемых методами ГХ и ЖХ, не проводили, поэтому ЭР спектры были зарегистрированы на их максимумах. Для группы **M2.1-M2.3** эти спектры содержат пики ионов, m/z 137 и 186, которые (так же, как и для

моногидроксилированных метаболитов) свидетельствуют о расположении гидроксильных групп на N-пентильной цепи и на метоксибензильном остатке. ЭУ спектры **M2.1** и **M2.2** в свободной и дериватизированных (TMS и AC) формах содержат пики ионов, m/z 144 (неизмененный индольный цикл), а также 230, 272 и 302 для свободной, AC и TMS форм, соответственно, что безусловно подтверждает предложенные структуры. Некоторые сомнения могут возникать по поводу минорного **M2.3**, однако, его спектр содержит пик иона, m/z 158, весьма характерного для ЭИ и ЭР фрагментации N-алкилиндольных каннабимиметиков, гидроксилированных по боковой цепи.

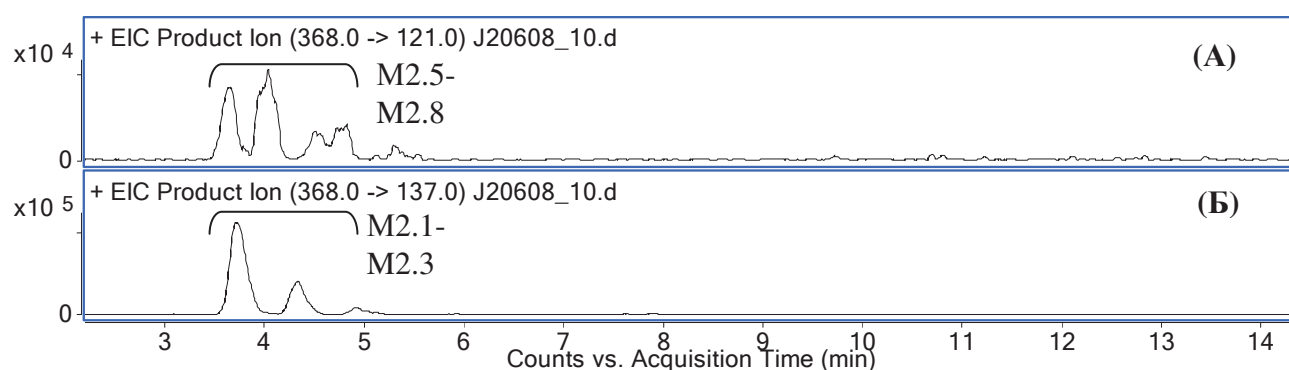


Рис. 4.53. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Дигидроксилированные метаболиты с расположением обеих (А) и одной (Б) на пентилиндольном остатке.

Последний метаболит этой группы, **M2.4** (Рисунок 4.54), был найден только в моче крыс, и в его ЭИ спектре также присутствует пик иона, m/z 158. Кроме **M2.4**, в моче крыс были найдены дигидроксилированные метаболиты, характерные для человека – **M2.1** и **M2.2**, хотя их относительное содержание по сравнению с другими формами было невелико.

Малоинтенсивные метаболиты **M2.5** и **M2.6** (Рисунок 4.52 и 4.55) были найдены только в моче человека. Их структуру определяли по наличию интенсивных пиков ионов, m/z 390, в ЭИ спектрах, что указывает на дигидроксилирование пентилиндольного остатка. Одна из гидроксильных групп метилируется и, следовательно, расположена на индольном цикле; другая локализована на боковой цепи.

Судя по жидкостной хроматограмме (Рисунок 4.53), существует, по крайней мере, еще два метаболита с расположением обоих гидроксильных групп на пентилиндольном остатке. Однако, детализация их структур затруднена; из-за малого содержания эти соединения наблюдали только методом ЖХ-МС/МС. ЖХ соэлюирование **M2.5-M2.8** с интенсивными **M2.1-M2.3** не позволило зарегистрировать ЭР спектры во всех максимумах хроматографических

пиков, однако спектр, зарегистрированный при $t_R = 4$ мин, не противоречит предложенным структурам.

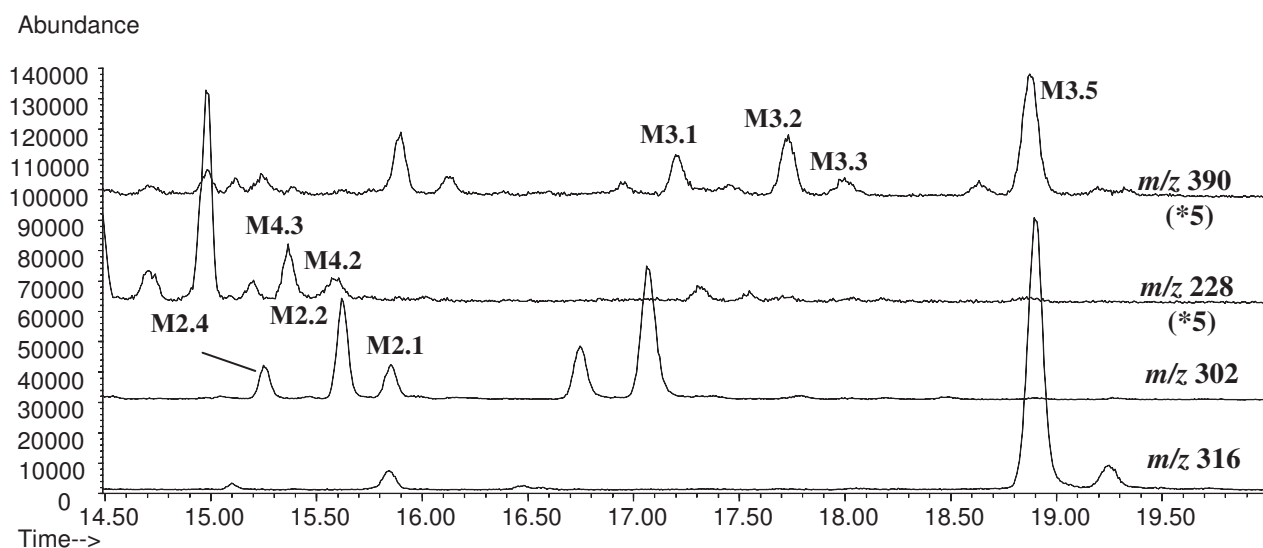


Рис. 4.54. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи крысы. Кратно окисленные метаболиты JWH-250, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

Тригидроксилированные метаболиты M3.1-M3.7 (M.w. = 383). Семь тригидроксилированных метаболитов наблюдали только методом ГХ-МС, Рисунок 4.55. ЭИ спектры всех этих соединений почти идентичны, содержат пик иона, m/z 390 и информативны в плане локализации только одной гидроксильной группы на метоксибензильном остатке. Малое содержание всех тригидроксилированных метаболитов не позволяет надежно отрицать наличие пика иона, m/z 144, и установить местонахождение двух других гидроксильных групп.

Метаболиты **M3.1-M3.3** и **M3.5** были найдены также в моче крыс, Рисунок 4.54. Подобно дигидроксилированным метаболитам, их относительное содержание невелико.

Карбоксилированный метаболит M4.1. Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой M4.2 и M4.3 (M.w. = 365). ЭР спектр карбоксилированного метаболита (Рисунок 4.56) содержит только один пик иона, m/z 121, соответствующего неизмененному метоксибензильному остатку. ЭИ спектр **M4.1** также не позволяет провести дальнейшую детализацию структуры: интенсивный пик иона, m/z 316 свидетельствует только о локализации гидроксильной и карбонильной групп в пределах пентилиндольного остатка. Свидетельство о наличии карбоксильной группы у **M4.1** получили по результатам проведения этерификации метанолом в присутствии соляной кислоты. ЭИ спектр метилата имеет интенсивные пики ионов, m/z 258 (наличие метокси- и карбонильной групп на пентилиндольном остатке и m/z

144. Дополнительно, следует отметить, что ЖХ удержание метаболита **M4.1** не противоречит предложенной структуре.

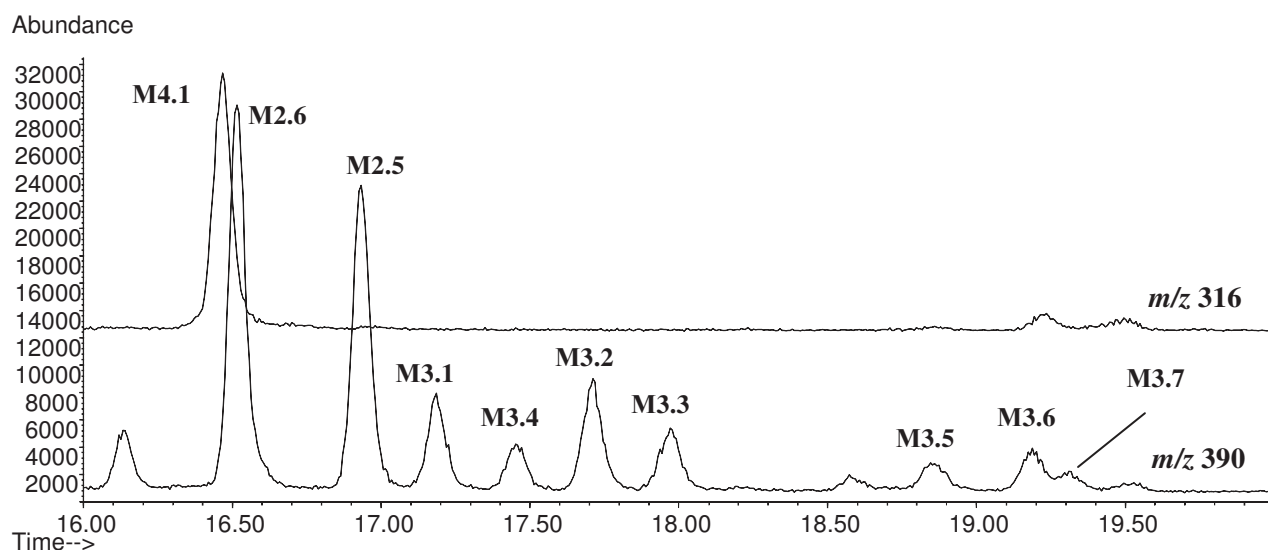


Рис. 4.55. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Полигидроксилированные и карбоксилированный метаболиты JWH-250, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

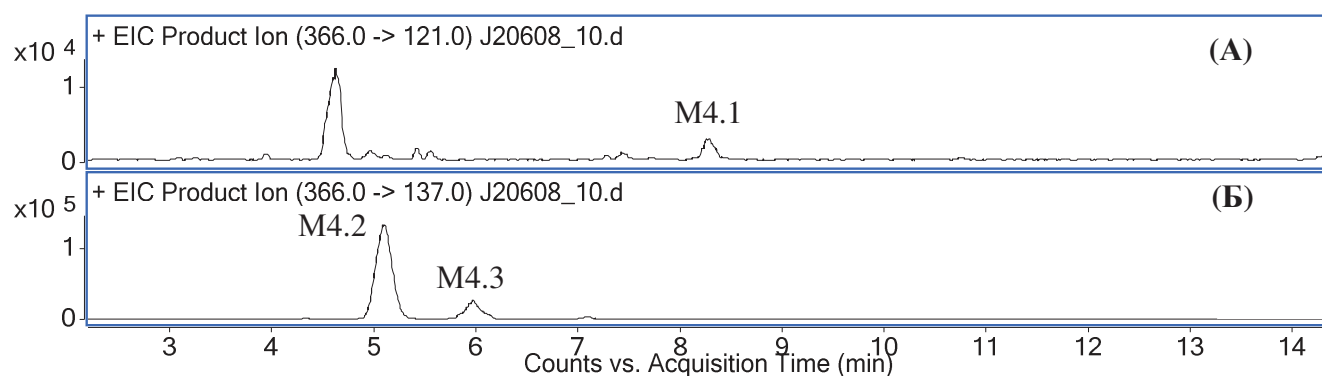


Рис. 4.56. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Карбоксилированный метаболит (А). Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи (Б).

Метаболиты **M4.2** и **M4.3** характеризуются гораздо более низким ЖХ удерживанием. Кроме интенсивного пика иона, m/z 137, их ЭР спектры имеют пики ионов, m/z 85 (оксопентилиум-ион) – весьма характерный маркер подобных соединений (см. далее). Оба этих соединения присутствуют в моче крыс при весьма низком содержании.

N-Дезалкилированный метаболит **M5.1** (M.w. = 265). Моногидроксилированные дезалкилированные метаболиты **M5.2-M5.5** (M.w. = 281). Подобно случаям JWH-073 и JWH-

018, простейший N-дезалкилированный метаболит нашли только в моче крыс. Из-за малого содержания **M5.1** наблюдали только в форме ацетатного деривата. Пик молекулярного иона в его ЭИ спектре не зарегистрирован, но наличие пика иона, m/z 186, соответствующего N-ацетилированному оксиметилиндольному остатку и m/z 144 – продукта элиминирования молекулы кетена (C_2H_2O) – позволяет надежно установить структуру.

Метаболиты **M5.2** и **M5.3**, моногидроксилированные по индольному остатку, найдены как в образцах мочи человека, так и крыс, Рисунки 4.57 и 4.58. Их ЭР спектры (присутствие пиков ионов, m/z 121 и 91) указывают на наличие неизмененного метоксибензильного остатка. ЭУ спектры TMS дериватов содержат интенсивный пик иона, m/z 304, свидетельствующего о гидроксилировании индольного остатка, а спектр АС деривата (**M5.2**) – три пика (m/z 160, 202 и 244), подтверждающих данное заключение, причем первые два из них указывают на легкое элиминирование молекулы кетена от ароматических гидроксильных групп и индольного азота.

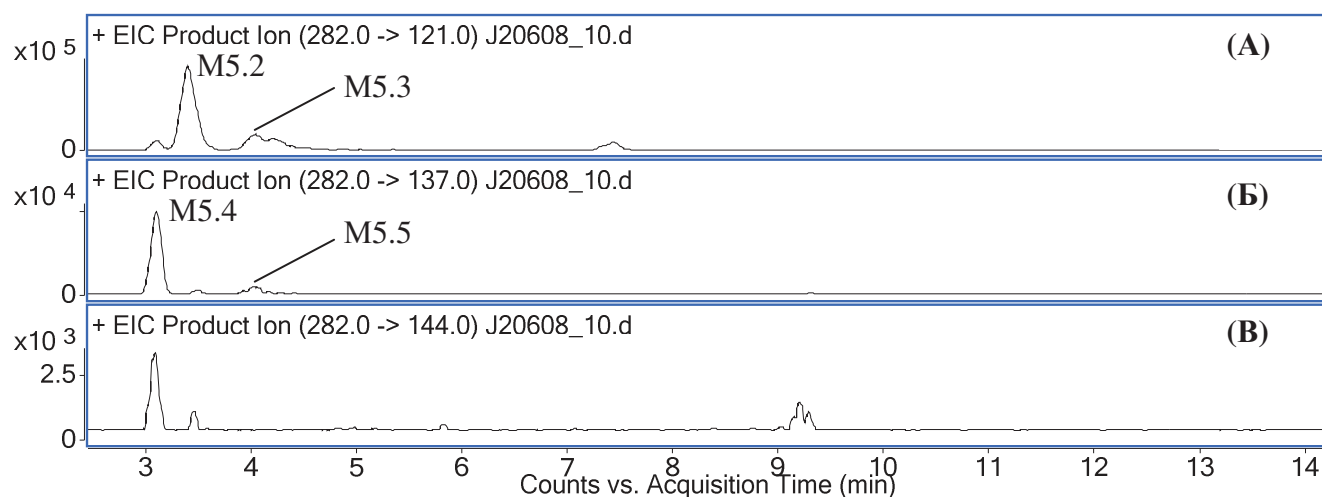
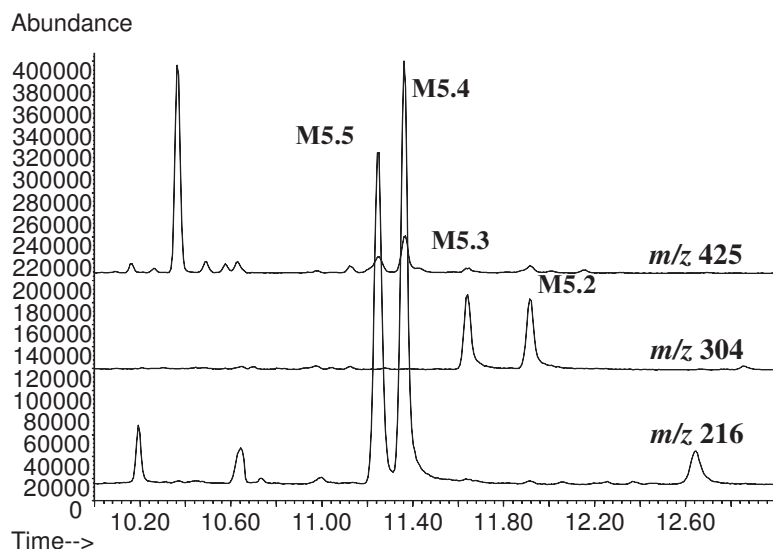


Рис. 4.57. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (ферментативный гидролиз). Дезалкилированные гидроксилированные метаболиты с гидроксильной группой на индольном (А) и метоксибензильном (Б) и (В) остатках.

Два оставшихся дезалкилированных метаболита (**M5.4** и **M5.5**) моногидроксилированы по фенильному остатку. ЭИ спектры их АС дериватов (ионы m/z 144 и 186) указывают на наличие неизмененного N-ацетилированного индольного остатка. ЭИ спектры TMS дериватов имеют интенсивный пик иона, m/z 216, соответствующего этому же остатку в N-триметилсилилированной форме. Все заключения, сделанные по дезалкилированным метаболитам, подтверждены ЭИ фрагментацией их метилированных дериватов. По нашему мнению, ввиду реакционной способности метиленовой группы бензильного остатка фенилацетилиндолов, обнаружение дезалкилированных метаболитов методом ГХ-МС удобно

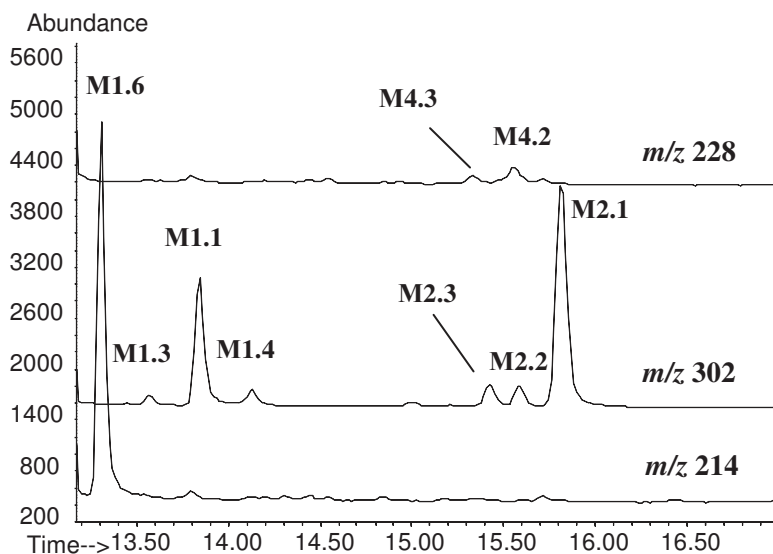
выполнять после ацетилирования или триметилсилилирования образцов, несмотря на малую стабильность этих дериватов.

Рис. 4.58. Дезалкилированные моногидроксилированные метаболиты в образце мочи крысы. ГХ-МС (ЭИ), TMS (колонка VF-5ms, режим I)



Обнаружение метаболитов JWH-250 в сыворотке крови человека. На Рисунке 4.59 приведена хроматограмма (ГХ-МС) сыворотки крови человека, употреблявшего JWH-250. Для регистрации применяли режим SIM по 8 ионам (144, 214, 228, 302, 390, 427, 441 и 515).

Рис. 4.59. ГХ-МС (ЭИ) хроматограмма сыворотки крови человека, кислотное деконъюгирование, TMS (колонка VF-5ms, режим I).



Можно отметить значительное несоответствие сывороточного метаболического профиля мочевого (Рисунок 4.52). Основным компонентом в сывороточной смеси является метаболит **M1.6** (моногидроксилированный по метоксибензильному остатку), относительное содержание которого в мочевой смеси незначительно. Можно предположить, что перед экскрецией этот метаболит претерпевает повторное гидроксилирование по боковой цепи, и далее (возможно, после конъюгирования) экскретируется в виде соответствующих дигидроксилированных форм - интенсивного **M2.1** или **M2.2** и **M2.3**. Нативный JWH-250 в данном образце не обнаружили, что возможно, обусловлено сравнительно малыми возможностями метода ГХ-МС.

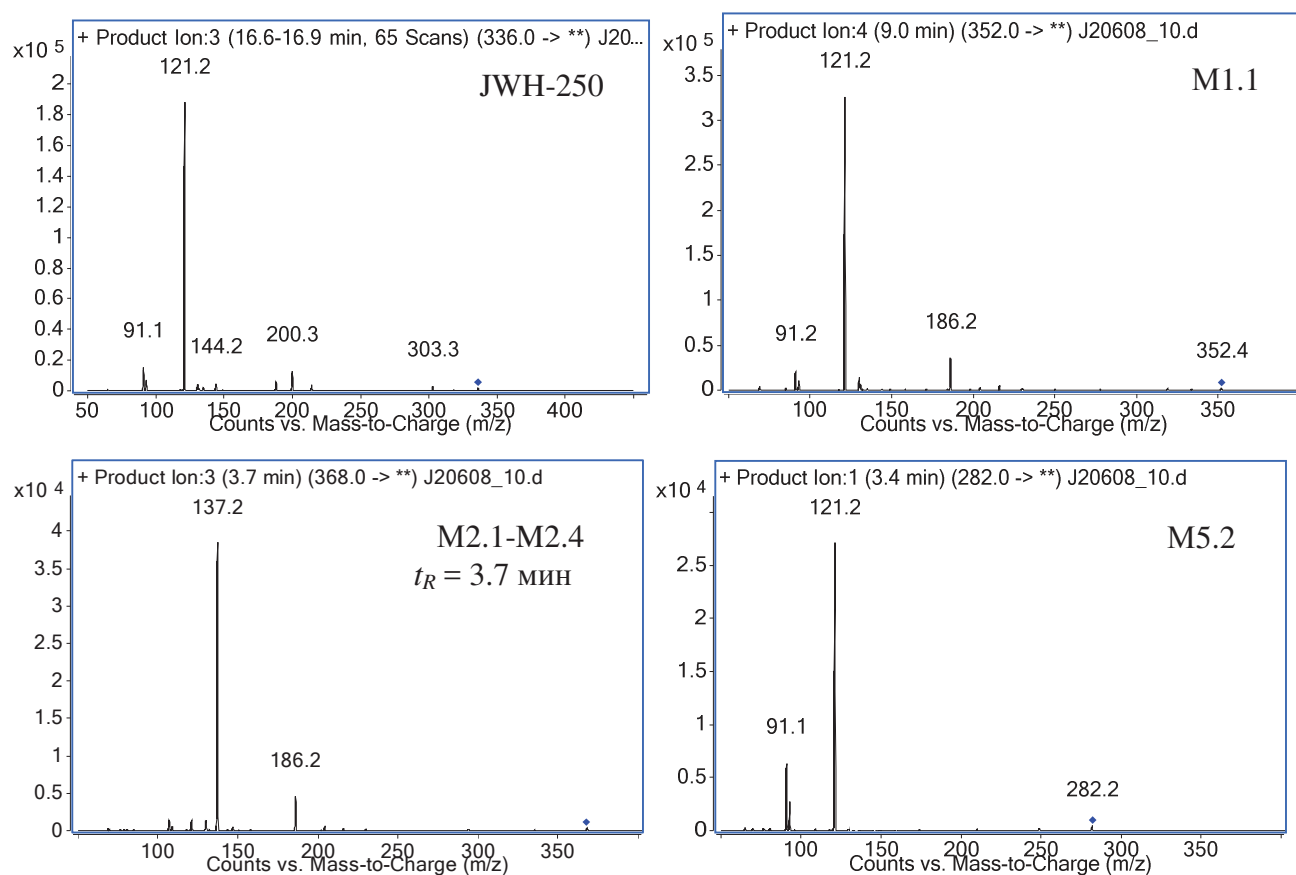


Рис. 4.60. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) JWH-250 и его метаболитов.

Полуколичественные измерения. В Таблице 4.12 приведены площади метаболитов JWH-250 (% , относительно **M1.1**) в образцах мочи человека. Следует отметить чрезвычайную вариабельность относительного содержания метаболитов **M2.1** (дигидроксилированный) и **M4.2** (гидроксилированный с карбонильной группой). Моногидроксилированный метаболит **M1.1** характеризуется наиболее интенсивными хроматографическими пиками примерно в 70% образцов.

Обоснованием подобного поведения могут служить диаграммы экскреции метаболитов JWH-250 с мочой человека, Рисунок 4.63. Для измерения площадей использованы те же ионы, что приведены в Таблице 4.12. Все три диаграммы составлены по результатам перорального приема JWH-250, тем не менее, отмечается весьма быстрая экскреция всех метаболитов: наиболее концентрированными найдены первые образцы мочи в каждой серии, собранные через 4, 7 и 5 часов в случаях *C1*, *C2* и *C3*, соответственно.

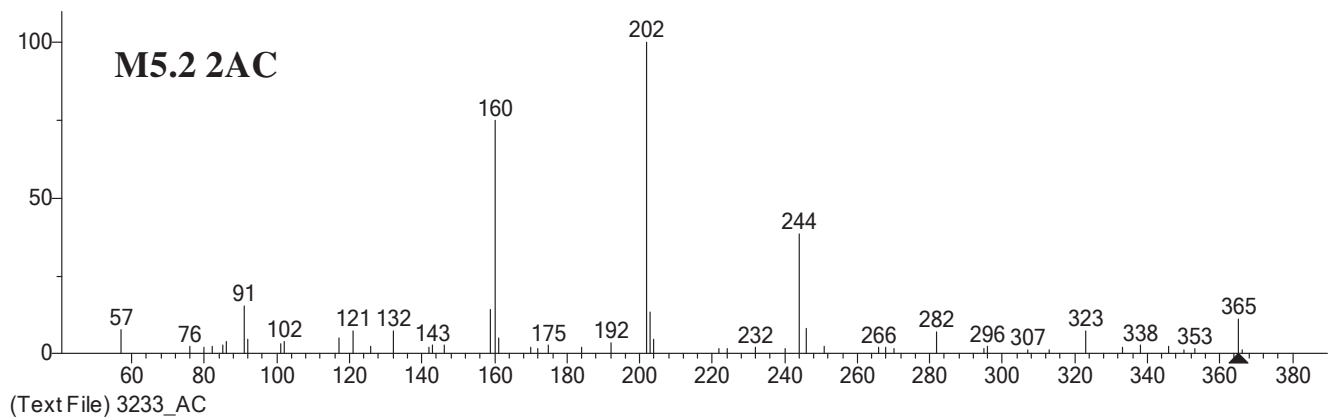
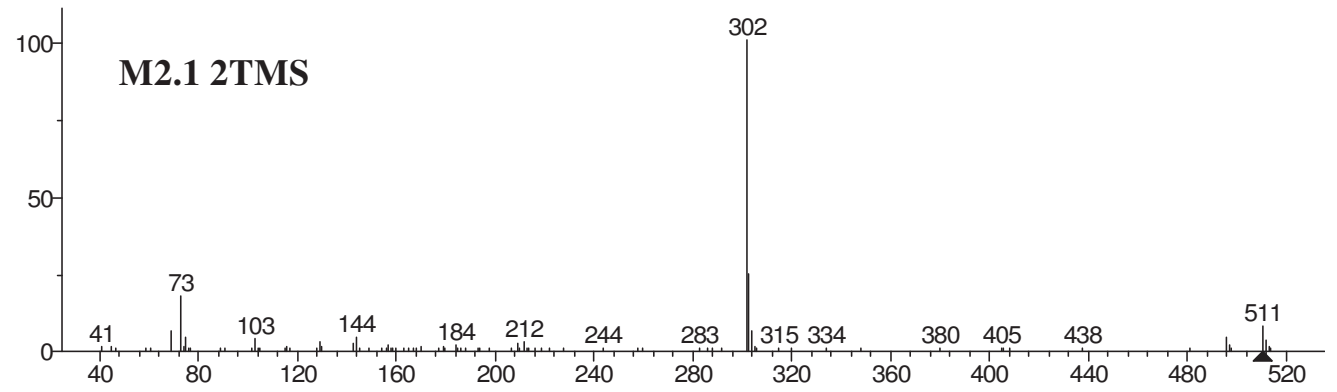
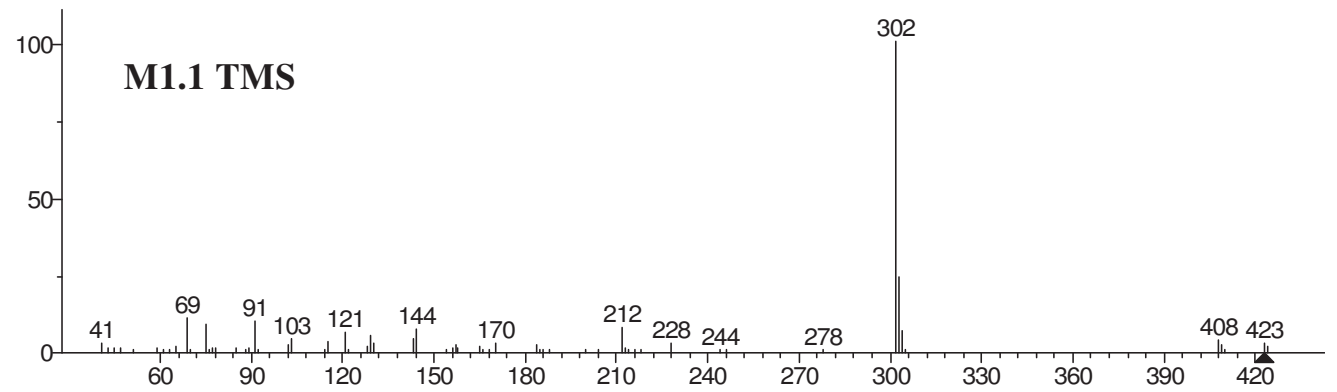
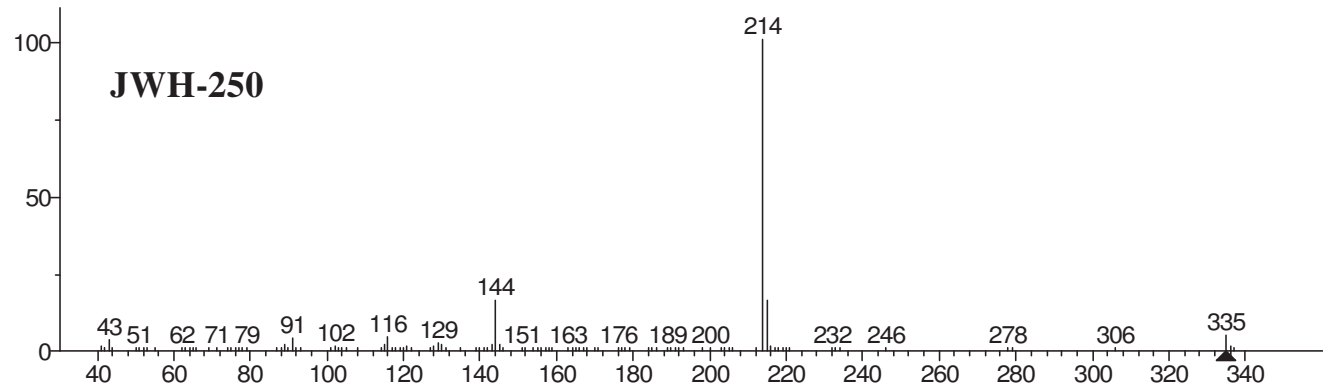


Рис. 4.61. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) JWH-250 и его метаболитов.

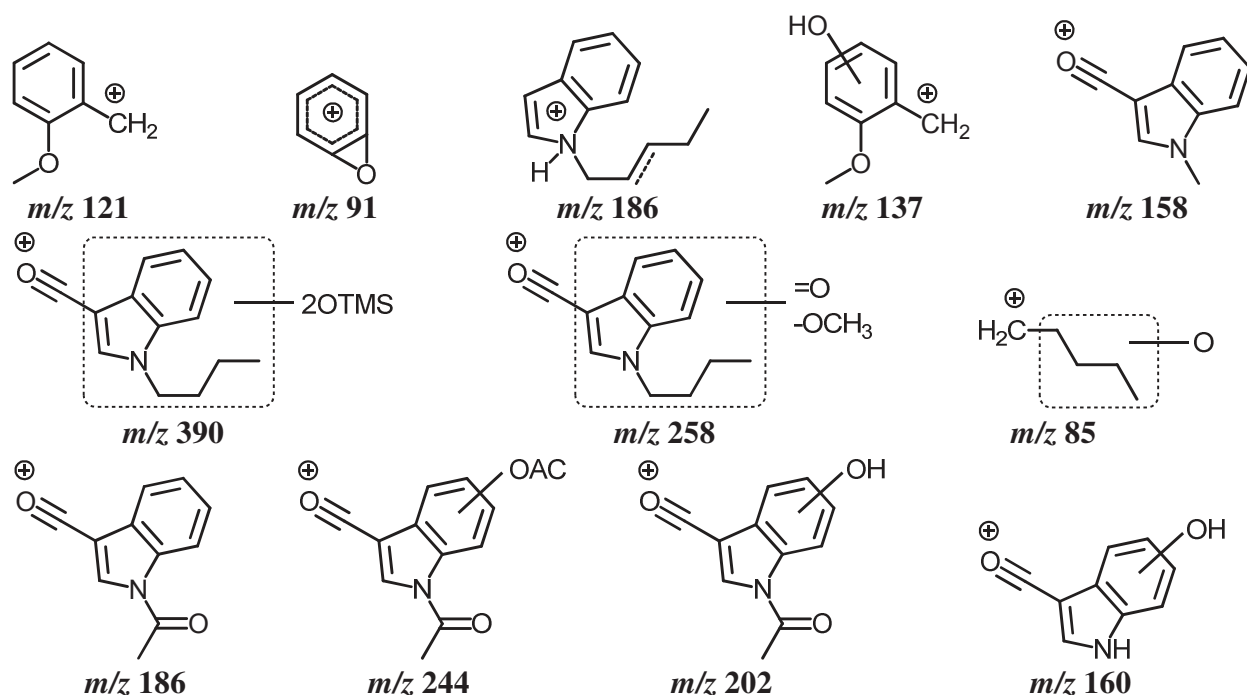


Рис. 4.62. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) JWH-250 и его метаболитов.

Содержания всех метаболитов быстро снижаются: относительные концентрации **M1.1** в последующих образцах мочи (9, 12 и 10 часов, соответственно) составляют менее 10% от изначальной. Присутствие метаболитов в моче наблюдали вплоть до 187 ч. после приема (случай C2, метаболиты **M1.1**, **M2.1** и **M2.2**) Относительная концентрация метаболита **M1.1** (исходно характеризующемся наиболее интенсивными хроматографическими пиками), снижается, и далее преобладаюткратно окисленные **M2.1** и **M3.1**. Следовательно, можно предположить, что те образцы, в которых относительные площади этих метаболитов больше **M1.1** (Таблица 4.12) собраны спустя значительное время после приема JWH-250.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [32, 307, 310, 311, 323-326].

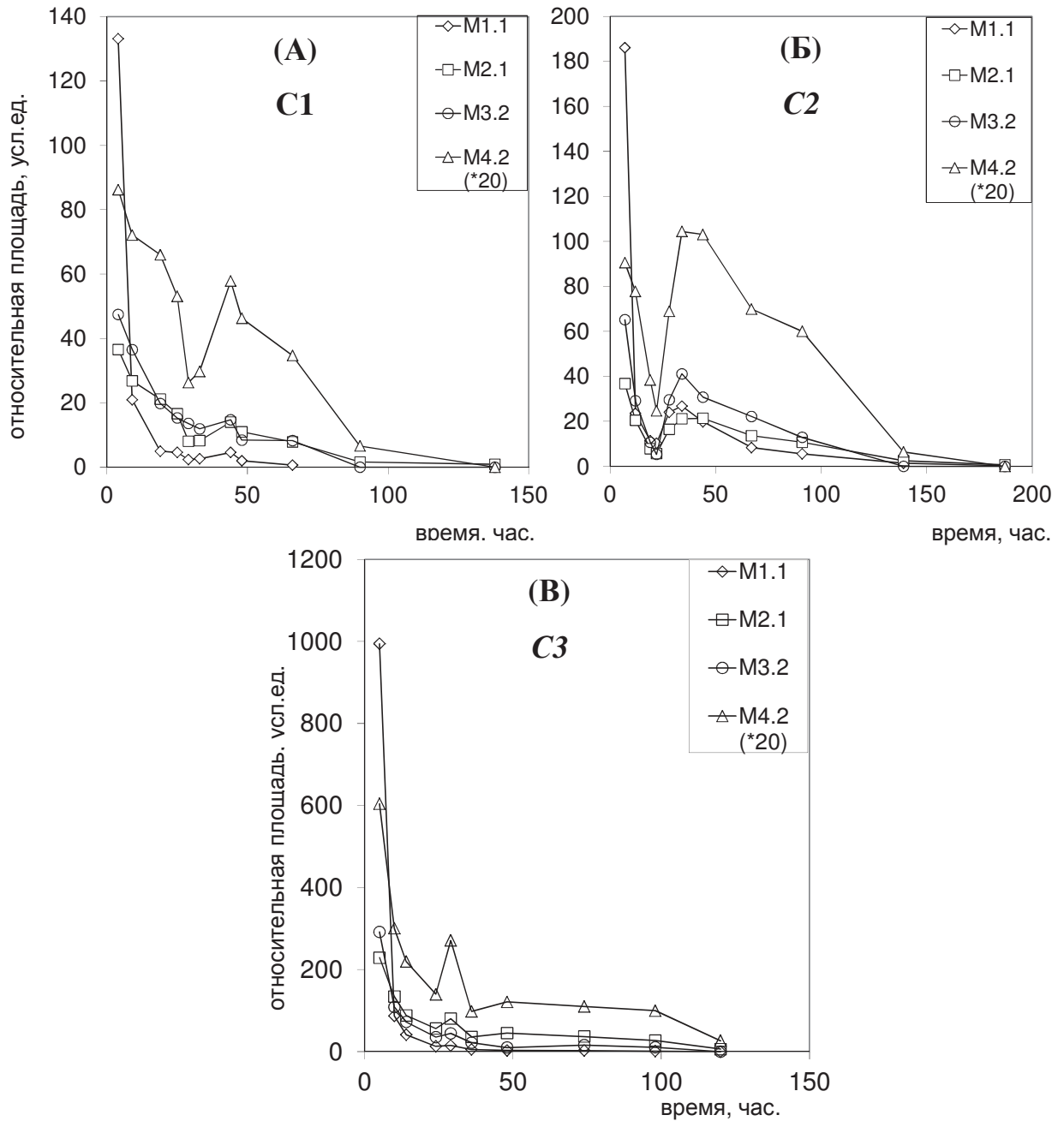


Рис. 4.63. Экскреция метаболитов JWH-250 с мочой, случаи *C1* (А), *C2* (Б) и *C3* (В). Относительная площадь **M4.2** показана увеличенной в 20 раз.

Таблица 4.12. Отношения площадей пиков разнородных метаболитов, %, к площади пика метаболита **M1.1** в образцах мочи человека (ГХ-МС, TMS). Площадь **M1.1** измеряли по ион-хроматограммам (EIC, m/z 302).

Номер образца	Метаболиты (m/z)					
	M2.1 (302)	M2.6 (390)	M4.2 (228)	M4.1 (316)	M3.2 (390)	M5.2 (304)
1	28	1.9	3.5	1.9	1.7	н.о.
2	19	1.4	2.4	0.5	1.9	н.о.
3	14	1.4	4.0	н.о.	н.о.	11
4	15	2.0	0.8	н.о.	н.о.	4.7
5	21	0.0	3.6	н.о.	н.о.	1.4
6	21	1.3	4.5	н.о.	н.о.	16
7	23	1.7	3.1	0.6	1.6	н.о.
8	50	7.9	9.6	4.9	6.0	39
9	50	6.1	8.4	3.2	1.3	14
10	54	6.2	50	1.4	12	н.о.
11	55	3.9	9.9	3.8	1.3	9.2
12	61	16	10	н.о.	н.о.	29
13	71	5.5	7.6	2.5	3.1	н.о.
14	76	23	8.4	2.5	1.1	4.7
15	83	2.9	17	1.4	5.6	н.о.
16	90	6.4	8.4	1.9	2.6	5.6
17	119	3.2	16	3.4	6.1	н.о.
18	152	9.8	28	н.о.	10	н.о.
19	153	3.9	26	8.8	2.3	13
20	154	13	37	н.о.	6.0	н.о.
21	179	17	19	3.8	3.0	11
22	227	6.9	26	4.3	7.9	н.о.
23	410	7.1	65	13	16	н.о.

Примечание: «н.о.» – относительную площадь пика метаболита в данном образце не определяли.

4.7. Выявление метаболитов JWH-203

Синтетический каннабимиметик JWH-203 – соединение с атомом хлора в структуре (2-(2-хлорофенил)-1-(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)этанон) был синтезирован вместе с другими соединениями фенилацетилиндольной группы группой Huffman [321]. Эта работа была опубликована в 2005 г. а в 2010 г. JWH-203 был обнаружен в продаже на рынке психотропных средств в Германии. По нашим наблюдениям, популярность JWH-203 в РФ ко времени его наибольшего присутствия в стране была весьма высокой, хотя и несколько уступала JWH-250. Константа аффинности JWH-203 к CB1R весьма высока ($K_i=8$ нМ) [321], хотя (и это замечание справедливо для остальных каннабимиметиков также) действие каждого соединения обладает особенностями, публикуемыми курильщиками на тематических форумах Интернет.

Для исследования мочевого метаболического профиля JWH-203 использовали следующие образцы мочи:

- крыс (2), получивших JWH-203;
- персон (51), доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями.

Один образец JWH-203 (оранжевый порошок) был куплен у анонимного распространителя через Интернет. Аутентичность и примерное содержание JWH-203 (>90 %) проверяли методами ГХ-МС, ВЭЖХ-ДМД, ЖХ-МС/МС и ТСХ. Данный образец применяли для испытаний на крысах.

Испытания на крысах. В испытаниях использовали две аутбредные крысы-самцы Wistar весом 280-300 г, лишённые доступа к корму за сутки до эксперимента. Одной крысе суспензию JWH-203 в 1.5% крахмальном геле вводили внутривентрикулярно, с помощью зонда в дозе 100 мг/кг, второй - интраперитонеально. Значительных изменений поведения животных не отметили. Через 30 мин. после введения суспензии животных помещали на сутки в метаболические кюветы со свободным доступом к воде. Образцы мочи каждой крысы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. и хранили при -20°C не более двух недель.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, сортировали так же, как и для случая JWH-018.

Случаи, использованные для измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

C1 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 24 ч. после приема; столь раннее прекращение сбора было обусловлено малым содержанием метаболитов.

C2 – курение. Мочу собирали в течение 234 ч.

Подготовка проб и условия анализа. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных, и ацетилированных образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS образцов.

Всего охарактеризовали 35 соединений. Их структурные формулы приведены на Рисунке 4.64, индексы удерживания дериватов – в Таблице 4.13. Нативный JWH-203 не был найден ни в одном из образцов. Деконъюгирование проводили кислотным или ферментативным методами (Приложение 1), экстрагировали и анализировали методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС.

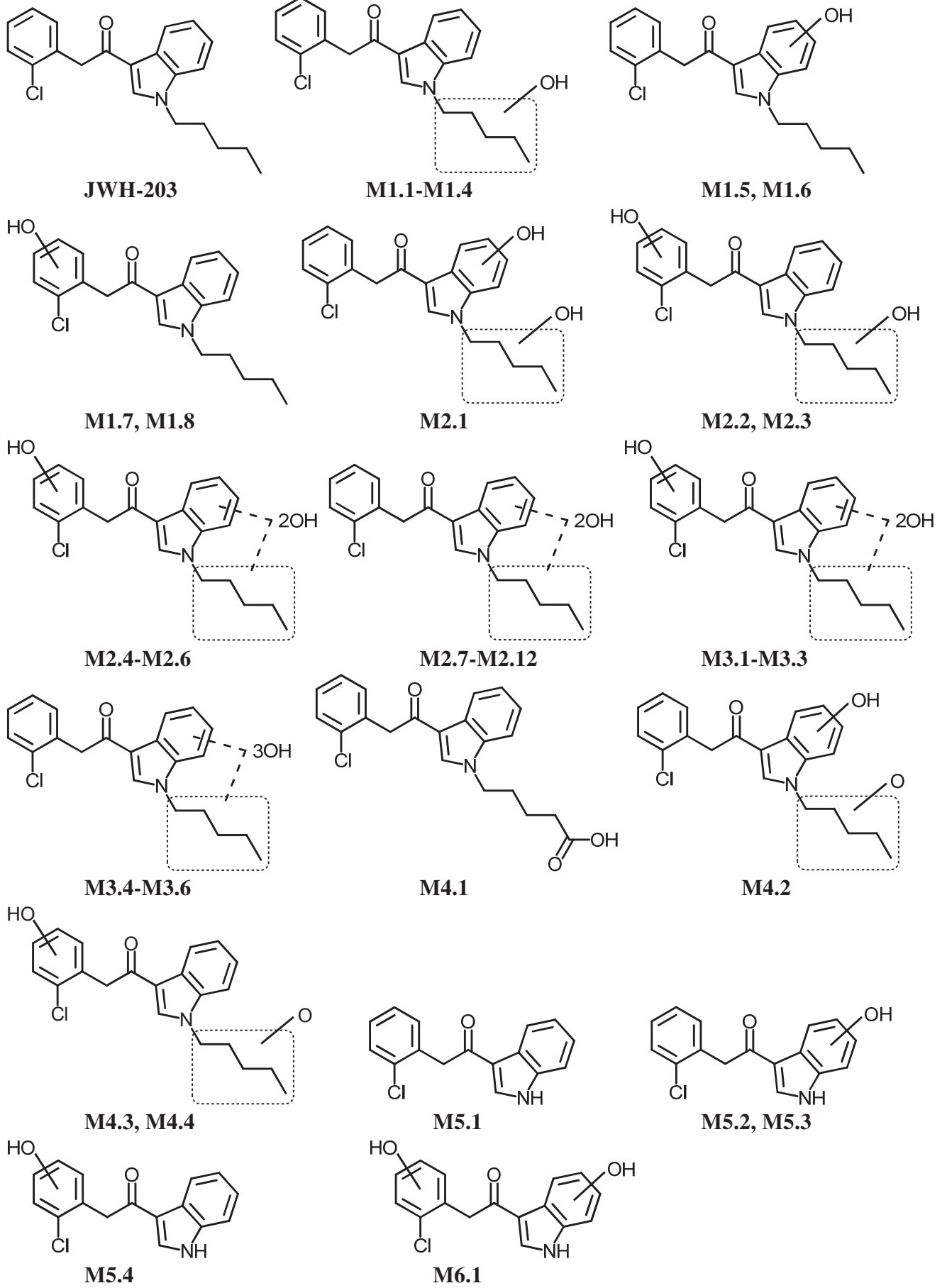


Рис. 4.64. Структуры JWH-203 и его метаболитов.

Таблица 4.13. Индексы удерживания метаболитов JWH-203 для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах. Обнаружение метаболитов в моче человека (Ч) и крысы (К).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	VF-5ms		HP-5ms		Фр. №	Ч./К.
				Реж. I	Реж. II	Реж. I	Реж. II		
1	JWH-203	C ₂₁ H ₂₂ ClNO	339	-	-	3031	3000	-	-
	M1.1	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₂	355	-	-	3264	3225	4	+/-
2	M1.1 TMS	C ₂₄ H ₃₀ ClNO ₂ Si	427	3242	3212	-	-	4	+/-
3	M1.1 AC	C ₂₃ H ₂₄ ClNO ₃	397	-	-	3319	3286	4	+/-
5	M1.2 TMS	C ₂₄ H ₃₀ ClNO ₂ Si	427	3331	3301	-	-	4	+/-
6	M1.2 AC	C ₂₃ H ₂₄ ClNO ₃	397	-	-	3428	3393	4	+/-
7	M1.3 TMS	C ₂₄ H ₃₀ ClNO ₂ Si	427	3317	3285	-	-	3	+/-
	M1.4 TMS	C ₂₄ H ₃₀ ClNO ₂ Si	427	3218	3185	-	-	4	+/-
9	M1.5 TMS	C ₂₄ H ₃₀ ClNO ₂ Si	427	3269	3242	-	-	5	+/-
	M2.1 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3429	3410	-	-	3	+/-
	M2.2 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3478	3450	-	-	3	+/+
	M2.3 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3495	3468	-	-	3	+/+
	M2.4 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3193	3171	-	-	3	+/-
	M2.5 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3353	3328	-	-	3	+/-
	M2.6 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3381	3355	-	-	3	+/-
	M2.7 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3336	3319	-	-	4	+/-
	M2.8 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3341	3314	-	-	3	+/-
	M2.9 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3371	3343	-	-	3	+/-
	M2.10 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3406	3385	-	-	3	+/-
	M2.11 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3427	3402	-	-	3	+/-
	M2.12 2TMS	C ₂₇ H ₃₈ ClNO ₃ Si ₂	515	3452	3430	-	-	3	+/-
	M3.1 3TMS	C ₃₀ H ₄₆ ClNO ₄ Si ₃	603	3568	3544	-	-	2	+/-
	M3.2 3TMS	C ₃₀ H ₄₆ ClNO ₄ Si ₃	603	3596	3572	-	-	2	+/-
	M3.3 3TMS	C ₃₀ H ₄₆ ClNO ₄ Si ₃	603	3650	3629	-	-	2	+/-
	M3.4 3TMS	C ₃₀ H ₄₆ ClNO ₄ Si ₃	603	3512	3496	-	-	2	+/-
	M3.5 3TMS	C ₃₀ H ₄₆ ClNO ₄ Si ₃	603	3541	3526	-	-	2	+/-
	M3.6 3TMS	C ₃₀ H ₄₆ ClNO ₄ Si ₃	603	3618	3602	-	-	2	+/-
28	M4.1 TMS	C ₂₄ H ₂₈ ClNO ₃ Si	441	3428	3396	-	-	3	+/-
29	M4.1 Me	C ₂₂ H ₂₂ ClNO ₃	383	3366	3328	-	-	3	+/-
30	M4.2 TMS	C ₂₄ H ₂₈ ClNO ₃ Si	441	3368	3348	-	-	3	+/-
31	M4.3 TMS	C ₂₄ H ₂₈ ClNO ₃ Si	441	3469	3432	-	-	3	+/-
	M4.4 TMS	C ₂₄ H ₂₈ ClNO ₃ Si	441	3484	3449	-	-	3	+/-
32	M5.1 AC	C ₁₈ H ₁₄ ClNO ₂	311	-	-	3095	3083	-	-/+
33	M5.2 2TMS	C ₂₂ H ₂₈ ClNO ₂ Si ₂	429	3044	3022	-	-	3	+/+
	M5.2 2AC	C ₂₀ H ₁₆ ClNO ₄	369	-	-	3247	3215	3	+/+
34	M5.3 2TMS	C ₂₂ H ₂₈ ClNO ₂ Si ₂	429	3013	2996	-	-	3	+/+
35	M5.4 2TMS	C ₂₂ H ₂₈ ClNO ₂ Si ₂	429	3062	3035	-	-	-	-/+
	M5.4 2AC	C ₂₀ H ₁₆ ClNO ₄	369	-	-	3167	3125	-	-/+
	M6.1 3AC	C ₂₂ H ₁₈ ClNO ₆	427	-	-	3477	3440	-	-/+

Концентрирование метаболитов JWH-203 проводили методом полупрепаративной ВЭЖХ-ДМД (Приложение 1), колонка Zorbax SB-C18. 12 мл мочи обработали по схеме

кислотного гидролиза. Сухой остаток растворили в этилацетате (0.5 мл) и для предварительной очистки пропускали через патрон AccuBond SPE ODS-C18 (200 мг × 3 мл, Agilent), предварительно промытый 6 мл этилацетата. Сорбент промывали 2 мл этилацетата, объединенные элюаты упаривали. Сухой остаток растворяли в элюенте (100 мкл) и разделяли на 8 фракций при изократическом элюировании (вода-ацетонитрил 2:8 об.) со стадией очистки (4.5 мин после ввода, длительность 1 мин., ацетонитрил). Скорость потока была 1 мл/мин, вводимый объем 40 мкл. Времена отбора фракций, мин: (1) 1.4-1.6, (2) 1.6-1.8, (3) 1.8-2.3, (4) 2.3-2.8, (5) 2.8-3.3, (6) 3.3-3.8, (7) 3.8-4.3, (8) 4.3-4.8. Мертвый объем системы оценивали по удерживанию урацила (1.25 мин); удерживание нативного JWH-203 составляло 5.60 мин. Каждую фракцию упаривали в вакуумном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) досуха и анализировали методом ГХ-МС.

МС фрагментация исходного JWH-203. Фрагментация JWH-203 как в ЭИ, так и в ЭР режимах полностью подобна JWH-250, Рисунки 4.73-4.75. Хлоробензильный остаток проявляется в ЭИ спектре в виде малоинтенсивного пика иона, m/z 125, Рисунок 4.74. Этот же пик наиболее интенсивен в ЭР спектре, а ионы, m/z 188 и 214 соответствуют оксометилпентилиндольному и пентилиндольному остаткам.

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.8 (M.w. = 355). В целом, мочевой метаболический профиль JWH-203 мало отличается от JWH-250. Четыре из шести выявленных моногидроксилированных метаболитов (M1.1-M1.4) гидроксилированы по боковой цепи. Хроматограммы приведены на Рисунках 4.65 и 4.66. Наиболее интенсивный пик в их ЭР спектрах (ион, m/z 125), соответствует неизменному хлоробензильному остатку (Рисунки 4.73 и 4.75). Ионы, m/z 204 и продукт его дегидратации (m/z 186) свидетельствуют о моногидроксилировании боковой цепи. ЭИ спектры TMS дериватов имеют интенсивные пики ионов, m/z 302 (моногидроксилированный пентилиндольный остаток) и малоинтенсивные - ионов, m/z 144, свидетельствующих о наличии неизменного индольного цикла, Рисунок 4.74. Для наиболее интенсивных метаболитов M1.1 и M1.2 эти заключения подтверждаются фрагментацией АС дериватов и свободных форм: наличие интенсивных пиков ионов, m/z 272 и 230, соответственно, указывает на моногидроксилирование пентилиндольного остатка, а малоинтенсивные пики ионов, m/z 212, являются следствием элиминирования уксусной кислоты.

Оба метаболита обнаружили в мочевых образцах и в виде АС дериватов. Тем не менее, недостатки ацетилирования – уже перечисленные ранее – действительно и для метаболитов JWH-203.

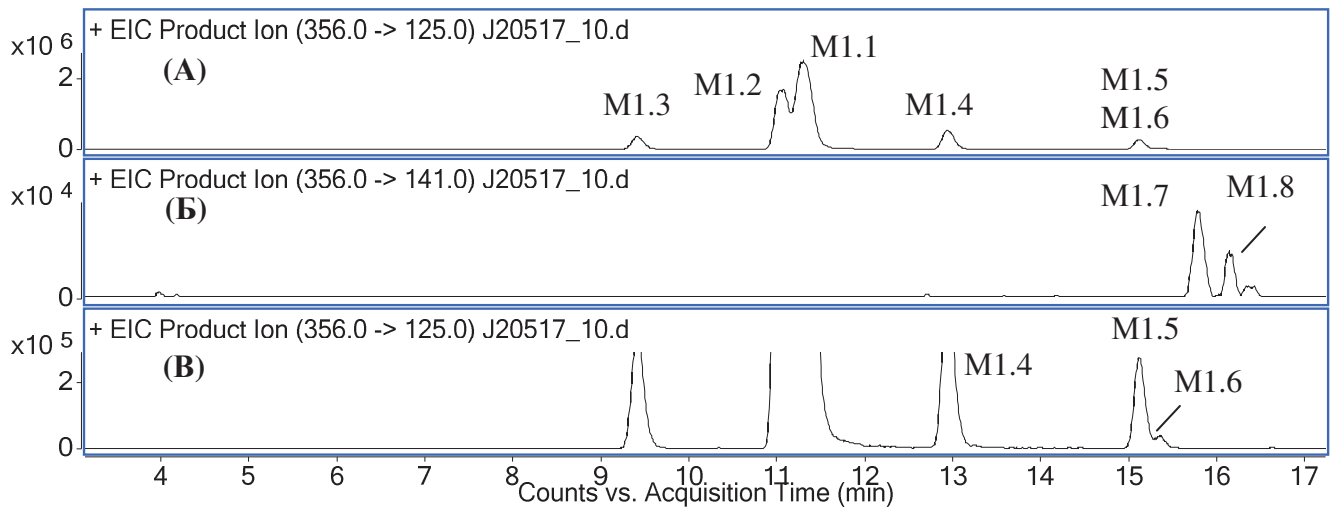


Рис. 4.65. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (кислотный гидролиз). Моногидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильной группы на пентилиндольном (А) и метоксибензильном (Б) остатках. Минорные метаболиты (В).

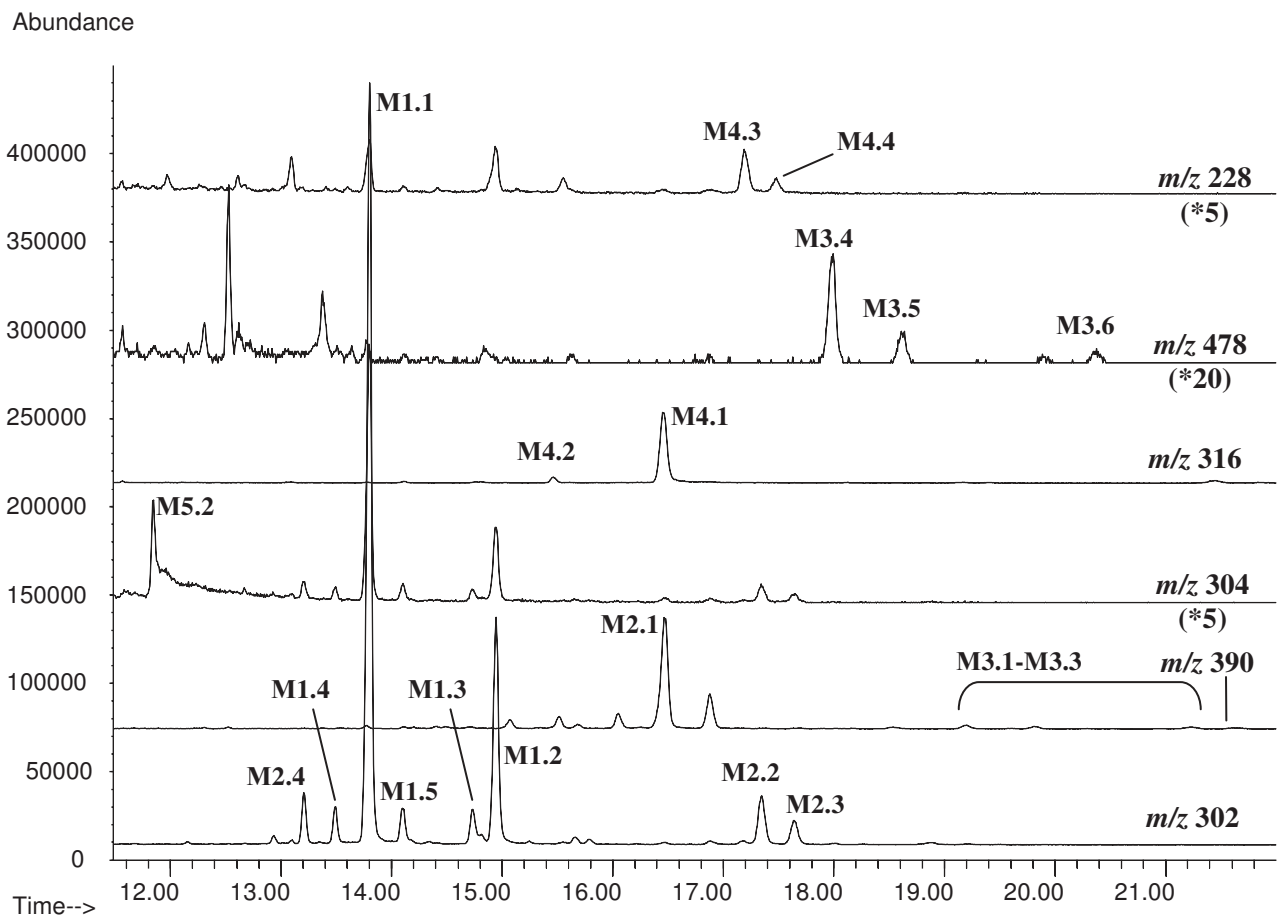


Рис. 4.66. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Метаболиты JWH-203, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

Два минорных метаболита, **M1.5** и **M1.6**, также имеют в ЭР спектрах пики ионов, m/z 125 и 204, но продукт дегидратации гидроксированного пентилиндольного остатка (m/z 186), отсутствует. Из-за малого содержания, только один из этих метаболитов (**M1.5**) выявили методом ГХ-МС. В его спектре отсутствует пик иона, m/z 144, и, следовательно, гидроксильная группа локализована на индольном цикле. Сходство ЭР фрагментации метаболитов **M1.5** и **M1.6**, а также их значительное ЖХ удерживание по сравнению с метаболитами, гидроксированными по боковой цепи (что отмечали ранее) позволяет отнести их к продуктам гидроксирования индольного цикла.

Два оставшихся минорных метаболита (**M1.5** и **M1.6**) гидроксированы по хлоробензильному остатку, на что указывает наличие пиков ионов, m/z 141, в их ЭР спектрах. Присутствие пиков ионов, m/z 214 и 188 (неизмененные оксометилиндольный и пентилиндольный остатки, соответственно), подтверждает это заключение. Из-за малого содержания эти метаболиты наблюдали только методом ЖХ-МС/МС.

Все перечисленные моногидроксированные формы обнаружили только в моче людей.

Дигидроксированные метаболиты M2.1-M2.12 (M.w. = 371). Для установления структурных характеристик всех 12 дигидроксированных метаболитов применяли в основном, метод ГХ-МС, в то время как метод ЖХ-МС/МС использовали в качестве вспомогательного из-за меньшей разделяющей способности изомеров по положению гидроксильных групп, Рисунки 4.67 и 4.68).

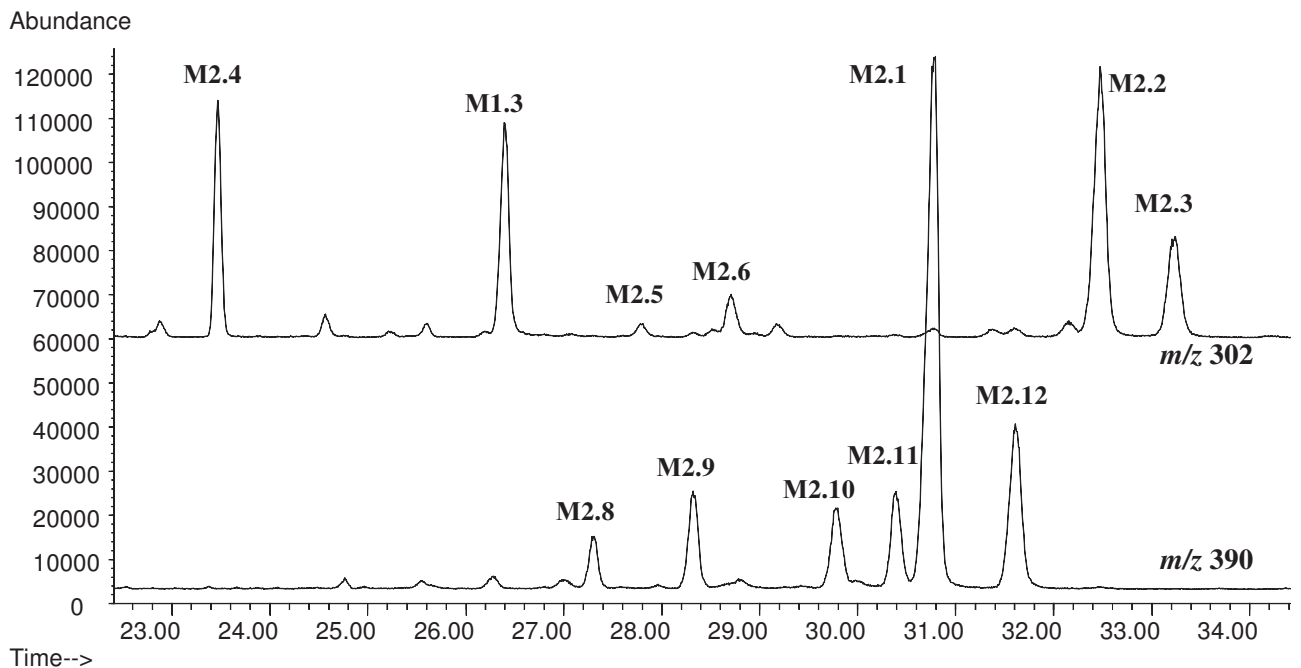


Рис. 4.67. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракции 3. Дигидроксированные метаболиты JWH-203, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим II).

Кроме интенсивного пика иона, m/z 125, ЭР спектр **M2.1** имеет пики, m/z 220 и 202, соответствующие дигидроксилированному пентилиндольному остатку и продукту его дегидратации. Присутствие пиков ионов, m/z 146 и 298 (при учете молекулярной массы) свидетельствуют о наличии только одной гидроксильной группы на боковой цепи. Пик иона, m/z 390 в его ЭИ спектре однозначно указывает на дигидроксилирование пентилиндольного остатка, а отсутствие иона, m/z 144 – на расположение по крайней мере, одной гидроксильной группы на индольном цикле. Эти признаки в совокупности позволяют отнести **M2.1** – метаболит, характеризующийся наиболее интенсивными хроматографическими пиками в пределах дигидроксилированной группы – к продуктам гидроксилирования индольного цикла и боковой цепи.

Кроме **M2.4**, все остальные метаболиты, имеющие одну гидроксильную группу на хлоробензильном остатке (**M2.2**, **M2.3**, **M2.5** и **M2.6**) характеризовали только методом ГХ-МС. Пик иона, m/z 141, в ЭР спектре, зарегистрированном в максимуме хроматографической полосы прямо указывает на моногидроксилирование хлоробензильного остатка. Только для метаболитов **M2.2** и **M2.3** их ЭИ спектры позволяют определить положение второй гидроксильной группы: согласно наличию пиков ионов, m/z 144, она локализована на боковой цепи. Структуры остальных метаболитов (**M2.4-M2.6**) не могут быть детализированы по имеющимся данным; можно лишь сказать, что она расположена на пентилиндольном остатке. В зарегистрированных ЭИ спектрах этих метаболитов отсутствуют пики молекулярных ионов; найдены только продукты элиминирования метильной группы ($[M-15]^+$). Несколько необычное хроматографическое поведение метаболита **M2.4** (аномально слабое удерживание при ГХ и аномально сильное при ЖХ) можно объяснить специфическим характером гидроксильной группы, локализованной на хлоробензильном остатке, выражающемся в ее малой стерической доступности для межмолекулярных взаимодействий.

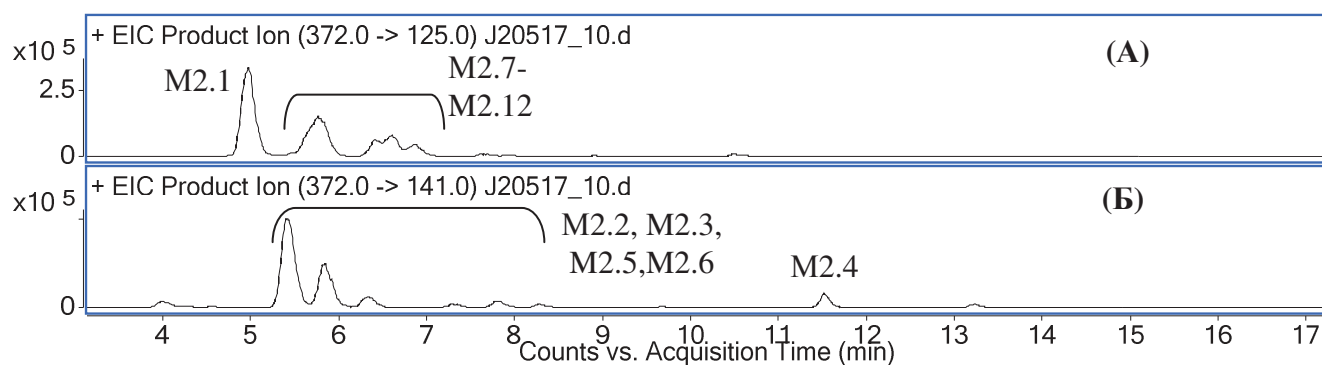


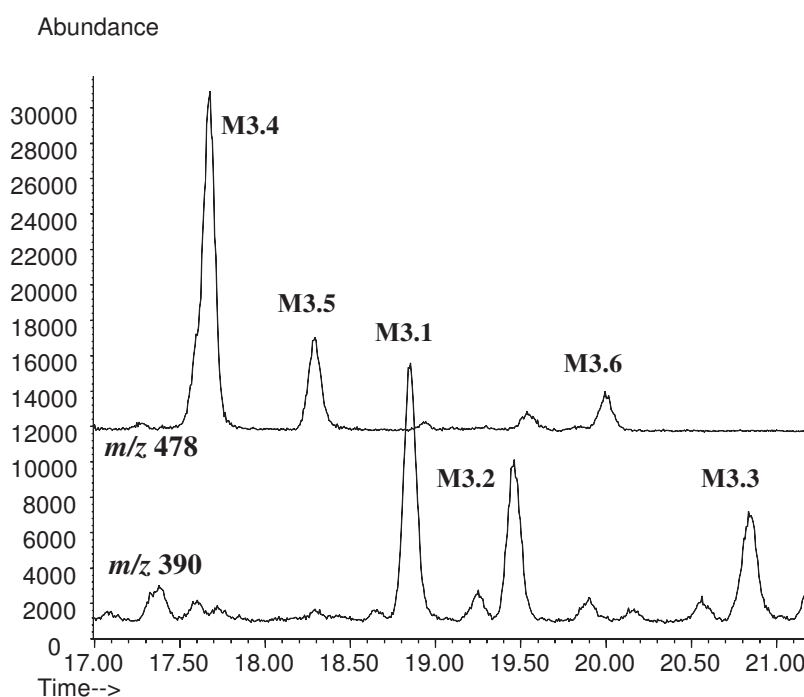
Рис. 4.68. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (кислотный гидролиз). Дигидроксилированные метаболиты со свободным (А) и моногидроксилированным (Б) хлоробензильным остатком.

У метаболитов **M2.7-M2.12** обе гидроксильные группы расположены на пентилиндольном остатке, на что указывает наличие интенсивного пика иона, m/z 390, в ЭИ спектрах. Их структуры также не могут быть детализированы из-за отсутствия в этих спектрах отчетливых дополнительных признаков локализации гидроксильных групп. Никаких дополнительных работ по уточнению структур метаболитов **M2.7-M2.12** не проводили из-за их очевидно малого содержания в мочевых образцах.

Из всей гидроксильрованной группы только метаболиты **M2.1** (и, возможно, **M2.4**) имеют практическое значение для последующего обнаружения. Метаболиты **M2.2** и **M2.3** были найдены также в моче крыс, хотя их относительная интенсивность их хроматографических пиков была невелика.

Тригидроксилированные метаболиты M3.1-M3.6 (M.w. = 387). Все тригидроксилированные метаболиты характеризовали только методом ГХ-МС (Рисунок 4.69) по причинам, указанным выше для случая дигидроксилированных форм. Их ЭИ спектры не позволяют выполнить детализацию структур. Можно лишь отметить, что у метаболитов **M3.1-M3.3** одна гидроксильная группа расположена на хлоробензильном остатке (по признаку наличия интенсивного пика иона, m/z 390), а у **M3.4-M3.6** все три гидроксильных группы находятся на пентилиндольном остатке. В последнем случае на это указывает пик иона, m/z 478.

Рис. 4.69.
Тригидроксилированные метаболиты в ВЭЖХ фракции 2, TMS (колонка VF-5ms, режим I)



Карбоксилированный метаболит M4.1. Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на N-пентильной цепи M4.2-M4.4 (M.w. = 369). Подобно случаям JWH-018, JWH-073 и JWH-250, ЖХ удержание карбоксилированного метаболита (**M4.1**, Рисунок 4.70) близко к удерживанию моногидроксилированных метаболитов с гидроксильной группой

на боковой цепи. Кроме пика иона, m/z 125, отмечающего неизменный хлоробензильный остаток, ЭР спектр **M4.1** имеет малоинтенсивный пик иона, m/z 244, соответствующего наличию гидроксильной и дополнительной карбонильной групп на оксометилпентилиндольном остатке. Ион, m/z 218, (кроме аналогичного указания на наличие тех же функциональных групп на пентилиндольном остатке) подвержен дегидратации, продуктом которой является ион, m/z 200. В ЭИ спектре **M4.1** присутствуют интенсивный пик иона, m/z 316, указывающий на наличие тех же функциональных групп на оксопентилиндольном остатке и малоинтенсивный пик иона, m/z 144, свидетельствующий о расположении гидроксильной (и, разумеется, карбонильной) групп на боковой цепи. Структуру **M4.1** подтверждали этерификацией метанолом в присутствии соляной кислоты. ЭИ спектр образованного метилата имеет аналогичные пики с учетом дериватизации: интенсивный пик иона, m/z 258 и малоинтенсивный пик, m/z 144.

ЭР спектр второго метаболита обсуждаемой группы, **M4.2**, также имеет пики ионов, m/z 125, 200 и 218. Однако, в спектре присутствует также пик иона, m/z 85, свидетельствующий о существовании на боковой цепи только одного атома кислорода с кратной связью. Следовательно, второй атом (гидроксильная группа) расположен на индольном цикле. В ЭИ спектре **M4.2** (также как и в спектре **M4.1**) есть интенсивный пик иона, m/z 316. Метаболит **M4.2** не этерифицируется в указанных условиях, а его ЖХ удерживание весьма мало и близко к удерживанию остальных метаболитов группы – **M4.3** и **M4.4**.

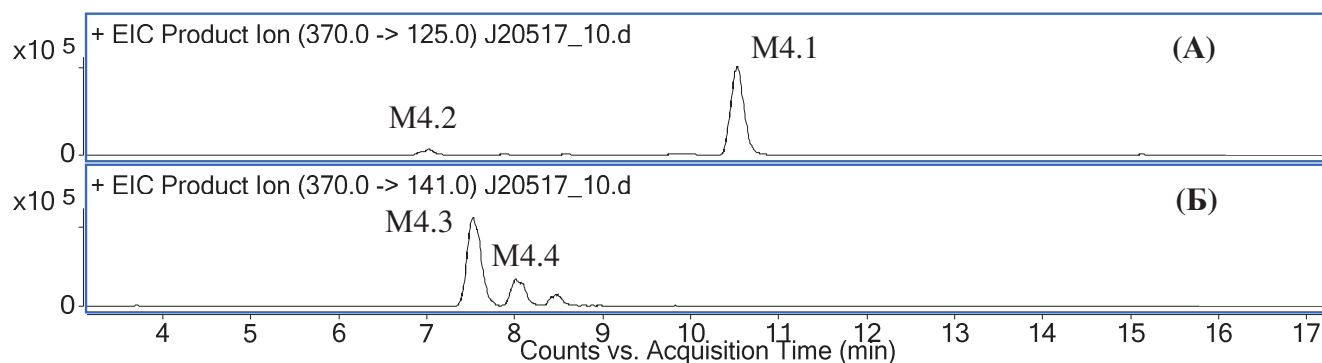


Рис. 4.70. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, (кислотный гидролиз). Метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи и гидроксильной группой на пентилиндольном остатке (А) и на хлоробензильном остатке (Б).

Оба этих метаболита имеют подобные ЭР спектры, содержащие пик иона, m/z 141, что указывает на моногидроксилирование хлоробензильного остатка. В этих спектрах присутствуют также и пики ионов, m/z 202 и 184, но в данном случае они свидетельствуют о наличии карбонильной группы на боковой цепи и о дегидратации. Такое заключение

подтверждается наличием пиков ионов, m/z 85 в ЭР спектрах и – главным образом – наличием интенсивных пиков ионов, m/z 228, в ЭИ спектрах. Малое ЖХ удерживание метаболитов **M4.2-M4.4** по сравнению с карбоксилированным **M4.1** объяснимо распределением гидрофильных функциональных групп по их структурам, что снижает площадь гидрофобных участков, и, следовательно, снижает удерживание.

Дезалкилированный метаболит M5.1 (M.w. = 269). *Моногидроксилированные дезалкилированные метаболиты M5.2-M5.4* (M.w. = 285). *Дигидроксилированный дезалкилированный метаболит M6.1* (M.w. = 301).

Метаболит **M5.1** обнаружили только в моче крысы, а ЭИ спектр его АС деривата весьма подобен аналогичному метаболиту для JWH-250; он содержит только пики ионов, свидетельствующие о наличии неизмененного индольного цикла (m/z 116 и 144) и продукта его N-ацетилирования (m/z 186).

Дезалкилированные метаболиты, имеющие гидроксильную группу на индольном остатке (**M5.2** и **M5.3**) обнаружили как в моче людей (Рисунок 4.71), так и крыс (Рисунок 4.72). Их ЭР спектры подобны и указывают на моногидроксилирование индольного цикла и на наличие неизмененного хлоробензильного остатка (m/z 160 и 125, соответственно). В ЭИ спектрах их TMS дериватов присутствуют интенсивные пики ионов, m/z 304, также указывающие на гидроксильное индольное кольцо, а спектр АС деривата **M5.2**, характеризующегося более интенсивным хроматографическим пиком, весьма подобен спектру аналогичного метаболита для JWH-250.

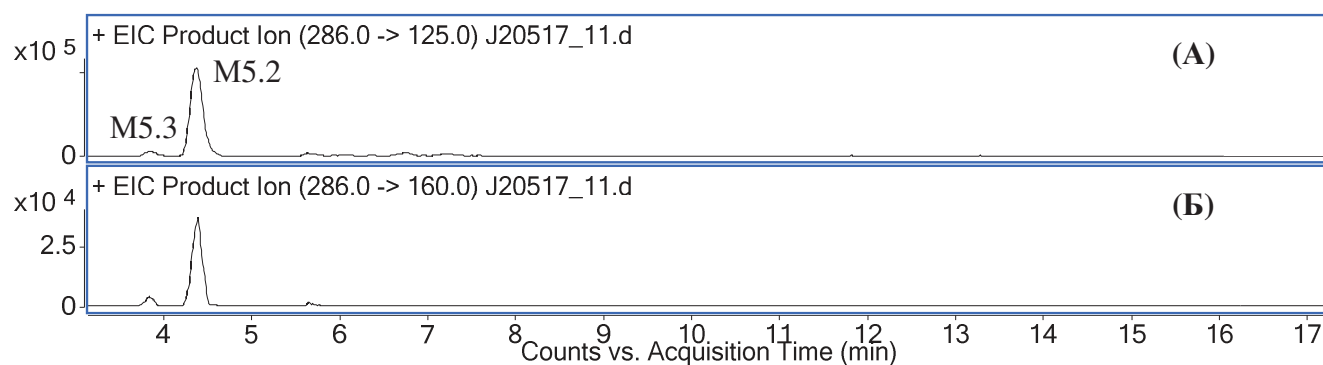


Рис. 4.71. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека по переходам 286→125 (А) и 286→160 (Б), кислотный гидролиз. Дезалкилированные метаболиты с гидроксильной группой, расположенной на индольном цикле.

Моногидроксилированный метаболит с расположением гидроксильной группы на хлоробензильном остатке (**M5.4**) обнаружили только в моче крыс. Его структура хорошо

характеризуется как ЭИ спектром TMS деривата (ион, m/z 216), так и спектром АС деривата, подобным спектру негидроксилированного **M5.1**.

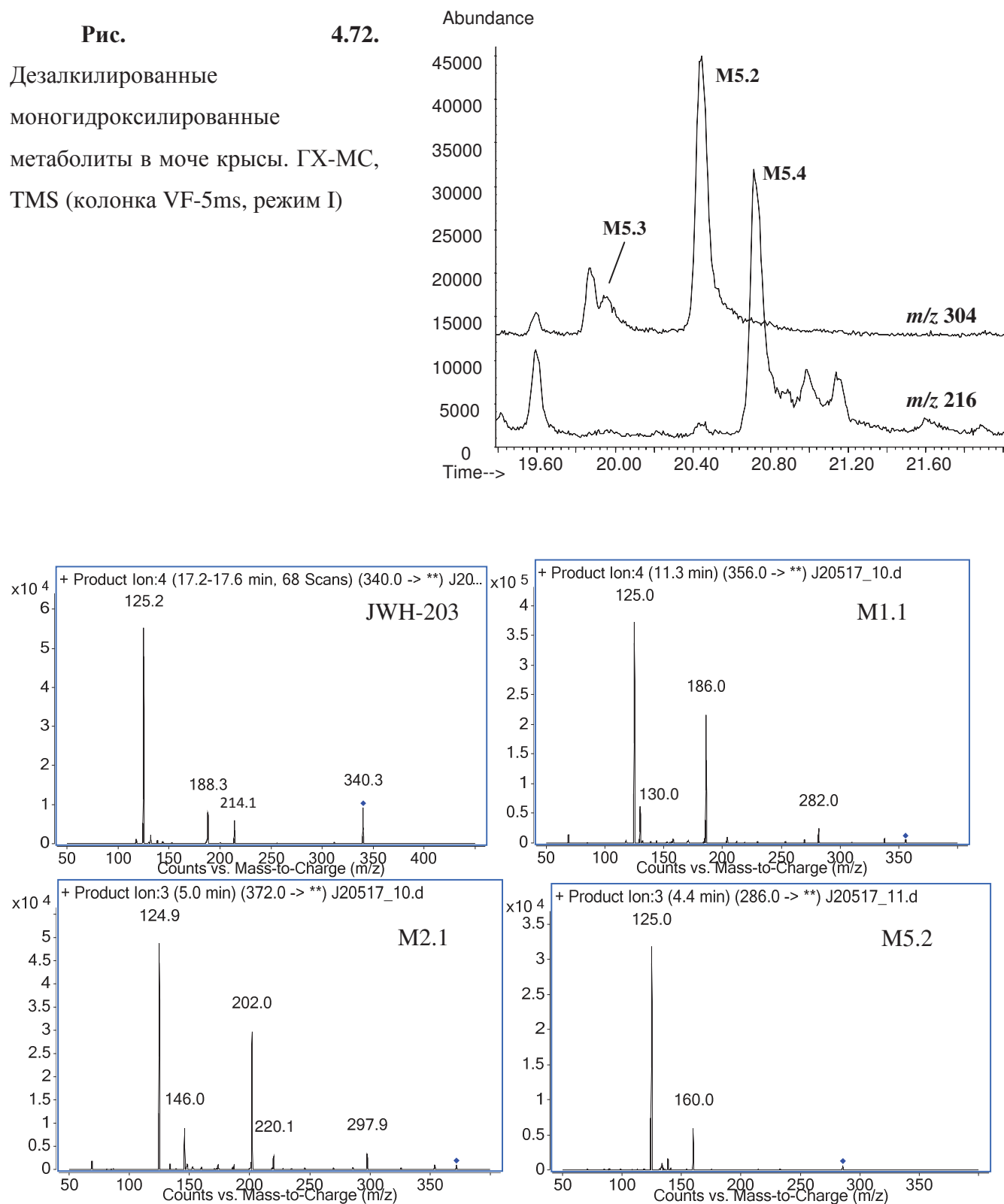


Рис. 4.73. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) JWH-203 и его метаболитов.

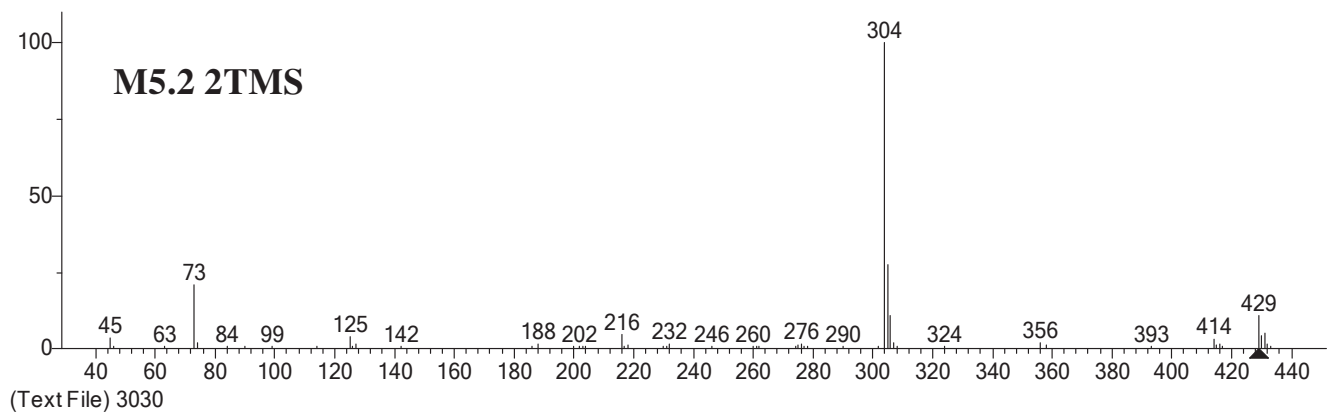
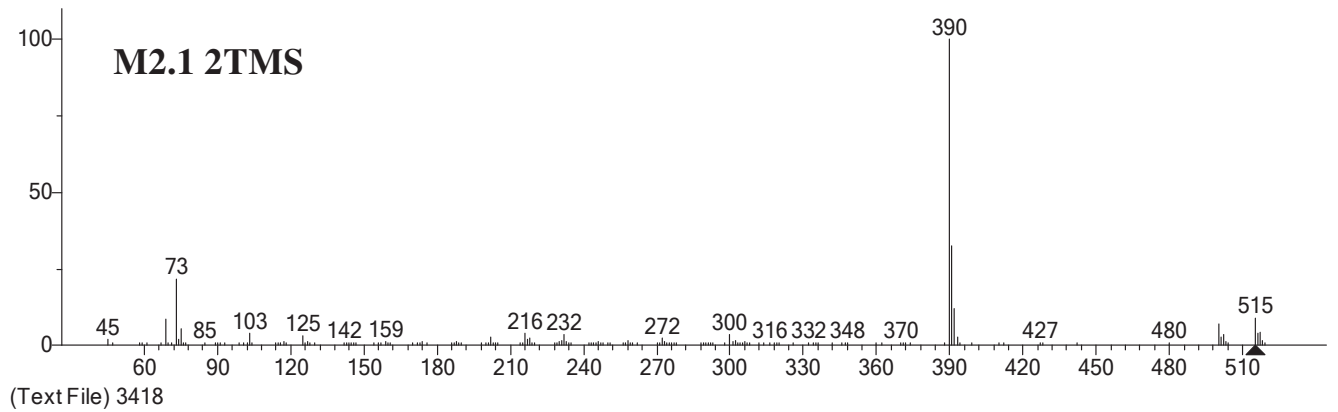
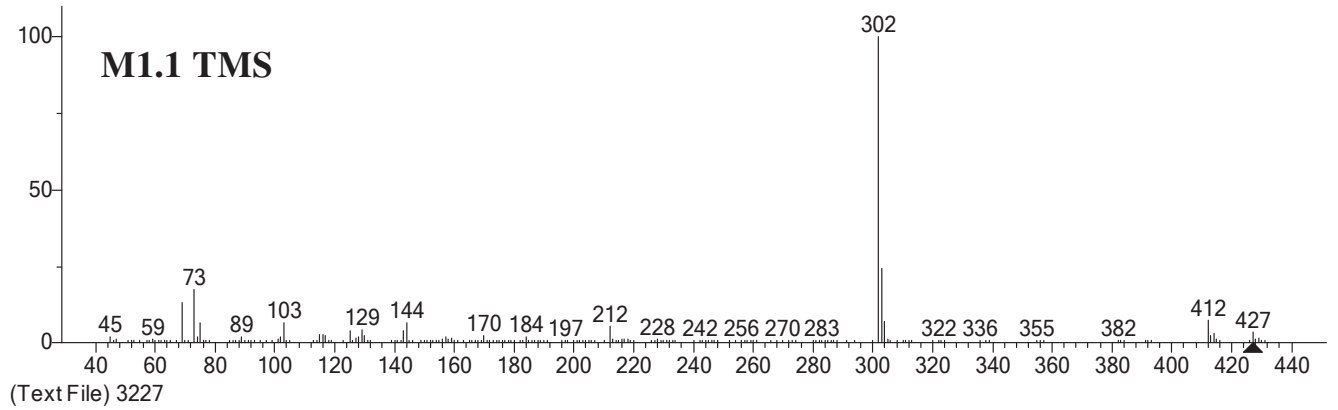
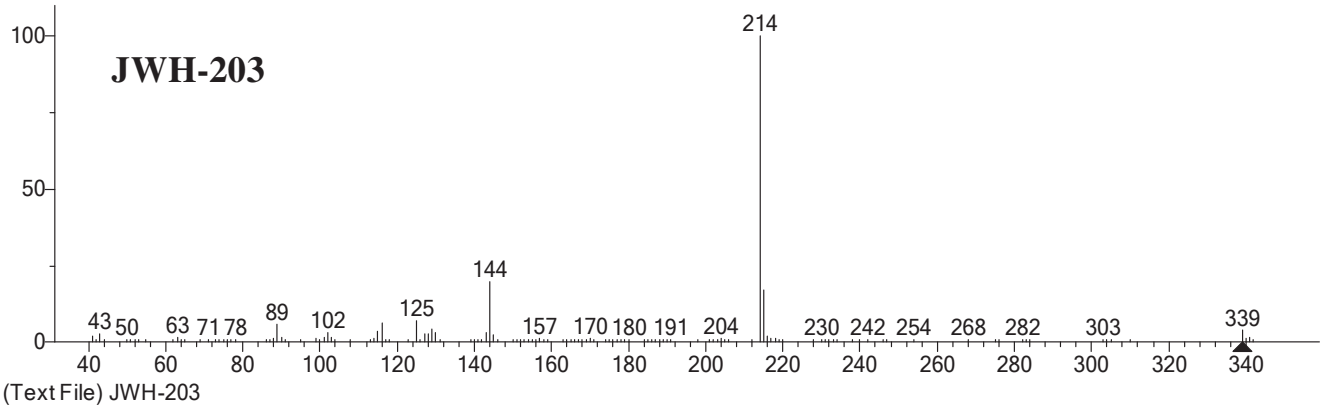


Рис. 4.74. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) JWH-203 и его метаболитов.

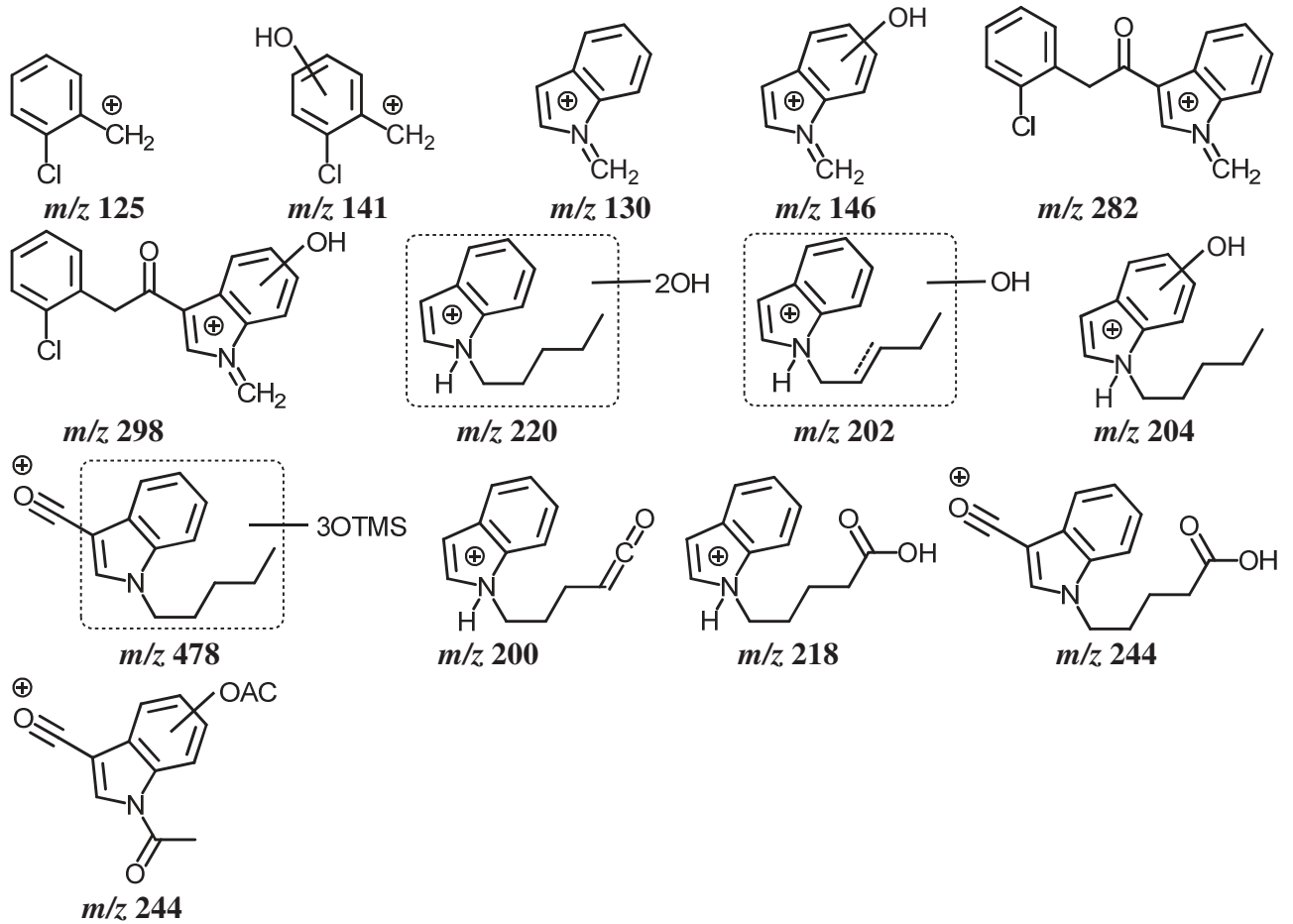


Рис. 4.75. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов JWH-203.

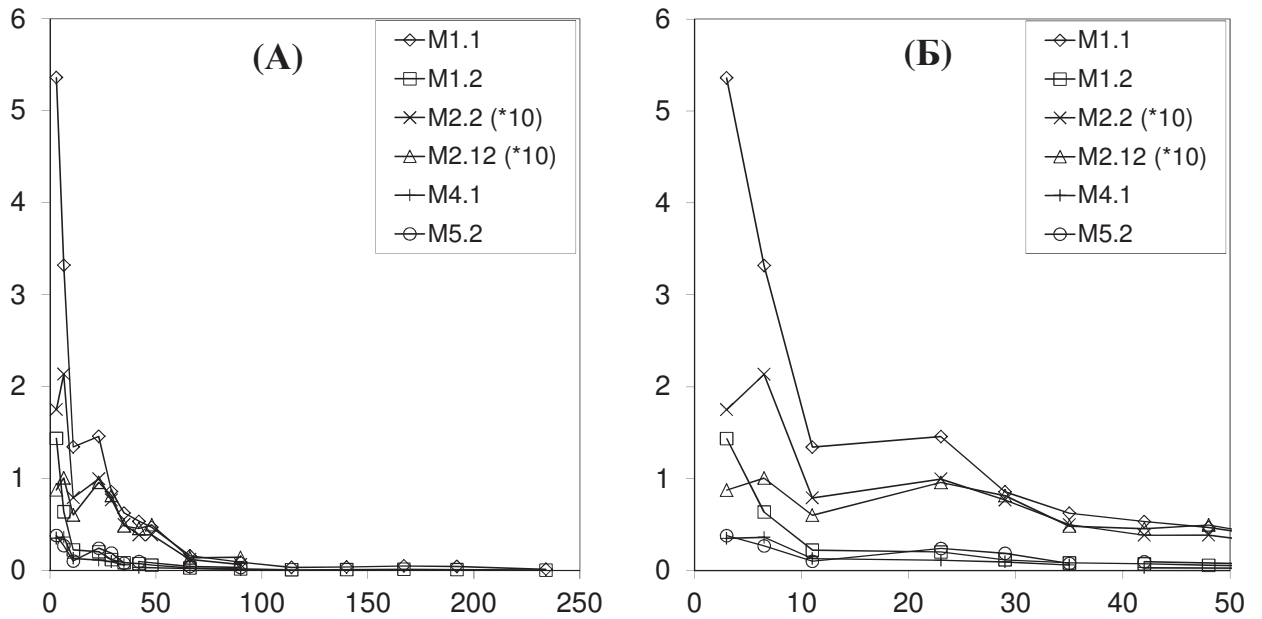


Рис. 4.76. Экскреция метаболитов JWH-203 с мочой, случай C2, курение, (А). Начальный участок экскреционного профиля, (Б). Площади M2.2 и M2.12 показаны увеличенными в 10 раз.

Последний метаболит дезалкилированной группы – дигидроксилированный **M6.1** – также нашли только в моче крыс (не приведен на хроматограмме). Его содержание невелико, а основной ион в ЭИ спектре АС деривата (m/z 244) свидетельствует о моногидроксилировании индольного цикла.

Полуколичественные измерения. Некоторые результаты измерения площадей (% относительно **M1.1**) хроматографических пиков метаболитов JWH-203 в образцах мочи, собранных у пациентов наркодиспансера, сведены в Таблицу 4.14. Там же указаны ионы, m/z , согласно ЕИС которых выполняли измерения. Относительные площади пиков моногидроксилированных метаболитов **M1.1** и **M1.2** выглядят наибольшими. Относительное содержание метаболита **M2.4** чрезвычайно вариабельно: в образце №11 его площадь превышает площадь **M1.1**. Подобное явление замечали и для некоторых других образцов мочи, не вошедших в Таблицу 4.14. Относительное содержание дезалкилированных метаболитов также весьма изменчиво; следует отметить, что данное наблюдение сопоставимо с метаболическими профилями других каннабимиметиков.

Таблица 4.14. Отношения площадей пиков ион-хроматограмм для разнородных метаболитов, %, к площади пика метаболита **M1.1** в образцах мочи человека (ГХ-МС, TMS). В скобках указаны величины m/z .

Образец, №.	M1.1 (302)	M1.2 (302)	M1.5 (302)	M2.1 (390)	M2.2 (302)	M2.4 (302)	M4.1 (316)	M5.2 (304)
1	100	17	1	3	4	6	14	2
2	100	18	3	1	2	3	12	11
3	100	31	3	4	4	11	6	5
4	100	40	3	6	2	9	3	9
5	100	51	2	8	3	7	1	0
6	100	27	8	17	8	9	9	12
7	100	27	14	22	11	13	9	19
8	100	44	5	21	9	7	4	18
9	100	36	5	21	10	6	8	20
10	100	28	7	8	5	7	13	63
11	80	26	5	11	4	100	7	24
12	100	26	3	4	3	3	6	8

На Рисунке 4.76 приведены диаграммы экскреции разнородных метаболитов JWH-203 с мочой курильщика. Эти результаты получены при кислотном деконъюгировании образцов с применением внутреннего стандарта папаверина (методика приведена выше). Первая порция мочи (3 ч. после курения) содержит наибольшие количества метаболитов, во второй порции (6 ч.) содержание снижается примерно в 1.6 раз (для **M1.1**), то есть, общий вид экскреционного профиля типичен для принимающих каннабимиметик курением, хотя и несколько замедлен. Последнее замечание может быть объяснено разными факторами, в том числе и

физиологическим состоянием курильщика и не обязательно касается фармакокинетических характеристик JWH-203. Присутствие метаболитов **M1.1** и **M1.2** в моче наблюдали в течение 234 ч. (ГХ-МС, SIM).

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [32, 326, 327].

4.8. Выявление метаболитов JWH-251

Третий фенилацетилиндольный каннабимиметик JWH-251 1-(1-пенитл-1*H*-индол-3-ил)-2-(*o*-толил)этанон не имеет гетероатомных заместителей в бензильном остатке (Рисунок 4.77). Подобно его аналогам, рассмотренным выше, он был синтезирован группой Huffman [322]. В 2011 г. опубликована работа Uchiyama et al. [205], в которой сообщалось об обнаружении JWH-251 в составе курительных смесей, продаваемых в Японии. Из трех обсуждаемых фенилацетилиндолов, JWH-251, согласно нашему опыту, был наименее популярен в РФ. Его аффинность к CB1R ниже, чем у его аналогов ($K_i=29$ нМ) [322].

Для выявления метаболитов JWH-251 были собраны следующие образцы мочи:

- крыс (2), получивших JWH-251 внутрижелудочно в виде 1% водной суспензии в TWEEN;
- персон (29), доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями.

Один образец JWH-251 (оранжевый порошок) был куплен у анонимного распространителя через Интернет. Аутентичность и примерное содержание JWH-203 (>90 %) проверяли методами ГХ-МС, ВЭЖХ-ДМД, ЖХ-МС/МС и ТСХ. Данный образец применяли для испытаний на крысах.

Испытания на крысах. В испытаниях использовали две аутбредные крысы-самцы Wistar весом 280 – 300 г, лишённые доступа к корму за сутки до эксперимента. Общим крысам внутрижелудочно вводили суспензию JWH-251 в 1% TWEEN в дозе 100 мг/кг. Значительных изменений поведения животных не отметили. Через 30 мин. после введения суспензии животных помещали на сутки в метаболические кюветы со свободным доступом к воде. Образцы мочи каждой крысы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. и хранили при -20°C не более двух недель.

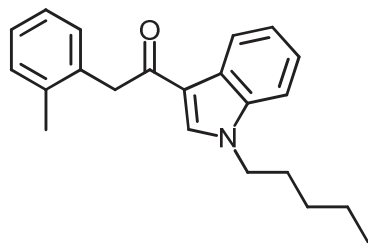
Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, сортировали так же, как и для случая JWH-018.

Случаи, использованные для измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

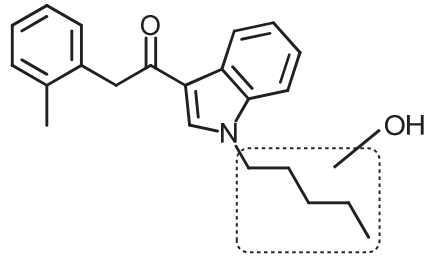
C1 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 198 ч. после приема.

C2 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 168 ч. после приема.

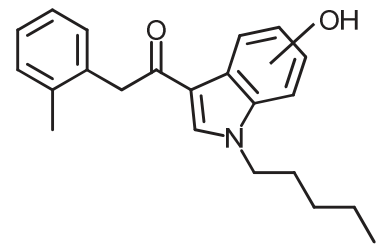
Подготовка проб и условия анализа. Все условия подготовки проб и последующего анализа были аналогичны условиям для JWH-203.



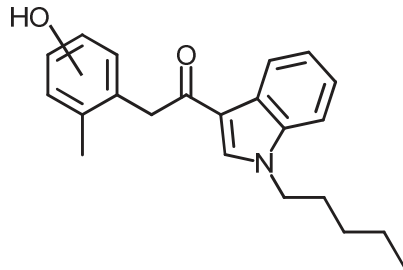
JWH-251



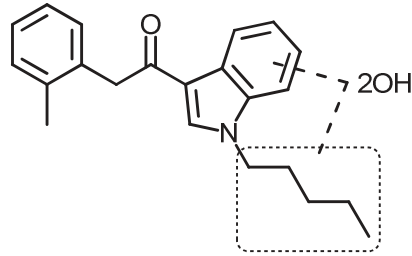
M1.1-M1.4



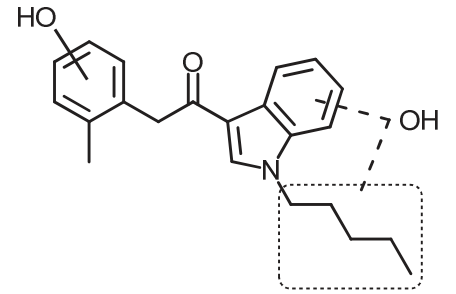
M1.5



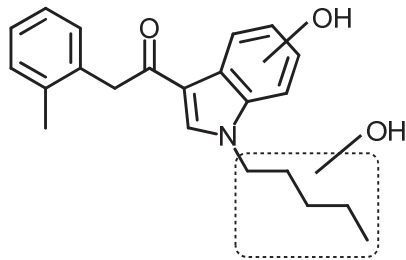
M1.6, M1.7



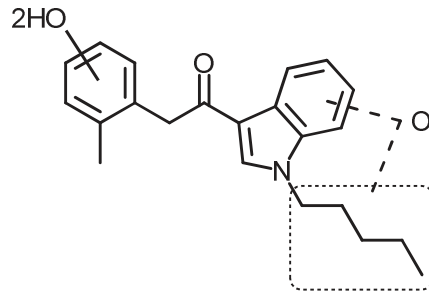
M2.1-M2.4



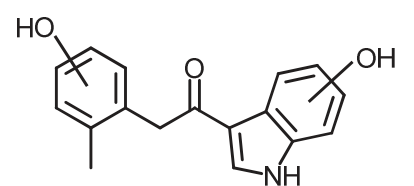
M2.5



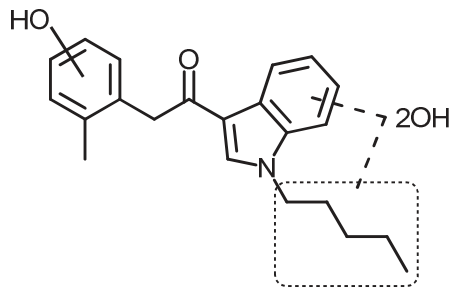
M2.6



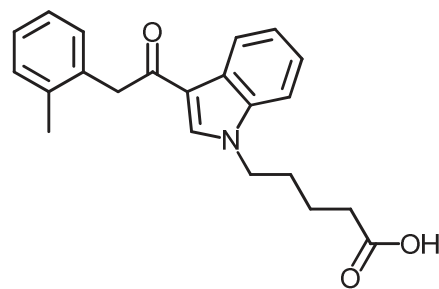
M3.1



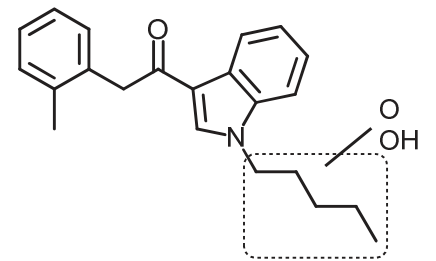
M5.5, M5.6



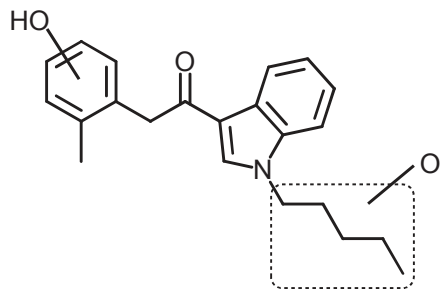
M3.2



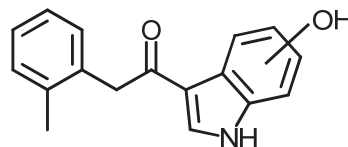
M4.1



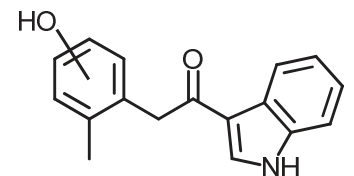
M4.2



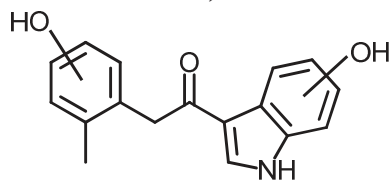
M4.3, M4.4



M5.1, M5.2



M5.3, M5.4



M5.5, M5.6

Рис. 4.77. Структуры JWH-251 и его метаболитов.

Всего охарактеризовали 25 соединений, структурные формулы которых приведены на Рисунке 4.77, а индексы удерживания дериватов – в Таблице 4.15. Нативный JWH-251 не был найден ни в одном из образцов. Образцы деконъюгировали кислотным или ферментативным методами (Приложение 1), экстрагировали жидкостным методом и анализировали методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Составы метаболитов, получаемые кислотным и ферментативным деконъюгированием в целом, были подобными.

Концентрирование метаболитов JWH-251 проводили в тех же условиях, что и для JWH-203. Время удерживания JWH-251 близко ко времени JWH-203 (5.6 мин).

Таблица 4.15. Индексы удерживания метаболитов JWH-251 для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах. Обнаружение метаболитов в моче человека (Ч) и крысы (К).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	EVDX-5ms		VF-5ms		Фр. №	Ч./К.
				Реж. III	Реж. I	Реж. I	Реж. II		
1	JWH-251*	C ₂₂ H ₂₅ NO	319	-	-	2943	2906	-	-
2	M1.1*	C ₂₂ H ₂₅ NO ₂	335	-	-	3174	3132	4	+/-
3	M1.1 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₂ Si	407	3145	3116	3153	3121	4	+/-
4	M1.1 AC*	C ₂₄ H ₂₇ NO ₃	377	-	-	3230	3201	4	+/-
5	M1.2 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₂ Si	407	3243	3220	3244	3216	4	+/-
6	M1.2 AC*	C ₂₄ H ₂₇ NO ₃	377	-	-	3339	3308	4	+/-
7	M1.3 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₂ Si	407	3233	3214	3223	3199	4	+/-
8	M1.4 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₂ Si	407	3121	3095	3126	3095	4	+/-
9	M1.5 TMS	C ₂₅ H ₃₃ NO ₂ Si	407	-	-	3178	3151	5,6	+/-
10	M2.1 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₃ Si ₂	495	3253	3230	3259	3235	3	+/-
11	M2.2 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₃ Si ₂	495	3281	3258	3290	3265	3	+/-
12	M2.3 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₃ Si ₂	495	3336	3321	3342	3325	3	+/-
13	M2.4 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₃ Si ₂	495	3359	3342	3365	3346	3	+/-
14	M2.5 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₃ Si ₂	495	3308	3288	3314	3293	3	+/-
15	M2.6 2TMS	C ₂₈ H ₄₁ NO ₃ Si ₂	495	3396	3373	3402	3378	3	+/+
16	M3.1 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₄ Si ₃	583	3438	-	-	-	-	-/+
17	M3.2 3TMS	C ₃₁ H ₄₉ NO ₄ Si ₃	583	3574	-	-	-	-	-/+
18	M4.1 TMS	C ₂₅ H ₃₁ NO ₃ Si	421	-	-	3339	3310	3	+/-
19	M5.1 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂ Si ₂	409	-	-	2953	2929	-	+/-
20	M5.2 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂ Si ₂	409	-	-	2918	2901	-	-/+
21	M5.3 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂ Si ₂	409	-	-	2896	2873	-	+/-
22	M5.4 2TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂ Si ₂	409	-	-	2985	2955	-	-/+
23	M5.5 3AC*	C ₂₃ H ₂₁ NO ₆	407	-	-	3379	3345	-	-/+
24	M5.6 3AC*	C ₂₃ H ₂₁ NO ₆	407	-	-	3410	3374	-	-/+

Примечание. * - приведены индексы для колонки HP-5ms

Выявление метаболитов. МС фрагментация исходного JWH-251. Пути фрагментации JWH-251 подобны остальным фенилацетилиндолам, Рисунки 4.84-4.86. Наиболее интенсивный

пик в его ЭИ спектре образован ионом, m/z 214, соответствующем оксометилпентилиндольному остатку. Пик иона, m/z 105 (*o*-толильный остаток), малоинтенсивен в ЭИ спектре, но является основным в спектре ЭР. Ионы, m/z 188 и 214 соответствуют оксометилпентилиндольному и пентилиндольному остаткам, соответственно (см. структуры фрагментных ионов, приведенных в предыдущих подразделах).

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.7 (M.w. = 335). Мочевой метаболический профиль JWH-251 весьма подобен JWH-250 и JWH-203, и в большей степени это касается моногидроксилированных метаболитов, Рисунки 4.78 и 4.79. Наиболее интенсивные хроматографические пики соответствуют метаболиту, гидроксилированному по боковой N-пентильной цепи (**M1.1**). В данном случае мы не проводили дополнительных исследований по детализации положения гидроксильной группы, поскольку аналогии спектров и удерживания указывают на то, что она расположена не на концевом углеродном атоме цепи. Пики ионов, m/z 212, в ЭИ спектрах свободной формы и АС деривата **M1.1** свидетельствуют о дегидратации и элиминировании уксусной кислоты, соответственно. Ион, m/z 186, в ЭР спектре также является продуктом дегидратации.

Основной пик в ЭИ спектре **M1.1**, равно как и в спектрах его изомеров по положению гидроксильной группы в пределах пентилиндольного остатка (**M1.2-M1.5**), m/z 302, указывает на его гидроксилирование. В спектрах ЭР этому иону соответствует m/z 230, а неизмененному *o*-толильному остатку – интенсивный пик иона, m/z 121, Рисунки 4.84-4.86.

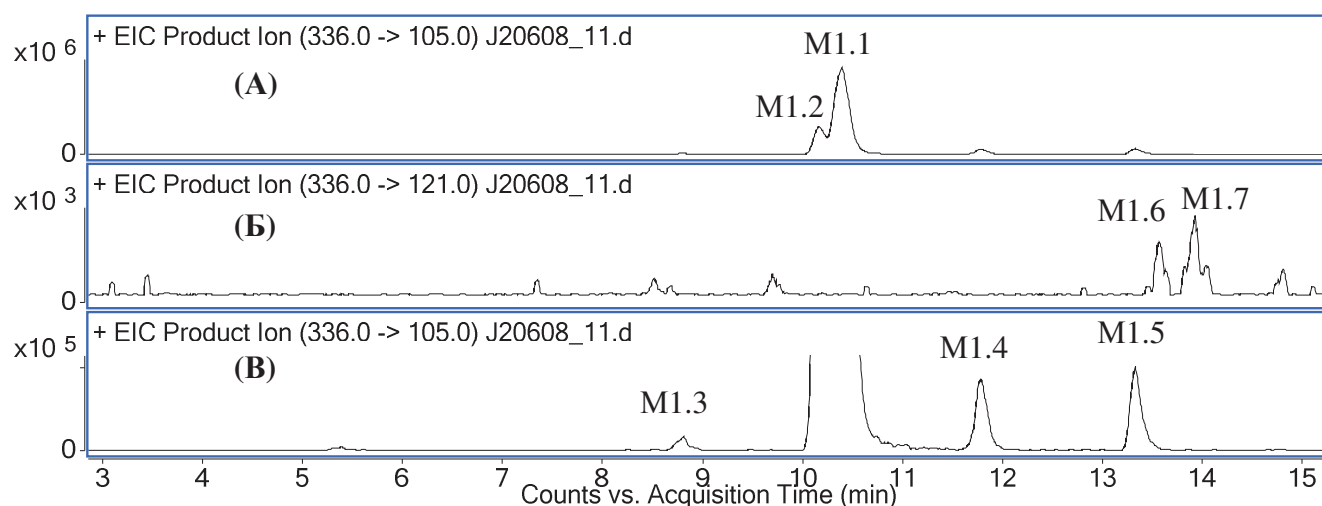


Рис. 4.78. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, кислотный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильной группы на пентилиндольном (А) и *o*-толильном (Б) остатках. Минорные метаболиты (В).

Метаболит **M1.5** (подобно аналогичным метаболитам для других каннабимиметиков, характеризующийся наибольшим ЖХ удерживанием в группе продуктов гидроксирования N-алкилиндольного остатка), имеет гидроксильную группу на индольном цикле, о чем свидетельствует малоинтенсивный пик иона, m/z 160, в его ЭР спектре. Этот метаболит также обнаружен методом ГХ-МС, но его концентрация была слишком мала для регистрации надежного ЭИ спектра.

Из-за малого содержания, минорные метаболиты **M1.6** и **M1.7** наблюдали только методом ЖХ-МС/МС. Согласно ЭР спектру **M1.7**, гидроксильная группа находится на *o*-толильном остатке (m/z 121), а пентилиндольный остаток (m/z 214) не изменен.

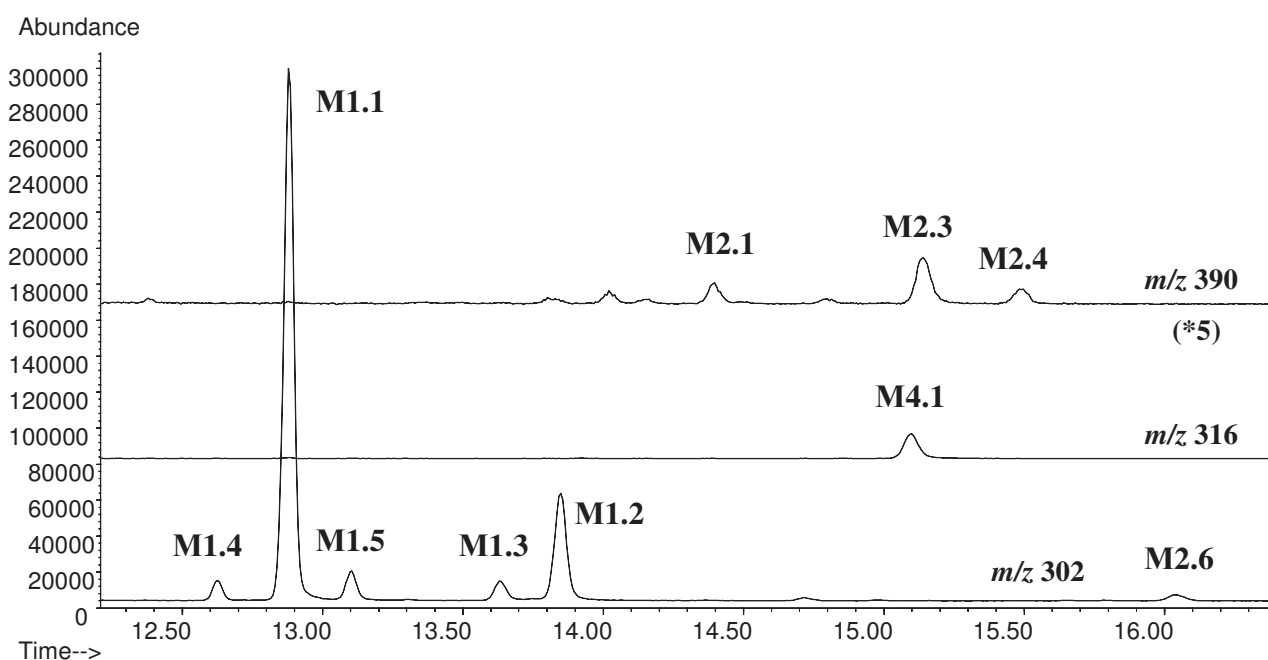


Рис. 4.79. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Метаболиты JWH-251, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

Детектирование основных моногидроксированных метаболитов (по крайней мере, **M1.1** и **M1.2**) возможно и после ацетилирования образцов, однако эффективная чувствительность определения снижена по причинам, изложенным выше.

Ни один из моногидроксированных метаболитов не был найден в моче крыс.

Дигидроксированные метаболиты M2.1-M2.6 (M.w. = 351). Шесть дигидроксированных метаболитов (Рисунки 4.80 и 4.81) характеризовали только методом ГХ-МС и не сопоставляли их сигналы с хроматографическими пиками для ЖХ-МС/МС.

ЭИ спектры **M2.1-M2.5** не позволяют детализировать положение гидроксильных групп в пределах N-пентилиндольного остатка из-за малого содержания и особенностей фрагментации

фенилацетилиндролов. Можно лишь отметить, что обе гидроксильные группы у **M2.1-M2.4** находятся на этом остатке, о чем свидетельствует интенсивный пик иона, m/z 390, в спектре. У метаболита **M2.5** одна из гидроксильных групп локализована на *o*-толильном остатке (согласно наличию интенсивного пик иона, m/z 302).

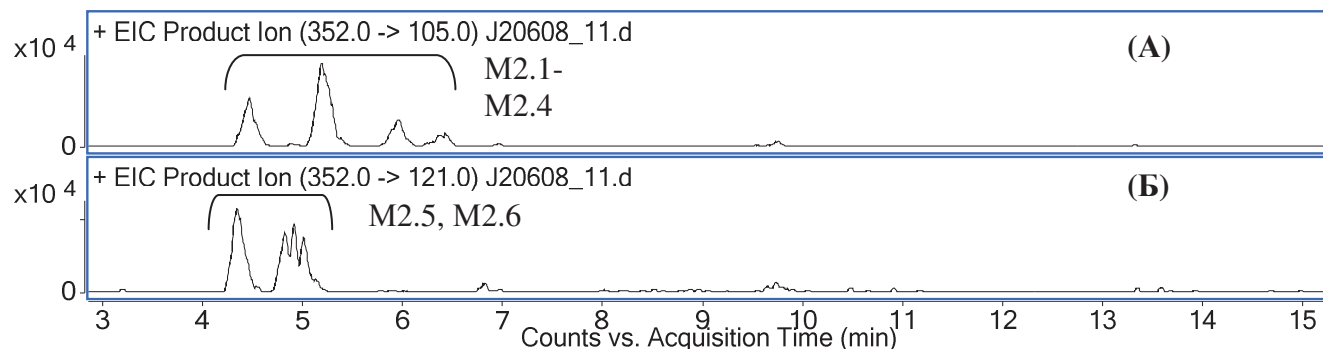


Рис. 4.80. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, кислотный гидролиз. Дигидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильной группы на пентилиндрольном (А) и *o*-толильном (Б) остатках.

В ЭИ спектре метаболита **M2.6**, кроме пика иона, m/z 302, присутствует малоинтенсивный, но надежно зарегистрированный пик иона, m/z 144 и поэтому можно считать, что одна из гидроксильных групп локализована на боковой N-пентильной цепи (в то время, как вторая – на *o*-толильном остатке, согласно присутствию иона, m/z 302).

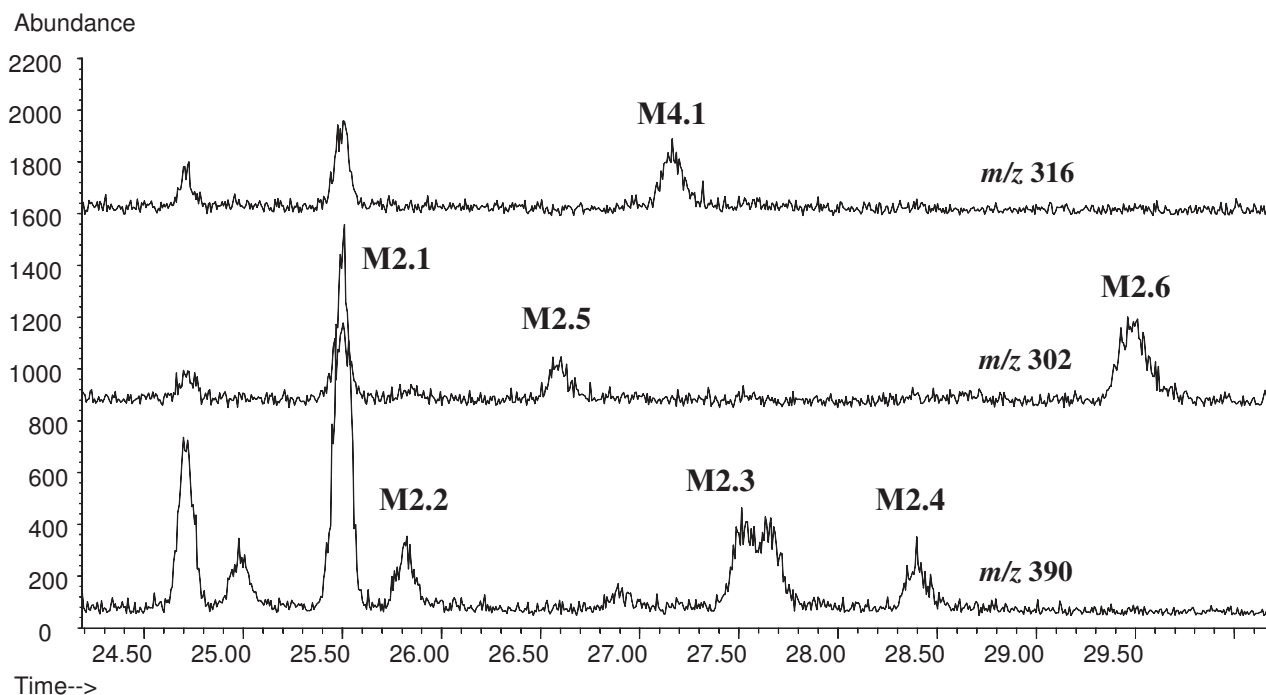


Рис. 4.81. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракции 3. Дигидроксилированные метаболиты JWH-251, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим II).

Из-за соэлюирования ЭР спектры метаболитов дигидроксилированной группы регистрировали в максимумах хроматографических зон; характер спектров подтверждает сделанные заключения (наличие характерных пиков ионов, m/z 105, 146, 202, 246 для соединений с неизменным *o*-толильным остатком и m/z 121, 186 для гидроксилированного *o*-толильного остатка).

Тригидроксилированные метаболиты М3.1-М3.2 (M.w. = 367). Оба тригидроксилированных метаболита (хроматограмма не приведена) обнаружили только в моче крыс. Характер их ЭИ спектров указывает на присутствие одной гидроксильной группы (метаболит **М3.1**, ион, m/z 302) и двух групп на пентилиндольном остатке (метаболит **М3.2**, ион, m/z 390).

Карбоксилированный метаболит М4.1. Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на N-пентильной цепи М4.2-М4.4 (M.w. = 349). Только один метаболит из данной группы (карбоксилированный **М4.1**) был выявлен как методом ГХ-МС, так и ЖХ-МС/МС, Рисунки 4.79, 4.81 и 4.82. Содержание остальных метаболитов было слишком малым для выявления методом ГХ-МС.

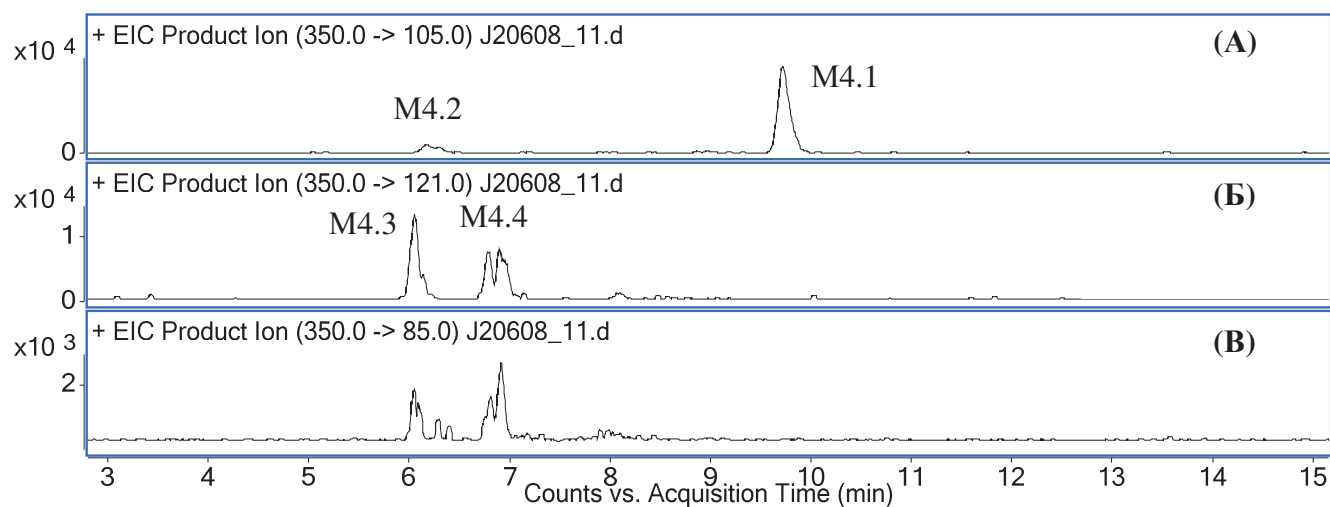


Рис. 4.82. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, кислотный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на боковой N-пентильной цепи и гидроксильной группой, локализованной на цепи (A) и на *o*-толильном остатке (B, B).

Пики ионов ЭИ спектра **М4.1** безусловно указывают на присутствие карбонильной и гидроксильной группы на N-пентилиндольной цепи: m/z 144 и 105 (неизменные индольный бицикл, и *o*-толильный остаток, соответственно), m/z 244 (присутствие карбонильной и гидроксильной группы на пентилиндольном остатке) и m/z 200 (дегидратированный пентилиндольный остаток с карбонильной группой). Пик иона, m/z 316, соответствующий

наличию карбоксильной и гидроксильной группы на пентилиндольном остатке, а также малоинтенсивный пик, m/z 130 (неизмененный индольный цикл) присутствуют в ЭИ спектре **M4.1**. Относительное ЖХ удержание **M4.1** подобно карбоксилированным метаболитам для других каннабимиметиков.

В ЭР спектров остальных метаболитов присутствует важный признак наличия изолированной карбонильной группы на негидроксилированном пентилиндольном остатке: пик иона, m/z 85 (Рисунок 4.82В).

Все эти метаболиты были найдены только в моче человека.

Моногидроксилированные дезалкилированные метаболиты M5.1-M5.4 (M.w. = 265). *Дигидроксилированные дезалкилированные метаболиты M5.5 и M5.6* (M.w. = 281). Для JWH-251 не был найден простой дезалкилированный метаболит. Моногидроксилированные формы хорошо видны в моче крыс, Рисунок 4.83. Метаболиты **M5.1** и **M5.3** были найдены также в моче людей.

У метаболитов **M5.1** и **M5.2** гидроксильная группа расположена на индольном цикле, о чем свидетельствует наличие пиков ионов, m/z 304, в их ЭИ спектрах. В ЭР спектре метаболита **M5.1** присутствуют интенсивные пики ионов, m/z 105 и 160, подтверждающие структурные предположения.

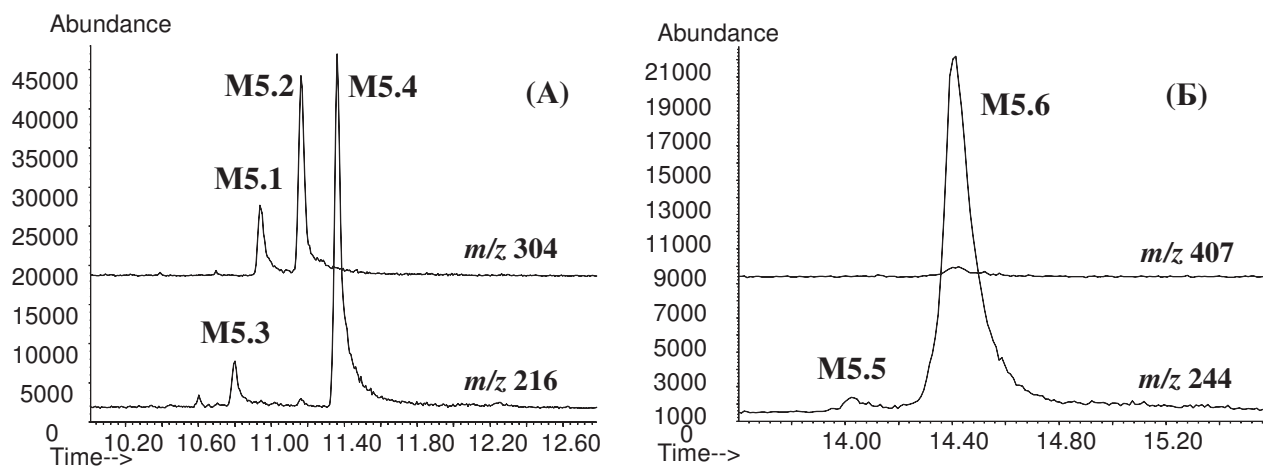


Рис. 4.83. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи крыс. Моногидроксилированные (А) и дигидроксилированные (Б) дезалкилированные метаболиты (кислотный гидролиз, TMS и АС, соответственно). Колонка HP-5ms, режим I.

Пики ионов, m/z 216, в ЭИ спектре **M5.3** и **M5.4** указывают на присутствие неизмененного индольного цикла. Все эти метаболиты также образуют АС дериваты.

Два дезалкилированных дигидроксилированных метаболита (в форме АС дериватов) обнаружили в моче крыс. Гидроксильные группы в их структурах локализованы на обоих

ароматических остатках, на что (кроме молекулярных ионов) указывает присутствие пиков ионов, m/z 244.

Полуколичественные измерения. На Рисунке 4.87 приведены диаграммы экскреции трех метаболитов JWH-251 с мочой человека. Очевидная разница во времени максимальной концентрации (3 ч. и 10 ч. для случаев *C1* и *C2*, соответственно) может быть объяснена только особенностями физиологического состояния пациентов. То же самое можно сказать и о характере спада содержаний. Это наблюдение лишь подтверждает важное замечание общего плана, которое может быть сделано на основании всех экскреционных диаграмм, представленных в данной работе: никакие фармакокинетические результаты не могут считаться достаточно точными для использования их в качестве безусловных аргументов.

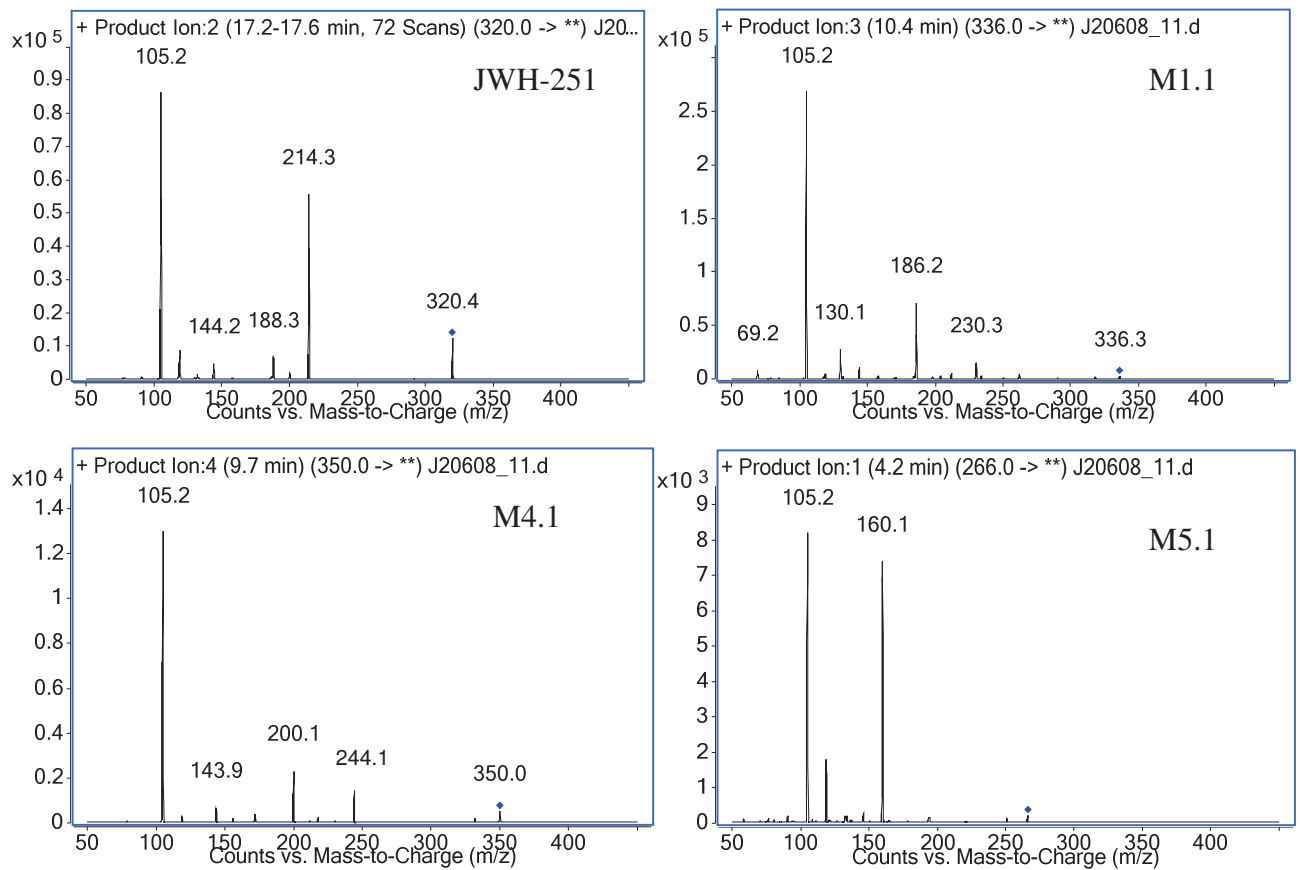


Рис. 4.84. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) JWH-251 и его метаболитов.

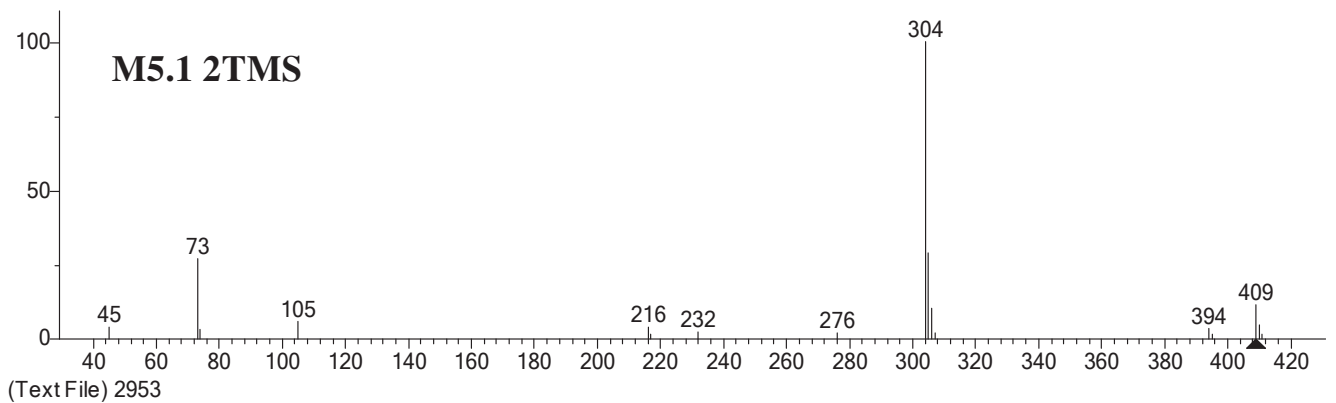
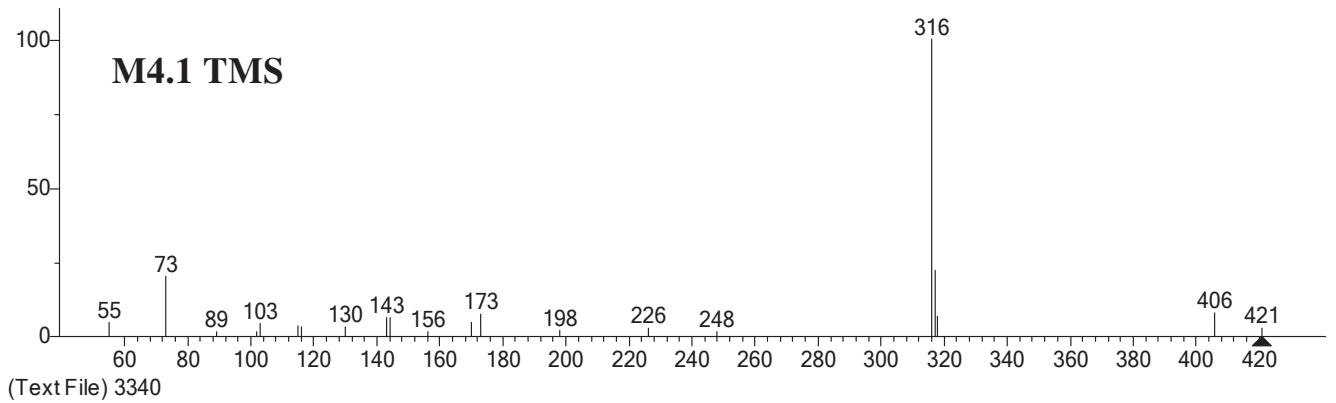
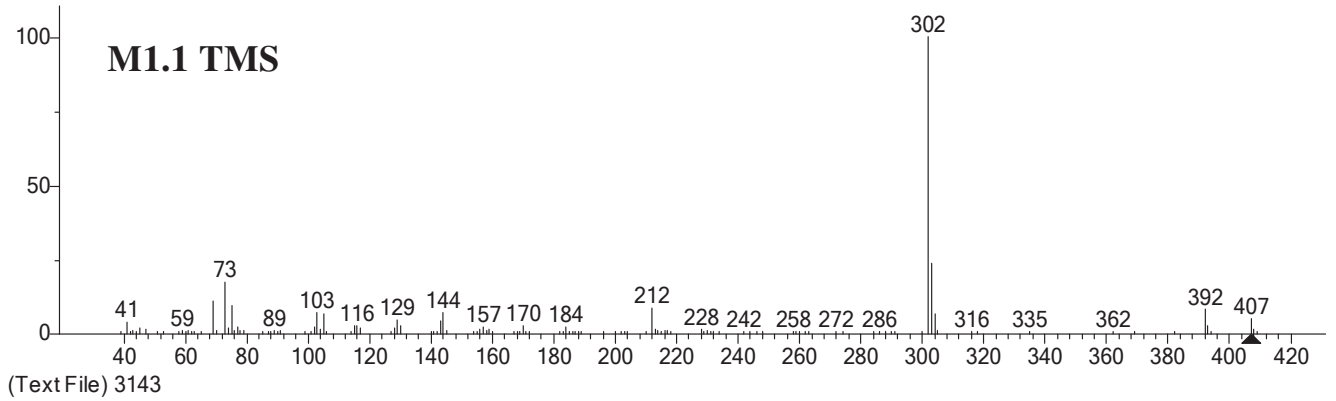
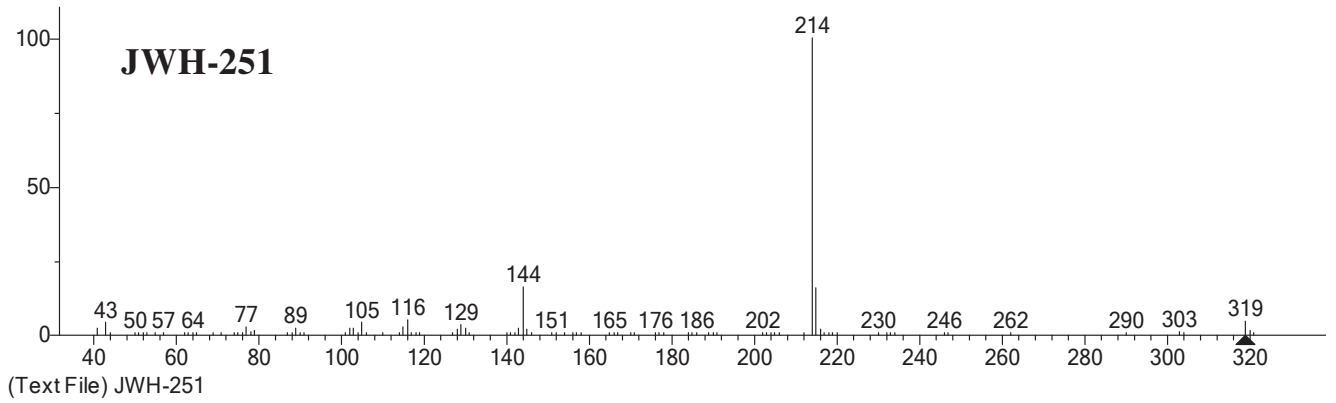


Рис. 4.85. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) JWH-251 и его метаболитов.

Диаграммы экскреции были получены посредством анализов образцов после кислотного деконъюгирования, TMS дериватизации и с использованием внутреннего стандарта папаверина

с помощью метода, описанного выше. Метаболит **M1.1** наблюдали вплоть до времени завершения сбора мочи (189 и 168 ч. для случаев *C1* и *C2*, соответственно) методом ГХ-МС (SIM).

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [311, 327-329].

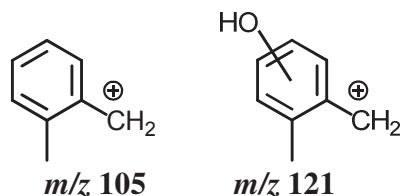


Рис. 4.86. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов JWH-251.

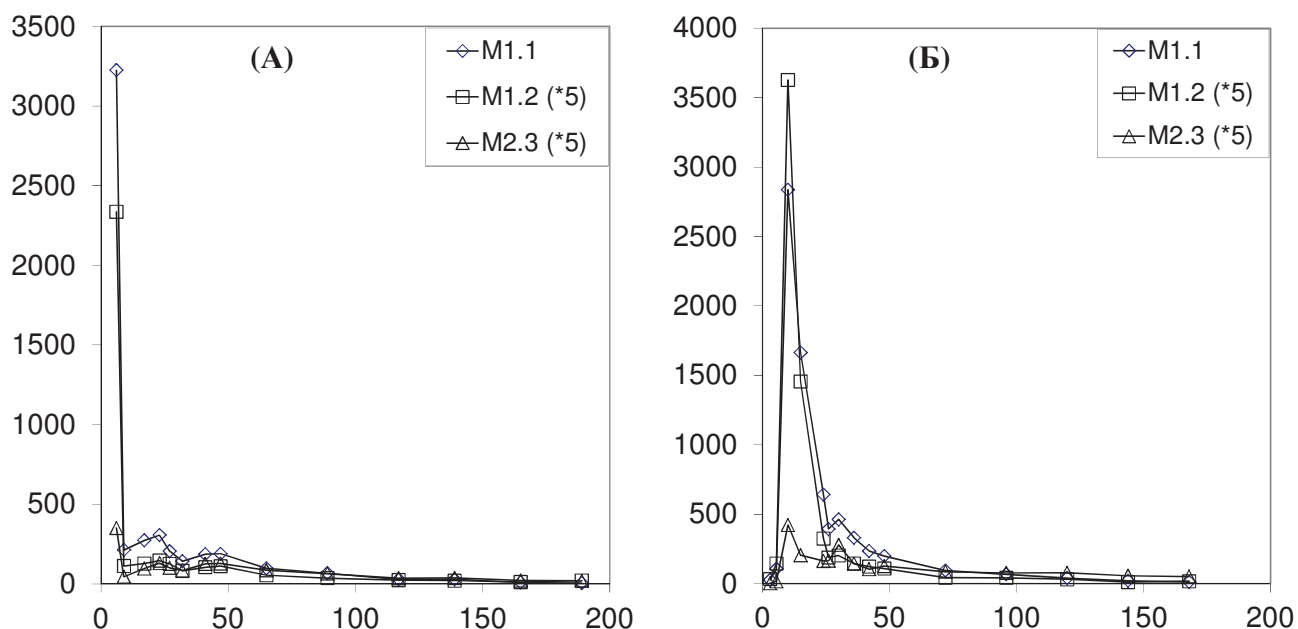


Рис. 4.87. Экскреция метаболитов JWH-251 с мочой, случаи *C1* (А), и *C2* (Б), принимавших каннабимиметик пероральным способом. Площади **M1.2** и **M2.3** показаны увеличенными в 5 раз.

4.9. Выявление метаболитов RCS-4

Сведения о происхождении бензоиндольного производного RCS-4 (DD-001, SR-19, BTM-4 Eric-4, E-4, OBT-199 и пр.), Рисунок 4.88, и его аффинности к каннабиноидным рецепторам отсутствуют в известных нам публикациях. Тем не менее, каннабимиметическую активность этого соединения можно считать доказанной ввиду его очевидной популярности, 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.

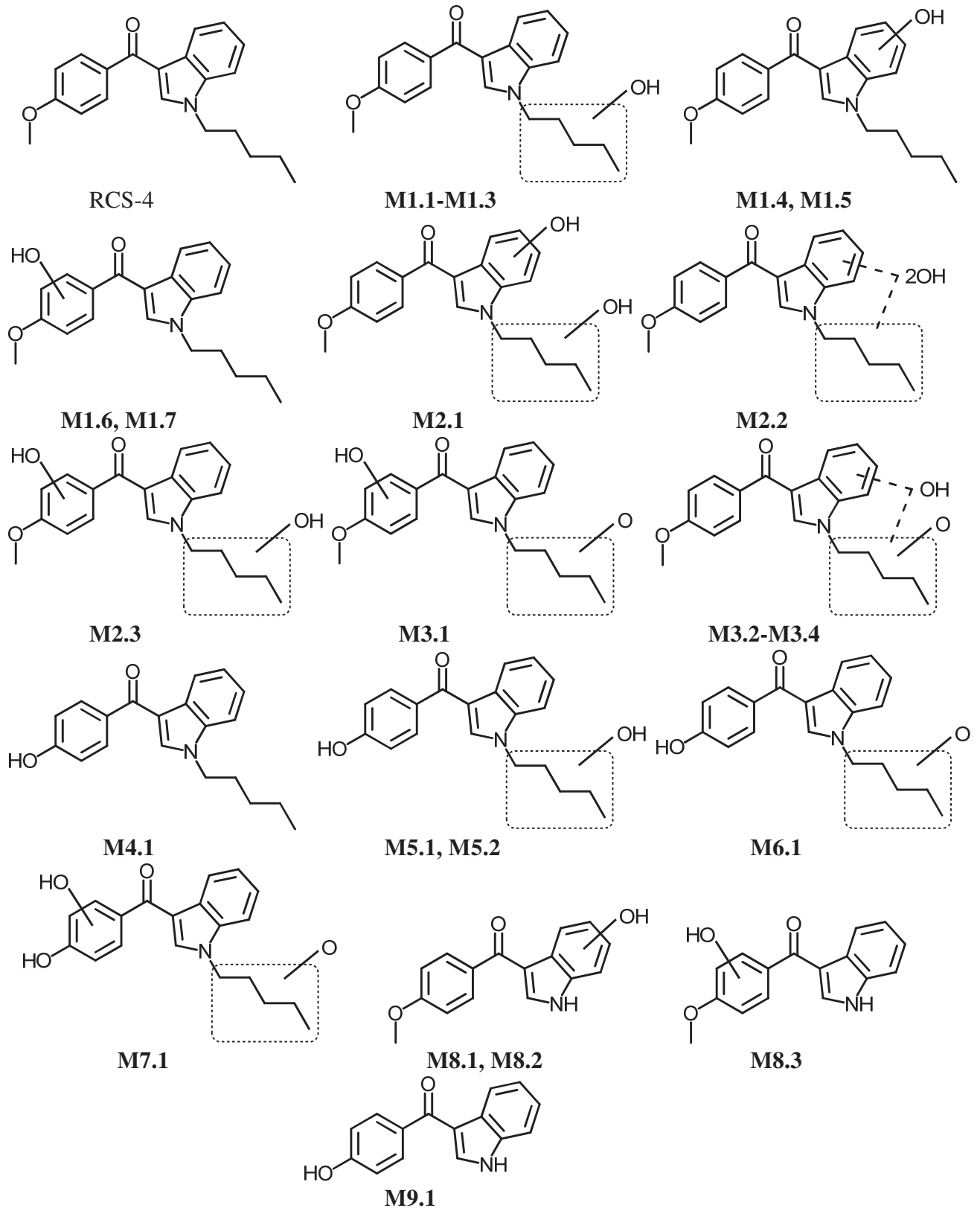


Рис. 4.88. Структуры RCS-4 и его метаболитов.

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 [211]. В дальнейшем исследования метаболизма RCS-4 выполнялись нами совместно с ирландскими исследователями. Идентификация RCS-4 была впоследствии подтверждена [224].

Учитывая значительные отличия в метаболизме N-алкилиндольных каннабимиметиков для человека и крыс, а также сформировавшуюся определенность в возможных направлениях метаболизма и предсказания хроматомасс-спектрометрических характеристик метаболитов, мы отказались от использования лабораторных животных в дальнейших исследованиях. Метаболиты RCS-4 искали только в образцах мочи людей, принимавших это соединение пероральным и ингаляционным способами.

RCS-4 (мелкокристаллический порошок белого цвета) был синтезирован в лаборатории Kavanagh и охарактеризован методами ЯМР, ТСХ, ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Примерное содержание целевого вещества, оцененное данными методами, составляло более 95%.

Для выявления метаболитов RCS-4 и определения их структурных характеристик были собраны образцы мочи у персон (37), доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, сортировали так же, как и для случая JWH-018.

Случаи, использованные для измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

C1 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 167 часов после приема.

C2 – курение. Мочу собирали в течение 209 ч.

Подготовка проб и условия анализа. Подготовка проб аналогична случаю фенилацетилиндролов. Образцы мочи деконъюгировали кислотным и ферментативным способами. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных, ацетилированных, и метилированных образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS и метилированных образцов. Для подтверждения положения гидроксильных групп гидролизованные образцы мочи дериватизировали последовательно метилированием и триметилсилилированием. Всего охарактеризовали 23 соединения (Рисунок 4.88). Ни в одном из образцов не обнаружили исходный RCS-4.

Концентрирование метаболитов RCS-4 проводили методом полупрепаративной ВЭЖХ-ДМД (Приложение 1), колонка Zorbax SB-C18. 100 мл мочи обработали по схеме кислотного гидролиза. Сухой остаток растворили в элюенте (700 мкл) и разделили на 6 фракций при изократическом элюировании (вода-ацетонитрил 2:8 об.) со стадией очистки (3.5 мин после ввода, длительность 1 мин., ацетонитрил). Скорость потока была 1 мл/мин, вводимый объем 40 мкл. Времена отбора фракций, мин: (1) 1.4-1.7, (2) 1.7-1.9, (3) 1.9-2.1, (4) 2.1-2.3, (5) 2.3-2.7, (6) 2.7-3.1, (7) 3.1-3.5, (8) 3.5-3.9. Мертвый объем системы оценивали по удерживанию урацила (1.25 мин); удерживание нативного RCS-4 составляло 4.50 мин. Каждую фракцию упаривали в вакуумном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) досуха и анализировали методом ГХ-МС.

Выявление метаболитов и определение их структурных характеристик. *МС фрагментация исходного RCS-4.* В отличие от фенилацетилиндролов, в спектре бензоиндрольного производного интенсивен пик метоксифенилацилиум-иона (m/z 135). Остальные пути фрагментации (образование N-пентилиндолацилиум-иона, m/z 214, индолацилиум-иона, m/z 144, и ионов, появляющихся при последовательном элиминировании цепи, m/z 250, 264, 278) подобны рассмотренным каннабимиметикам, Рисунки 4.99-4.101. В ЭИ спектре RCS-4 присутствует интенсивный пик иона, m/z 135, и малоинтенсивный пик, m/z 214, имеющие то же происхождение, что и при ЭИ (см. структуры фрагментных ионов, приведенных в предыдущих подразделах).

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.7 (M.w. = 337). Мочевой метаболический профиль RCS-4 уникален, и этот факт определяется *p*-положением метоксигруппы в метоксифенильном остатке, что делает ее доступной для ферментов-гидролаз. Следствие этого является обилие *O*-дезметилированных метаболитов, и данный путь является преимущественным для метаболизма RCS-4. Следует отметить, что для JWH-250 (*o*-положение метоксигруппы в метоксибензильном остатке) подобный метаболический путь, по-видимому, маловероятен.

Содержание моногидроксилированных метаболитов во всех образцах мочи было невелико. Метаболиты **M1.1-M1.3** выявляли только методом ЖХ-МС/МС, Рисунок 4.89. Их-за малой концентрации и низкой характеристичности их ЭР спектров, с уверенностью можно лишь указать на локализацию гидроксильной группы в пределах пентилиндрольного остатка (вследствие существования пика иона, m/z 135, указывающего на наличие неизменного метоксифенильного остатка). Предположение о локализации гидроксильных групп на боковой цепи, а не на индрольном кольце, основано только на малом удерживании метаболитов **M1.1-M1.3** (см. предыдущие подразделы).

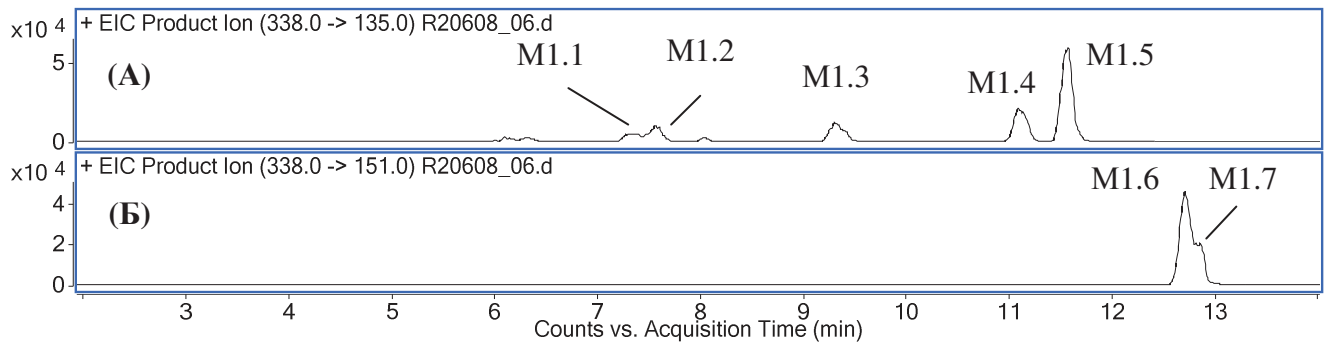


Рис. 4.89. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильной группы на пентилиндольном (А) и метоксифенильном (Б) остатках.

Метаболиты **M1.4-M1.7** выявляли как методом ЖХ-МС/МС, так и ГХ-МС ВЭЖХ фракций, Рисунок 4.90. Индексы удерживания приведены в Таблице 4.16.

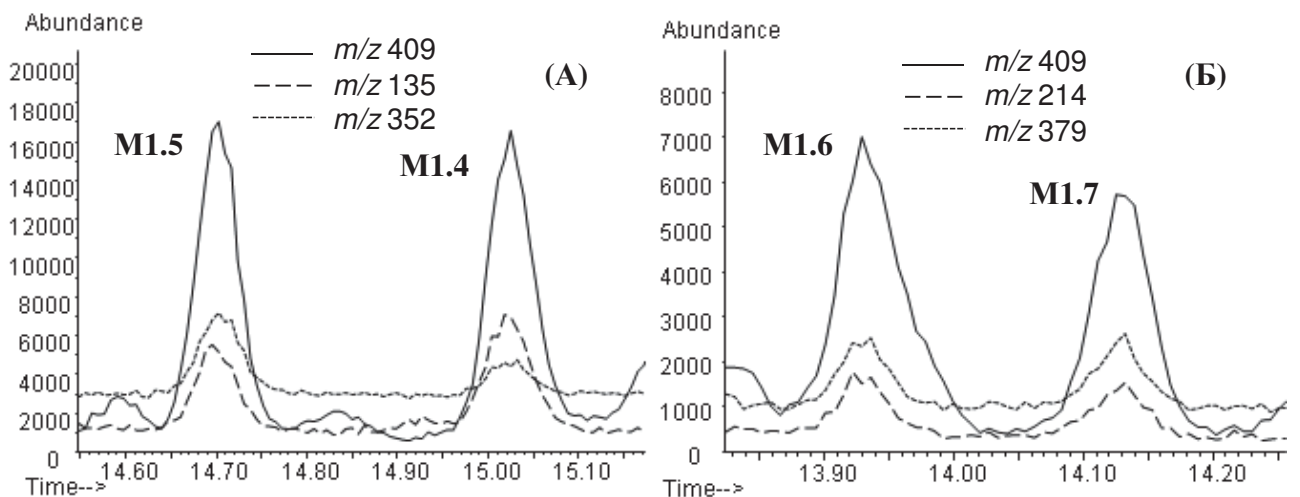


Рис. 4.90. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракций 5 (А) и 6 (Б) образца мочи человека. Метаболиты RCS-4, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

Подобно аналогичным метаболитам других каннабимиметиков, рассмотренных выше, ЖХ удерживание метаболитов с гидроксильной группой на индольном кольце (**M1.4** и **M1.5**) выше, нежели удерживание **M1.1-M1.3**, а удерживание метаболитов с гидроксильной группой, расположенной вне пределов алкилиндольного остатка (**M1.6** и **M1.7**) наиболее велико. Этот порядок элюирования подтверждает масс-спектроскопические характеристики метаболитов. Так, в ЭИ и ЭР спектрах **M1.4** и **M1.5** присутствуют пики ионов, m/z 135 и 144 (неизмененные метоксифенильный остаток и индольный цикл, соответственно). В ЭР спектрах **M1.6** и **M1.7** имеются пики ионов, m/z 151 и 214, указывающие на локализацию гидроксильной группы в

пределах метоксифенильного остатка. Пики ионов, m/z 214 и 144 присутствуют в ЭИ спектрах **M1.6** и **M1.7**, что согласуется с предположенной локализацией гидроксильных групп.

Поиск моногидроксилированных метаболитов, пример которого был приведен в работе [320], нецелесообразен из-за их малого относительного содержания по сравнению с другими формами, см. далее.

Дигидроксилированные метаболиты M2.1-M2.3 (M.w. = 353). Эти соединения также являются минорными в мочевом метаболическом профиле RCS-4.

Из-за малой концентрации **M2.2** (это соединение наблюдали только методом ЖХ-МС/МС, Рисунок 4.91), его структурные особенности определили лишь приблизительно. Можно лишь отметить, что обе гидроксильные группы находятся на пентилиндольном остатке. С другой стороны, характеристика структур **M2.1** и **M2.3** основана как на данных ЖХ-МС/МС, так и ГХ-МС (Рисунок 4.92). ЭИ спектры обоих соединений имеют пики ионов, m/z 352 и 353, указывающие на локализацию одной гидроксильной группы на ароматической части молекул, и, следовательно, наличие интенсивных пиков ионов, m/z 153 и 151 указывает на моногидроксилирование индольного кольца для **M2.1** и метоксифенильного остатка для **M2.3**, соответственно.

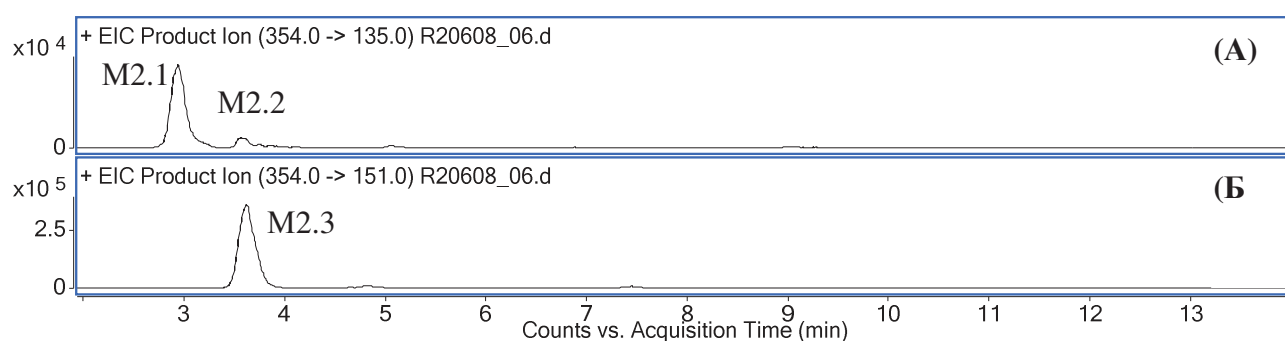


Рис. 4.91. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Дигидроксилированные метаболиты с расположением гидроксильных групп на пентилиндольном (А) и пентилиндольном и метоксифенильном (Б) остатках.

Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи M3.1-M3.4 (M.w. = 351). Подобно рассмотренным выше метаболитам, хроматографические пики этих соединений также малоинтенсивны. Методом ГХ-МС выявлен только один метаболит (**M3.1**), остальные соединения выявляли методом ЖХ-МС/МС, Рисунок 4.93.

Как ЭИ, так и ЭР спектры **M3.1** содержат пик иона, m/z 85, указывающий на присутствие карбонильной группы на боковой N-пентильной цепи. Дополнительным подтверждением служит также присутствие пика иона, m/z 228 (карбонильная группа в пределах пентилиндольного остатка, см. в предыдущих подразделах), в ЭИ спектре **M3.1**. Пик иона, m/z

151, в ЭР спектре **M3.1** и иона, m/z 352 (вместе с m/z 228) в его ЭИ спектре указывают на наличие гидроксильной группы на метоксифенильном остатке.

Таблица 4.16. Индексы удерживания RCS-4 и его метаболитов для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	VF-5ms		HP-5ms		Фр. №
				Реж. III	Реж. I	Реж. I	Реж. II	
1	RCS-4	C ₂₁ H ₂₃ NO ₂	321	3125	3094	3086	3057	-
2	M1.4 TMS	C ₂₄ H ₃₁ NO ₃ Si	409	3355	3333	-	-	5
3	M1.5 TMS	C ₂₄ H ₃₁ NO ₃ Si	409	3332	3311	-	-	5
4	M1.6 TMS	C ₂₄ H ₃₁ NO ₃ Si	409	3279	3254	-	-	6
5	M1.7 TMS	C ₂₄ H ₃₁ NO ₃ Si	409	3296	3269	-	-	6
6	M2.1 2TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₄ Si ₂	497	3508	3489	-	-	2
7	M2.3	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	353	-	-	3457	3425	2
8	M2.3 2TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₄ Si ₂	497	3475	3454	-	-	2
9	M2.3 2AC	C ₂₅ H ₂₇ NO ₆	437	-	-	3594	3566	2
10	M3.1	C ₂₁ H ₂₁ NO ₄	351	-	-	3414	3377	3
11	M3.1 TMS	C ₂₄ H ₂₉ NO ₄ Si	423	3483	3453	-	-	3
12	M3.1 AC	C ₂₃ H ₂₃ NO ₅	393	-	-	3511	3477	3
13	M4.1 TMS	C ₂₃ H ₂₉ NO ₂ Si	379	3170	3140	-	-	6
14	M5.1	C ₂₀ H ₂₁ NO ₃	323	-	-	3396	3355	2
15	M5.1 2TMS	C ₂₆ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	467	3357	3336	-	-	2
16	M5.1 2AC	C ₂₄ H ₂₅ NO ₅	407	-	-	3458	3429	2
17	M5.2 2TMS	C ₂₆ H ₃₇ NO ₃ Si ₂	467	3326	3306	-	-	2
18	M6.1	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	321	-	-	3341	3302	2
19	M6.1 TMS	C ₂₃ H ₂₇ NO ₃ Si	393	3356	3326	-	-	2
20	M6.1 AC	C ₂₂ H ₂₁ NO ₄	363	-	-	3369	3333	2
21	M7.1 2TMS	C ₂₆ H ₃₅ NO ₄ Si ₂	481	3472	3447	-	-	3
22	M8.1 2TMS	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃ Si ₂	411	3078	3062	-	-	2
23	M8.2 2TMS	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃ Si ₂	411	3113	3094	-	-	2
24	M8.2 2Me	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	295	3132	3096	-	-	2
25	M8.3 2TMS	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃ Si ₂	411	3052	3034	-	-	2
26	M8.3 2Me	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	295	3037	3011	-	-	2
27	M9.1 2TMS	C ₂₁ H ₂₇ NO ₂ Si ₂	381	2924	2904	-	-	2

Согласно наличию пика иона, m/z 135, гидроксильные группы у **M3.2-M3.4** находятся на пентилиндольном остатке. Предполагать их детализированную локализацию можно лишь на основании ЖХ удерживания (см. выше). Так, **M3.4**, скорее всего, является карбоксилированным метаболитом, а у **M3.2** и **M3.3** гидроксильная группа находится на индольном цикле.

Дезметилированный метаболит M4.1 (M.w. = 307). Судя по интенсивности хроматографических пиков (Рисунок 4.94), относительное содержание **M4.1** в мочеви смеси невелико. Его ЭР спектр содержит интенсивный пик иона, m/z 121, указывающий на наличие О-дезметилированного метоксифенильного остатка, и малоинтенсивный, m/z 214 (неизмененный

пентилиндольный остаток). Аналогами этих ионов в ЭИ спектре (TMS) **M4.1** выступают ионы, m/z 193 и 214.

При метилировании **M4.1** получали исходный RCS-4.

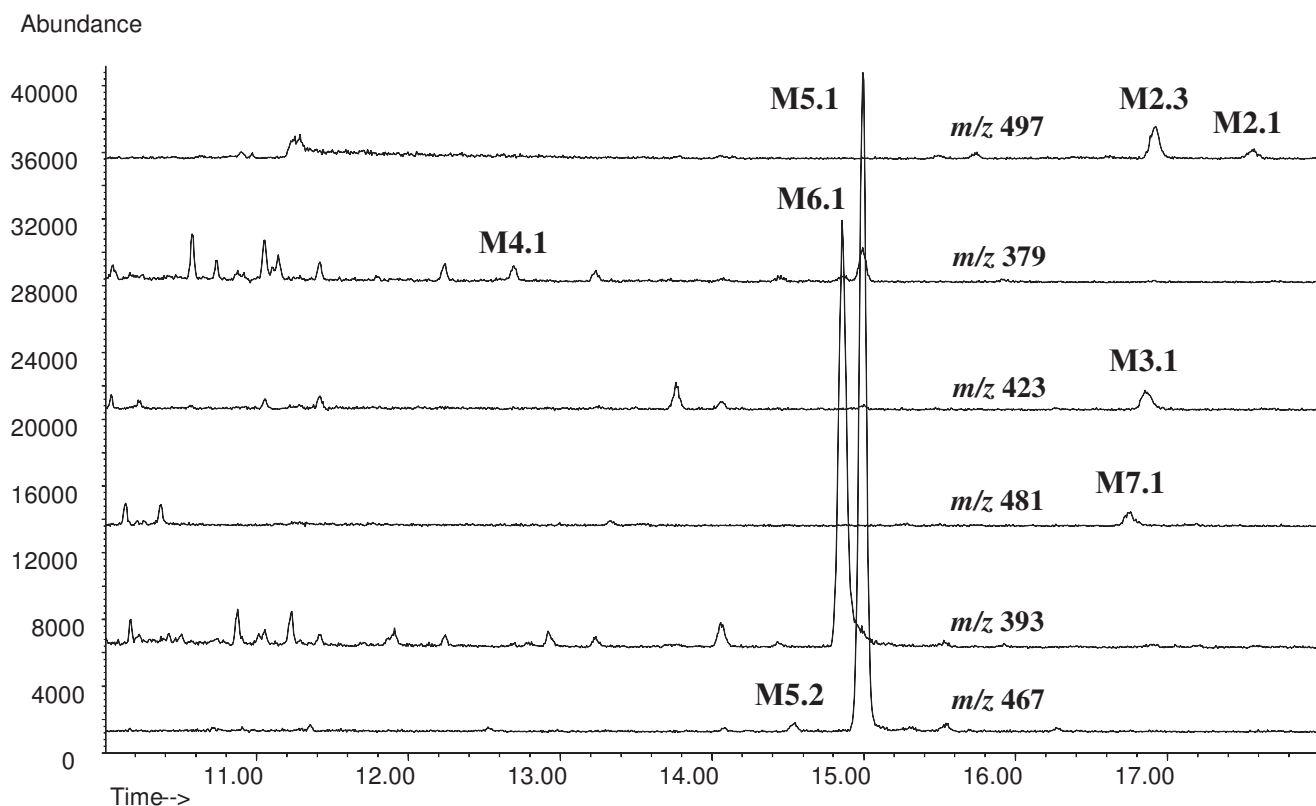


Рис. 4.92. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Метаболиты RCS-4, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

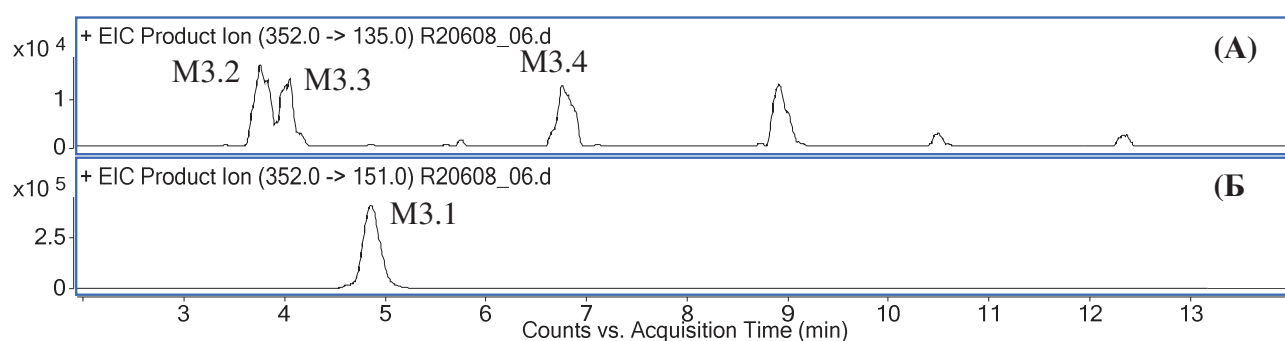


Рис. 4.93. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Дигидроксированные метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи. с расположением гидроксильных групп на пентилиндольном (А) и пентилиндольном и метоксифенильном (Б) остатках

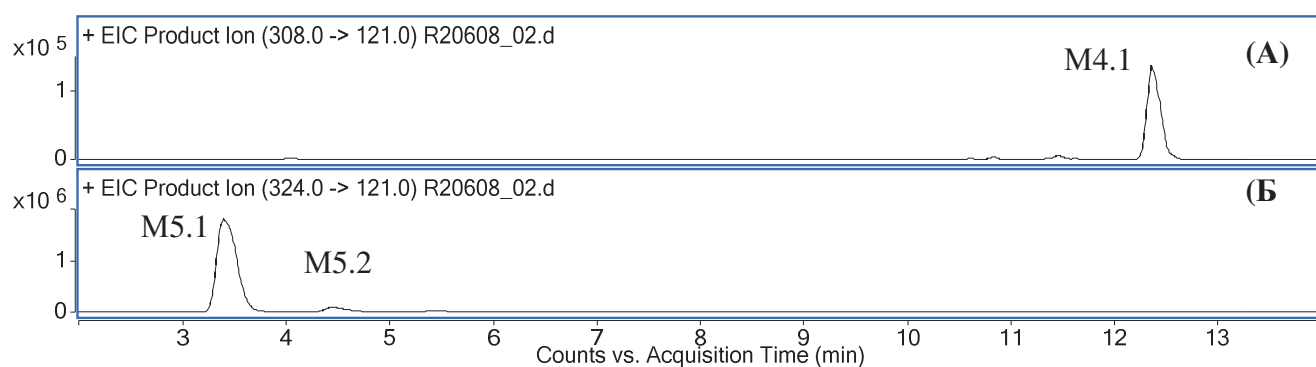


Рис. 4.94. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Деметилированный метаболит (А) и деметилированные метаболиты с гидроксильной группой на боковой цепи (Б).

Деметилированные метаболиты с гидроксильной группой на боковой цепи **M5.1**, **M5.2** (M.w. = 323). Метаболит **M5.1** характеризуется одним из наиболее интенсивных хроматографических пиков как в условиях ГХ-МС, так и ЖХ-МС/МС (Рисунки 4.92 и 4.94). Вместе с рядом других, это соединение может быть обнаружено в некоторых образцах мочи и без дериватизации или в форме ацетильных дериватов, Рисунок 4.95.

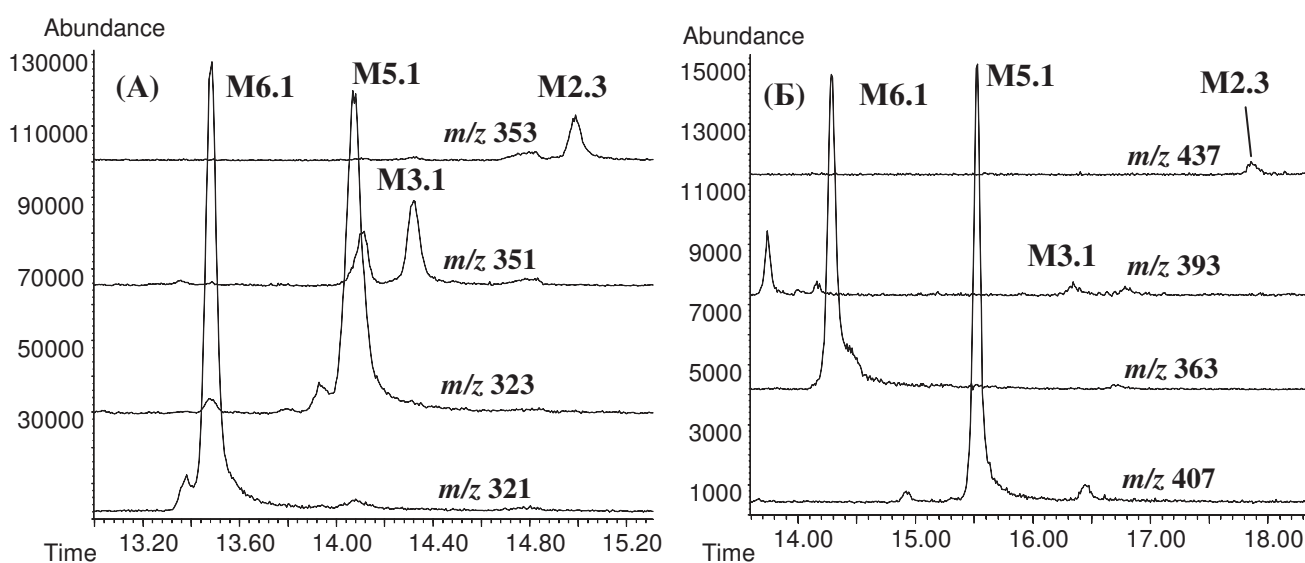


Рис. 4.95. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Метаболиты RCS-4 в свободной (А) и в АС (Б) формах.

ЭР спектр **M5.1** содержит интенсивный пик иона, m/z 121, и малоинтенсивный – m/z 186, причем последний образуется в результате дегидратации моногидроксилированной боковой цепи (см. выше). В ЭИ спектре **M5.1** (TMS) присутствуют ионы, m/z 193 и 309, наличие которых отвечает деметилированию метоксифенильного остатка и моногидроксилированию

боковой цепи. Кроме пика иона, m/z 193, ЭИ спектр минорного **M5.2** содержит интенсивный пик, m/z 323, - N-метилиндольный ион-радикал, образование которого характерно для метаболитов JWH-073 и бензоиндолов (см. далее).

Дезметилированный метаболит с карбонильной группой на боковой цепи M6.1 (M.w. = 321). Единственный выявленный метаболит подобной структуры также образует интенсивные хроматографические пики в условиях ГХ-МС и ЖХ-МС/МС, Рисунки 4.92, 4.95 и 4.96. Его ЖХ удерживание несколько выше, чем у **M5.1**, а ЭР спектр кроме интенсивного пика иона, m/z 121 (дезметилированный метоксифенильный остаток) имеет пик иона, m/z 85, указывающий на существование карбонильной группы на боковой цепи. В ЭИ спектре (TMS) **M6.1** кроме пика иона, m/z 193 (дезметилирование), присутствуют пики, m/z 144, 308 и 322, указывающие на сохранение остальной части структуры и m/z 85 и 228, соответствующие наличию карбонильной группы на боковой цепи.

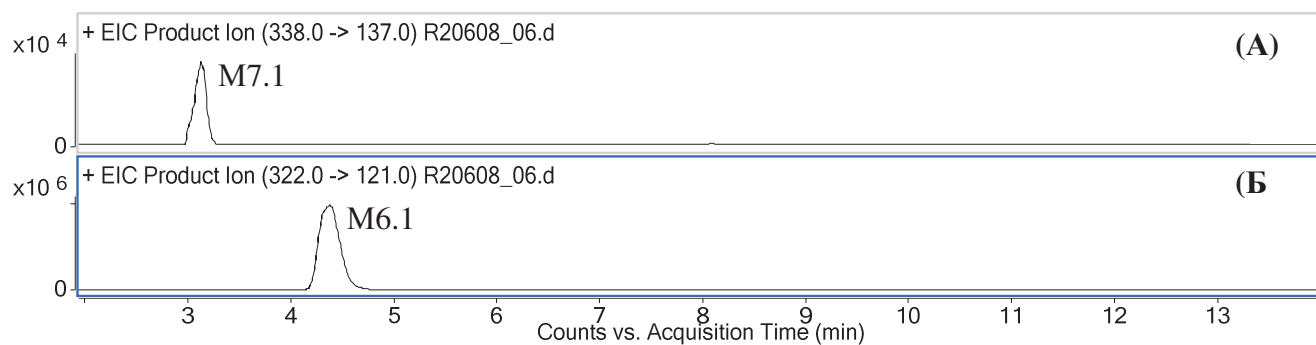


Рис. 4.96. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Дезметилированный метаболит с карбонильной группой на боковой N-пентильной цепи и гидроксильной группой на гидроксифенильном остатке (А), дезметилированный метаболит с карбонильной группой на боковой цепи (Б).

Дезметилированный метаболит с карбонильной группой на боковой цепи и гидроксильной группой на гидроксифенильном остатке M7.1 (M.w. = 337). В ЭР спектре данного метаболита присутствует интенсивный пик иона, m/z 137, указывающий на наличие гидроксильной группы на дезметилированном метоксифенильном остатке и m/z 85, обычный для метаболитов с изолированной карбонильной группой на боковой цепи. Насколько можно судить по интенсивности хроматографических пиков, относительное содержание этого метаболита невысоко; тем не менее, его ЭИ спектр (TMS), зарегистрированный при анализе ВЭЖХ фракции 3, полностью подтверждает предположения о структуре: в нем присутствуют пики ионов, m/z 396 и 410, указывающие на дезметилирование метоксифенильного остатка и дополнительное гидроксирование ароматической части, а также m/z 85 и 228.

Образование карбонильной группы на боковых цепях характерно для многих каннабимиметиков, описанных выше; для случая HU-210 подобное направление метаболизма обнаружено методом *in vitro* [330].

N-Дезпентилированные моногидроксилированные метаболиты **M8.1-M8.3** (M.w. = 267). По крайней мере, два дезпентилированных метаболита с гидроксильной группой на индольном остатке (**M8.1** и **M8.2**) и один – с гидроксильной группой на метоксифенильном остатке (**M8.3**) присутствуют в мочевом метаболическом профиле RCS-4, Рисунок 4.97. В ЭР спектрах **M8.1** и **M8.2** имеются пики ионов, m/z 135 и 160, указывающие на наличие неизмененного метоксифенильного и моногидроксилированного индольного остатков, соответственно. В ЭР спектре **M8.3** имеются пики ионов, m/z 151 и 144, являющиеся аналогами указанных ионов при смене локализации гидроксильной группы. Малое содержание **M8.1-M8.3** в моче потребовало регистрации их ЭИ спектров посредством анализа ВЭЖХ фракции 2 (Рисунок 4.98). На отмеченную локализацию гидроксильных групп указывает наличие пиков ионов, m/z 304 и 216 в ЭИ спектрах **M8.1**, **M8.2** и **M8.3**, соответственно.

N-Дезпентилированный *O*-дезметилированный метаболит **M9.1** (M.w. = 237). Определение структуры этого соединения по характеру масс-фрагментаций не представляет затруднений: для ЭР спектра характерны ионы, m/z 121 и 144, а для ЭИ спектра (TMS) – их аналоги m/z 193 и 216. Каждая пара ионов указывает на дезметилирование метоксифенильного остатка и на наличие неизмененного индольного цикла, соответственно. ЖХ-МС/МС хроматограмма приведена на Рисунке 4.97, а ГХ-МС – на Рисунке 4.98.

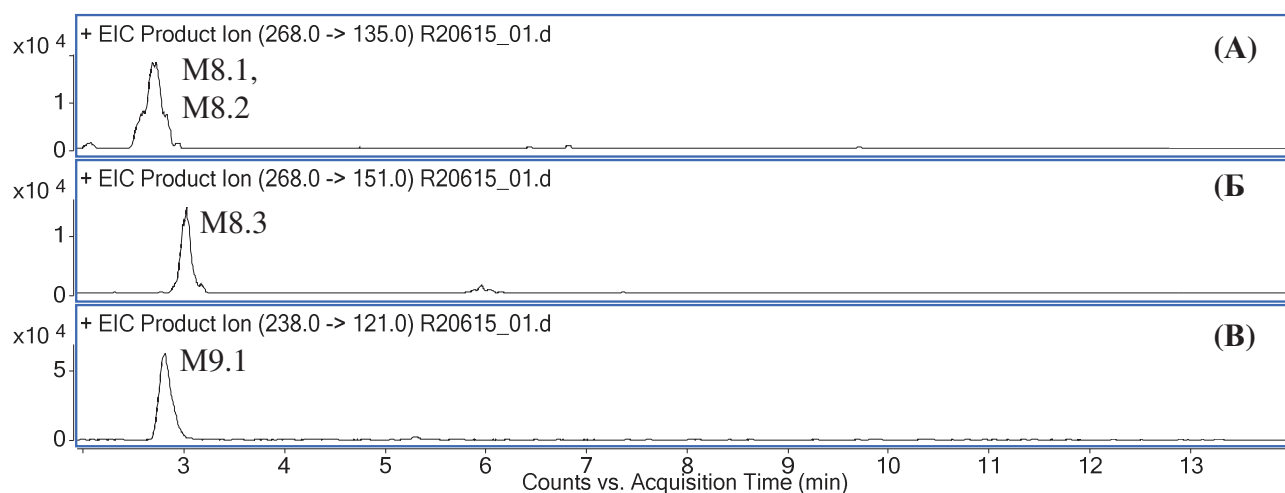
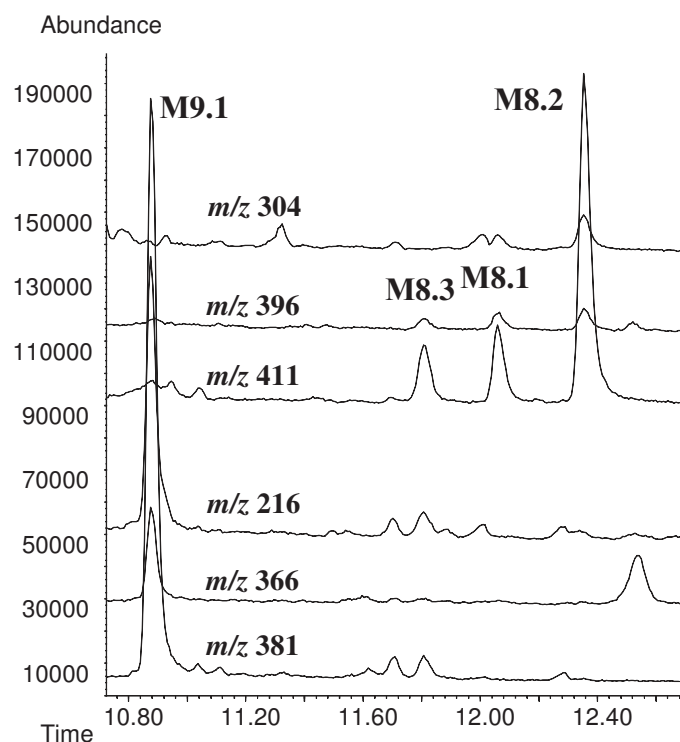


Рис. 4.97. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. *N*-Дезпентилированные метаболиты с гидроксильной группой на индольном (А) и метоксифенильном (Б) остатках. *N*-Дезпентилированный *O*-дезметилированный метаболит (В).

Полуколичественные измерения. Все, что было сказано в плане физиологического состояния пациентов для случая JWH-251, справедливо и для RCS-4. Тем не менее, можно заключить, что при пероральном приеме (Рисунок 4.102А) наблюдается замедление экскреции (максимум концентрации приходится на 11 ч. после приема), а при курении (Рисунок 4.102Б) очевидно непрерывное падение концентраций метаболитов, начиная с первой порции мочи, собранной через 2.5 ч. после приема.

Рис. 4.98. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракции 2. N-дезпентилированные метаболиты RCS-4, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим I).



В Таблице 4.17 приведены относительные площади хроматографических пиков девяти метаболитов в мочевых образцах, собранных у пациентов наркодиспансеров. За исключением соотношения метаболитов, полученного для случая C2 (2.5 часов после приема RCS-4) и (частично) пациента VII, наибольшей площадью обладают пики метаболитов **M5.1** и **M6.1**.

Диаграммы экскреции и данные в Таблице 4.17 были получены посредством анализа образцов мочи после кислотного деконъюгирования, TMS дериватизации и с использованием внутреннего стандарта папаверина с помощью метода, описанного выше. Количественной характеристикой послужили площади пиков на ион-хроматограммах для m/z , соответствующих молекулярным ионам (ГХ-МС, режим SIM). Метаболит **M5.1** наблюдали в течение 114 ч. (пероральный прием), и метаболиты M3.1, M5.1 и M6.1 (курение) - вплоть до времени завершения сбора мочи (209 ч.) методом ГХ-МС (SIM).

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [328, 331].

Таблица 4.17. Относительная площадь пиков девяти метаболитов в мочевых образцах. ГХ-МС, SIM по молекулярным ионам.

Метаболит	Образцы от разных пациентов					Случаи, использованные для измерения профилей экскреции	
	I	II	III	VI	VII	C1 (11 ч.)	C2 (2.5 ч.)
M2.3	2.4	5.8	1.9	<1.0	6.3	6.4	4.2
M2.1	0.6	2.4	<1.0	<1.0	3.3	1.7	1.4
M3.1	1.7	1.7	<1.0	<1.0	2.4	5.2	6.3
M4.1	0.9	3.4	<1.0	<1.0	2.9	2.4	9.5
M5.1	48.3	66.0	43.4	71.7	59.9	37.6	12.4
M6.1	43.1	20.1	54.7	28.3	10.3	33.1	13.8
M7.1	2.2	0.7	<1.0	<1.0	0.7	2.4	2.8
M8.2	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	5.2	3.9	27.4
M9.1	1.0	<1.0	<1.0	7.3	22.3	7.3	22.3

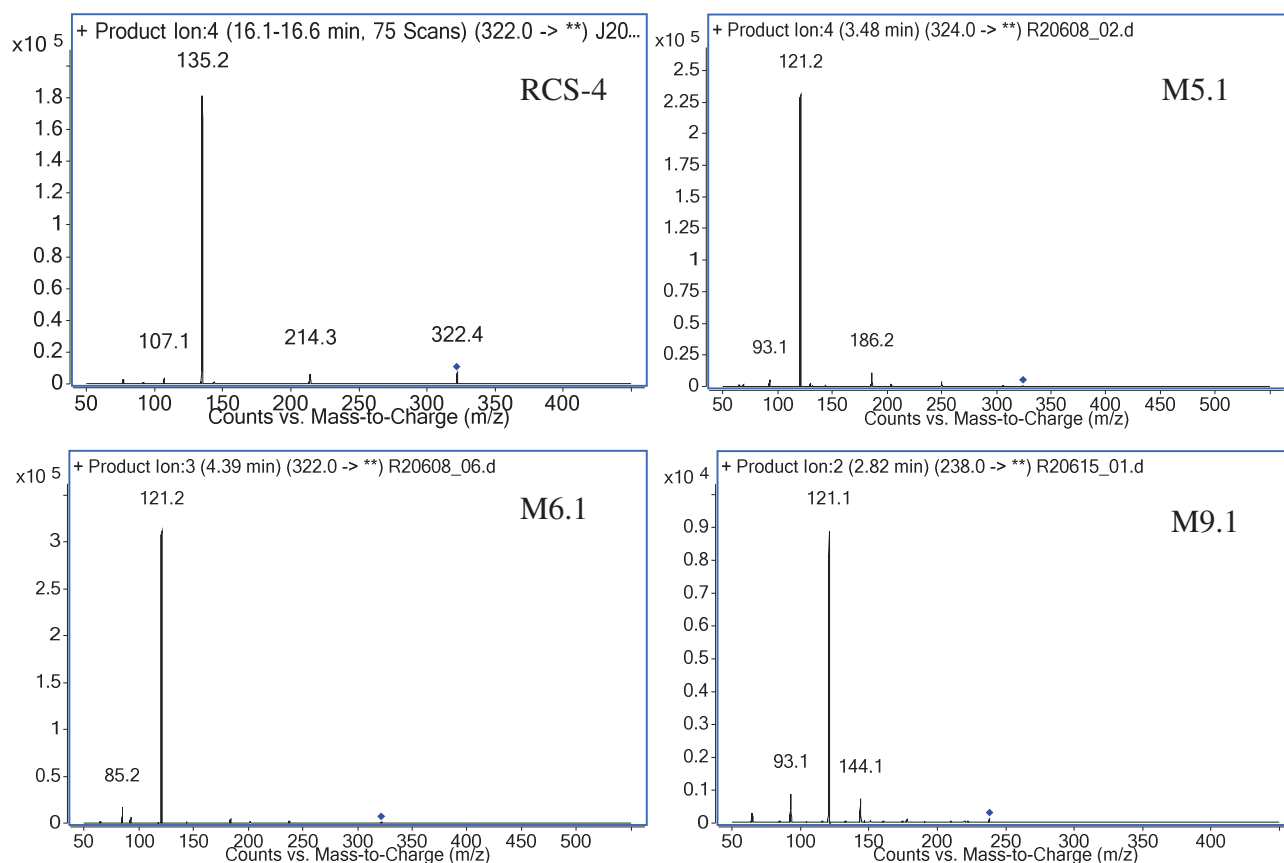


Рис. 4.99. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) RCS-4 и его метаболитов.

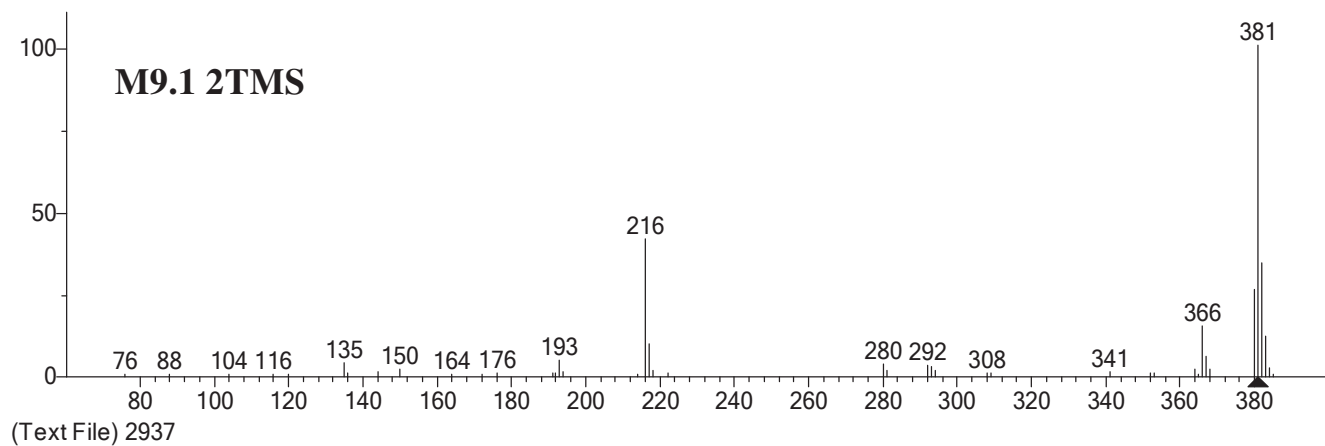
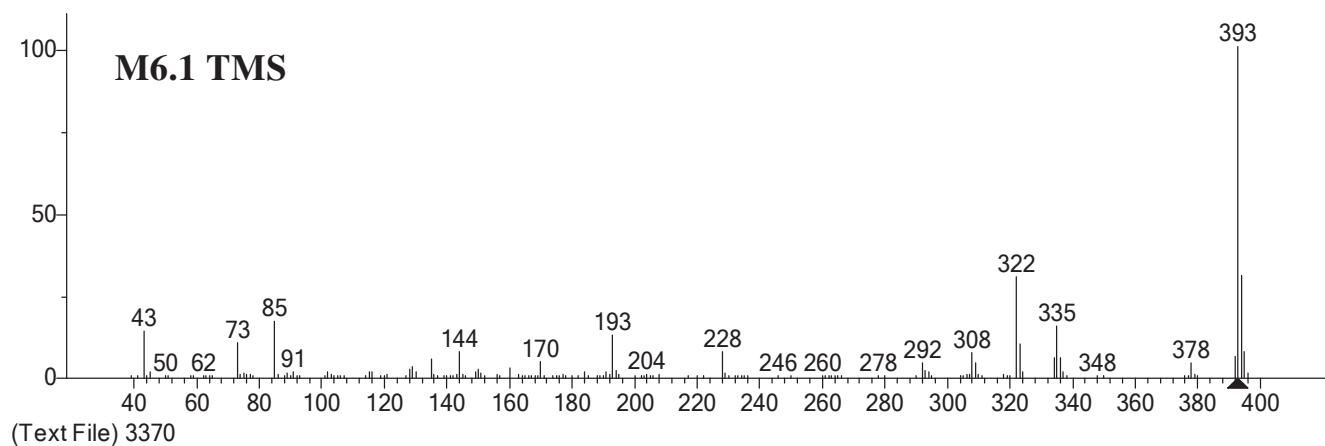
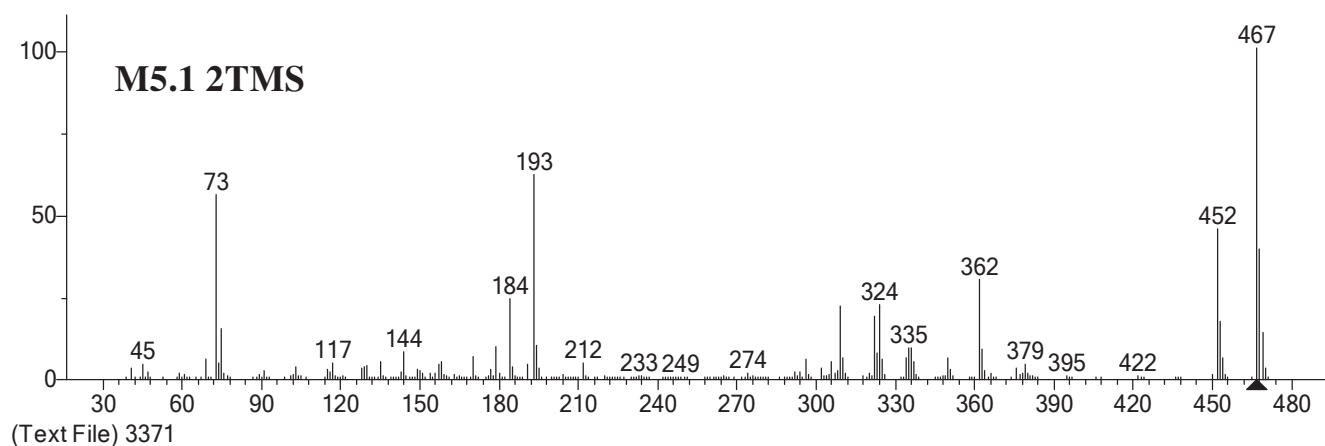
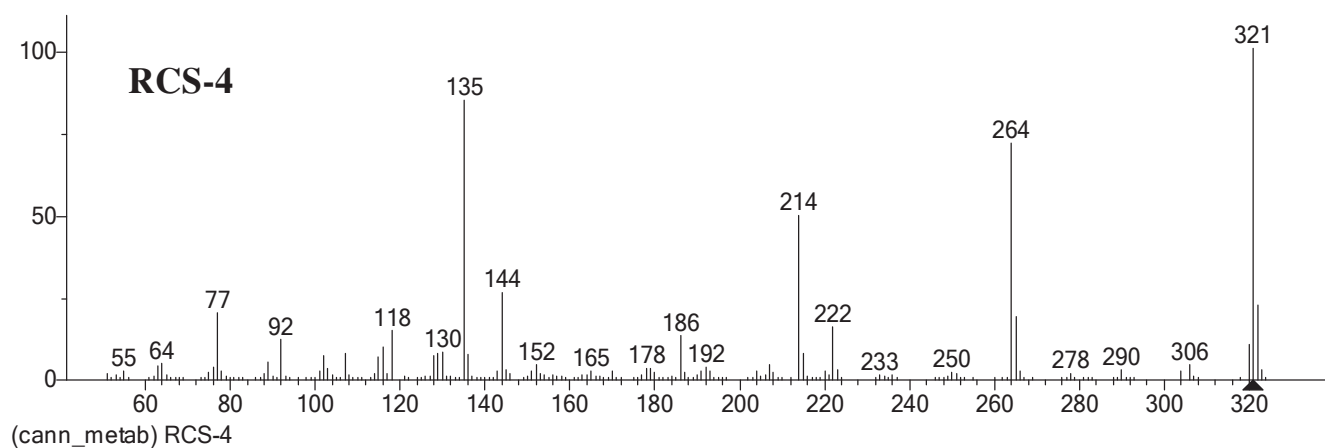


Рис. 4.100. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) RCS-4 и его метаболитов.

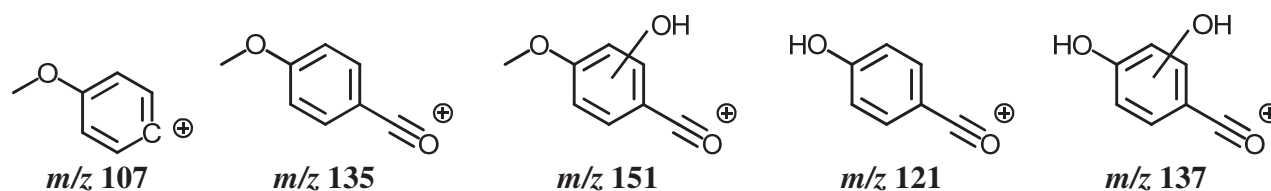


Рис. 4.101. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов RCS-4.

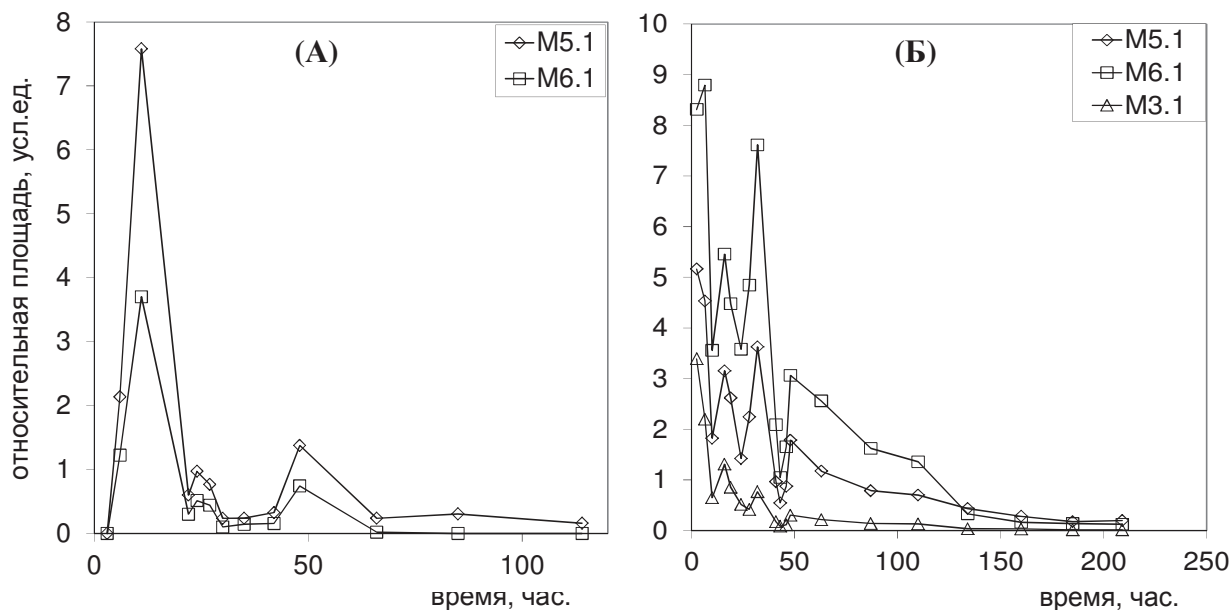


Рис. 4.102. Экскреция метаболитов RCS-4 с мочой, случаи *C1* (A), и *C2* (B), принимавших каннабимиметик пероральным и ингаляционным способами, соответственно.

4.10. Выявление метаболитов AM-694

AM-694, равно как и другие соединения, имеющие в обозначении префикс «AM», был синтезирован и охарактеризован группой Makriyannis (University of Connecticut, США), Рисунок 4.103 [183]. Главной особенностью AM-694 можно считать его чрезвычайно высокую аффинность к рецептору CB1 ($K_i=0.08$ нМ). Несмотря на то, что AM-694 был обнаружен в продуктах, продаваемых во многих странах мира (в т. ч. и в России), это соединение не пользуется популярностью, о чем свидетельствуют опубликованные результаты анализов курительных смесей и субстанций. Количественные результаты свидетельствуют о малых (по сравнению с другими каннабимиметиками) содержаниях AM-694 в готовых смесях [204].

Исследования метаболизма AM-694 выполнялись нами совместно с ирландскими исследователями. Синтезированный в лаборатории Kavanagh образец AM-694 (мелкокристаллический порошок белого цвета) был охарактеризован там же методами ЯМР,

ТСХ, ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Примерное содержание целевого вещества, оцененное данными методами, составляло более 95%.

Для исследования мочевого метаболического профиля АМ-694 использовали образцы мочи персон (34), доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, сортировали так же, как и для случая JWH-018.

Случаи, использованные для измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

C1 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 27 часа после приема (дальнейший сбор был нецелесообразен ввиду малой концентрации метаболитов АМ-694).

C2 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 117 ч.

C3 – курение. Мочу собирали в течение 165 ч.

Подготовка проб и условия анализа. Образцы мочи деконъюгировали кислотным способом; ферментативное деконъюгирование не применяли ввиду очевидной химической стабильности выявленных метаболитов. Химическую стабильность АМ-694 проверяли в условиях кислотного гидролиза. При анализе гидролизной смеси не обнаружили никаких признаков протекания возможных реакций с участием АМ-694.

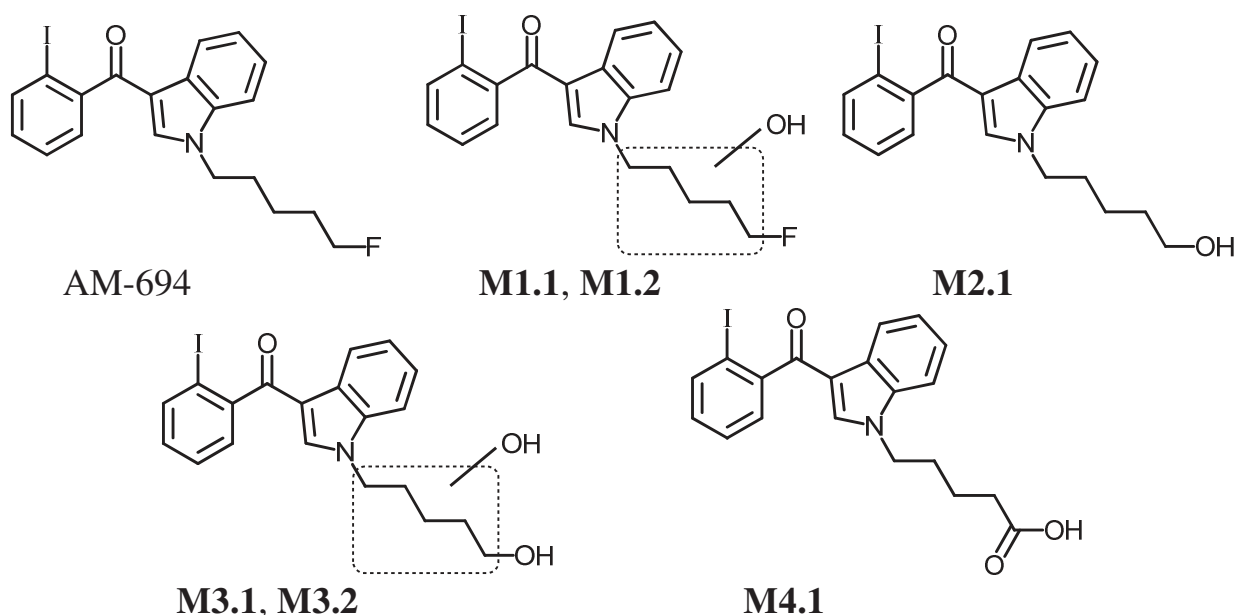


Рис. 4.103. Структуры АМ-694 и его метаболитов.

Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил)

согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных, метилированных и этерифицированных образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS, метилированных и этерифицированных образцов. Всего охарактеризовали 6 соединений (Рисунок 4.103), индексы удерживания и распределение соединений по ВЭЖХ фракциям приведены в Таблице 4.18. Исходный АМ-694 не был обнаружен ни в одном из образцов.

Концентрирование метаболитов АМ-694 проводили методом полупрепаративной ВЭЖХ-ДМД (Приложение 1), колонка Zorbax SB-C18. 50 мл мочи обработали по схеме кислотного гидролиза. Сухой остаток растворили в элюенте (400 мкл) и разделили на 6 фракций при изократическом элюировании (вода-ацетонитрил 25:75 об.) со стадией очистки (4 мин после ввода, длительность 1 мин., ацетонитрил). Скорость потока была 1 мл/мин, вводимый объем 40 мкл. Времена отбора фракций, мин: (1) 1.3-1.7, (2) 1.7-1.9, (3) 1.9-2.1, (4) 2.1-2.3, (5) 2.3-2.7, (6) 2.7-3.1, (7) 3.1-3.5, (8) 3.5-3.9. Мертвый объем системы оценивали по удерживанию урацила (1.25 мин); удерживание нативного АМ-694 составляло 4.10 мин. Каждую фракцию упаривали в вакуумном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) досуха и анализировали методом ГХ-МС.

Таблица 4.18. Индексы удерживания АМ-694 и его метаболитов для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺⁺	VF-5ms		HP-5ms		Фр. №
				Реж. III	Реж. I	Реж. I	Реж. II	
1	АМ-694	C ₂₀ H ₁₉ FINO	435	3265	3218	3215	3175	-
2	M1.1 TMS	C ₂₃ H ₂₇ FINO ₂ Si	523	3408	3372	-	-	5
3	M1.2 TMS	C ₂₃ H ₂₇ FINO ₂ Si	523	3378	3342	-	-	5
4	M2.1 TMS	C ₂₃ H ₂₈ INO ₂ Si	505	3433	3401	-	-	5
5	M3.1 2TMS	C ₂₆ H ₃₆ INO ₃ Si ₂	593	3520	3494	-	-	3
6	M3.2 2TMS	C ₂₆ H ₃₆ INO ₃ Si ₂	593	3501	3469	-	-	3
7	M4.1 TMS	C ₂₃ H ₂₆ INO ₃ Si	519	3533	3499	-	-	4
8	M4.1 Me	C ₂₁ H ₂₀ INO ₃	461	3481	3439	-	-	4

Выявление метаболитов и определение их структурных характеристик. МС фрагментация исходного АМ-694. Основным пикам в ЭР спектре АМ-694 соответствуют ионы, m/z 231 (иодофенилацилиум) и 309 (дезиодированная протонированная молекула АМ-694, ион-радикал), Рисунки 4.108 и 4.110. Основные направления ЭИ фрагментации АМ-694 (подобно большинству других каннабимиметиков) заключаются в разрыве связей между кетогруппой и ароматическими остатками, Рисунки 4.109 и 4.110. Наиболее интенсивный пик соответствует фторпентилиндолацилиум-иону (m/z 232). Важным путем ЭИ фрагментации также является

элиминирование иода, в результате чего появляются ионы, m/z 212, 220 и 308. Ион, m/z 360 образуется при элиминировании фторбутильного радикала от боковой цепи. Судя по спектрам метаболитов (см. далее), ион, m/z 204 по-видимому, является продуктом элиминирования боковой цепи и атома иода с последующей циклизацией (Рисунок 4.110).

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.2 (M.w. = 451). Мочевой метаболический профиль AM-694 является особенным и объясняется наличием атома фтора на конце боковой N-пентильной цепи. Как будет доказано далее, основные направления метаболизма связаны с дефторированием исходного соединения. Деалкилированные формы AM-694 не выявили.

Хроматографические пики моногидроксилированных метаболитов AM-694 малоинтенсивны. Эти соединения наблюдали методом ЖХ-МС/МС и – только в ВЭЖХ фракциях – методом ГХ-МС (Рисунки 4.104 и 4.105). ЭР спектры всех метаболитов выявленных в данном исследовании, малохарактеристичны и включают только один пик, соответствующий иону, m/z 231, и указывающий на наличие неизмененного иодофенильного остатка (Рисунок 4.110).

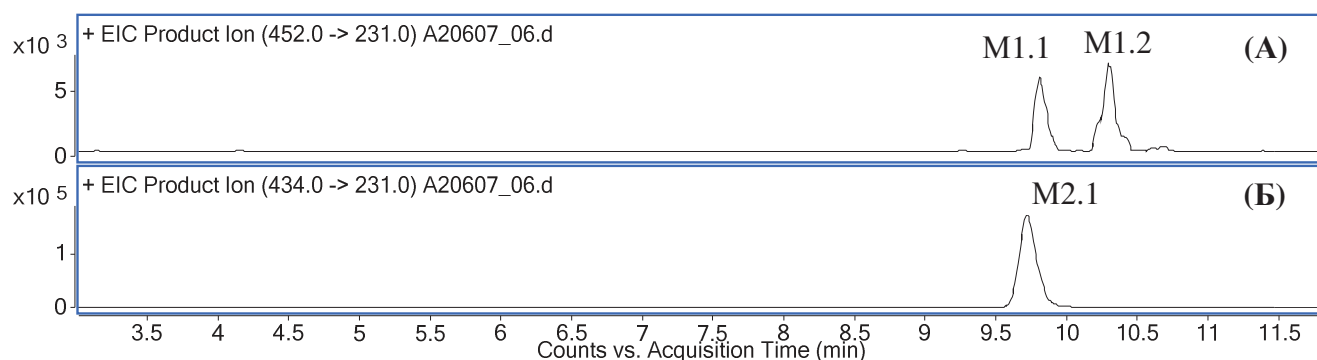


Рис. 4.104. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, кислотный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты AM-694 с расположением гидроксильных групп на боковой цепи (А). Дефторированный моногидроксилированный метаболит (Б).

ЭИ спектры **M1.1** и **M1.2** (TMS) подобны наличием пиков ионов, m/z 203, 204 и 231, демонстрирующих наличие неизмененного иодофенильного остатка. Различие ЭИ спектров этих соединений проявляется в путях элиминирования боковой цепи. Так, в спектре метаболита **M1.1** имеется пик иона, m/z 360, образующегося при элиминировании моногидроксилированного фторбутильного радикала, а в спектре **M1.2** (кроме пика иона, m/z 360) – интенсивный пик ион-радикала, m/z 361, для образования которого требуется элиминирование гидроксильной молекулы фторбутена. Структуры **M1.1** и **M1.2** подтверждены метилированием и последующим TMS; в результате этих процедур были

найлены только TMS дериваты, что свидетельствует о расположении гидроксильных групп на алифатическом остатке (боковой цепи).

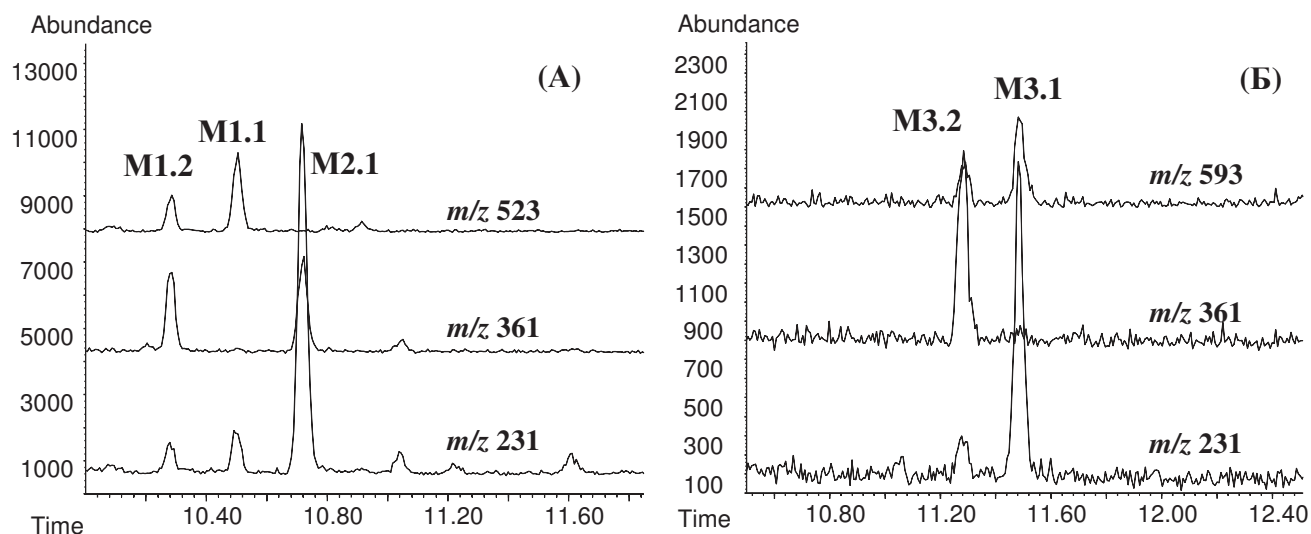
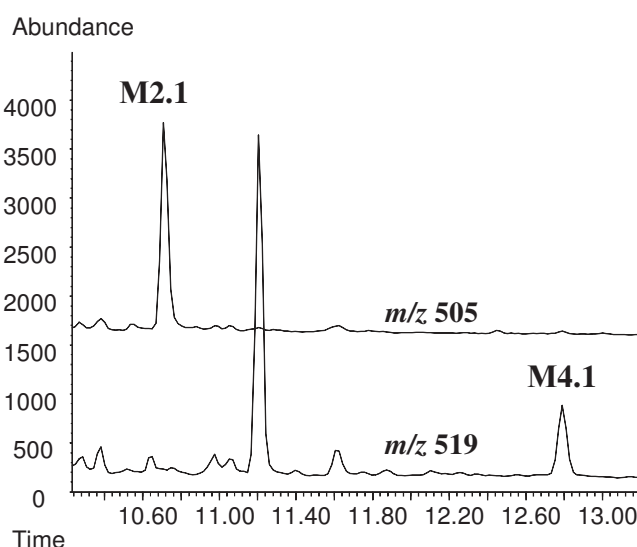


Рис. 4.105. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракции 5. (А) и фракции 3 (Б). Метаболиты АМ-694, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим III).

Дефторированный моногидроксилированный метаболит M2.1 (M.w. = 433). Этот метаболит характеризуется наиболее интенсивными хроматографическими пиками как в условиях ЖХ-МС/МС, так и ГХ-МС (Рисунки 4.104-4.106). Данный факт позволяет с уверенностью предположить, что основными направлениями метаболизма АМ-694 являются варианты окислительного дефторирования, а структуру **M2.1** можно считать достаточно детализированной. В ЭИ спектре M2.1 присутствуют пики ионов, m/z 144, 203, 204 и 231, характерные для спектра АМ-694 и указывающие на наличие неизменной ароматической части молекулы. Наличие пика иона, m/z 302, свидетельствует о замене атома фтора на гидроксильную группу (TMS).

Дефторированные дигидроксилированные метаболиты M3.1, M3.2 (M.w. = 449). Два этих метаболита отличаются от **M2.1** дополнительным гидроксилированием боковой цепи. Концентрация **M3.1** и **M3.2** весьма низка, и (кроме метода ЖХ-МС/МС) их наблюдали методом ГХ-МС только в ВЭЖХ фракции (Рисунки 4.105 и 4.107). Подобно моногидроксилированным метаболитам **M1.2** и **M1.3**, их ЭИ спектры имеют пики ионов, m/z 204 и 231. Подобно же метаболиту **M1.2**, в спектре **M3.2** присутствует интенсивный пик иона-радикала, m/z 361. Оба метаболита не метилируются, и перечисленные признаки свидетельствуют о расположении обеих гидроксильных групп на боковой цепи, причем одна из них находится на концевом (ω) углеродном атоме цепи.

Рис. 4.106. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Метаболиты АМ-694, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим III).



Дефторированный карбоксилированный метаболит **M4.1** (M.w. = 447). Хроматографические пики **M4.1** достаточно интенсивны для того, чтобы его наблюдение было возможно в образцах мочи без обогащения методом ГХ-МС, Рисунок 4.106. ЭИ спектр **M4.1** имеет пики ионов, свидетельствующие о неизменности ароматической части (m/z 144, 203, 204, 231, 360). Ион, m/z 316, указывает на наличие гидроксильной и карбонильной групп (и на отсутствие атома фтора) на пентилиндольном остатке. При метилировании последний ион заменяется на m/z 258.

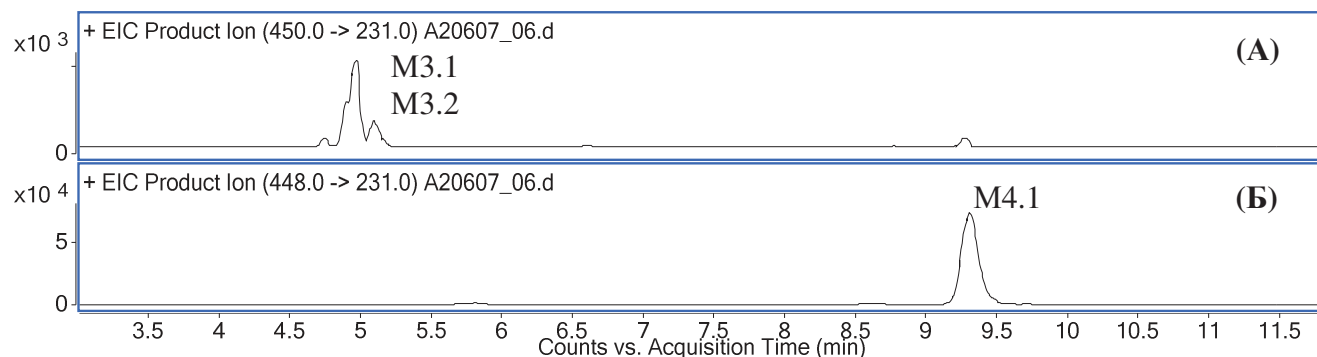


Рис. 4.107. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, кислотный гидролиз. Дефторированные дигидроксилированные метаболиты АМ-694 с расположением гидроксильных групп на боковой цепи (А). Дефторированный карбоксилированный метаболит (Б).

Полуколичественные измерения. Диаграммы экскреции метаболитов АМ-694 приведены на Рисунке 4.111. Важной особенностью обеих диаграмм является несколько замедленная экскреция карбоксилированного метаболита **M4.1** по сравнению с гидроксильрованным **M2.1**. При оральном употреблении максимальная концентрация **M2.1** достигается через 4 ч., затем она быстро снижается; и после 45-48 ч. обнаружить метаболит

M2.1 становится невозможным. С другой стороны, концентрация **M4.1** была максимальной после 17-24 ч. после приема, и наблюдалась вплоть до 117 ч. Зависимость, полученная для другого случая и при курении весьма подобна первой: в то время как максимальная концентрация **M2.1** получена через 2 ч. после приема, наибольшую концентрацию **M4.1** наблюдали только через 27 ч. В этом случае присутствие обоих метаболитов наблюдали до 114 ч. после приема. Можно предположить, что некоторая доля метаболита **M2.1** – тем или иным способом - депонируется в организме, и экскретируется лишь после дополнительного окисления до **M4.1**. Подобное поведение метаболитов (моно- и дигидроксилированных форм) наблюдали в случае JWH-250 (см. выше).

Диаграммы экскреции были получены посредством анализа образцов мочи после кислотного деконъюгирования, TMS, и с использованием внутреннего стандарта папаверина с помощью метода, описанного выше. Количественной характеристикой послужили площади ион-хроматограмм для m/z , соответствующих молекулярным ионам (ГХ-МС, режим SIM).

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [328, 332].

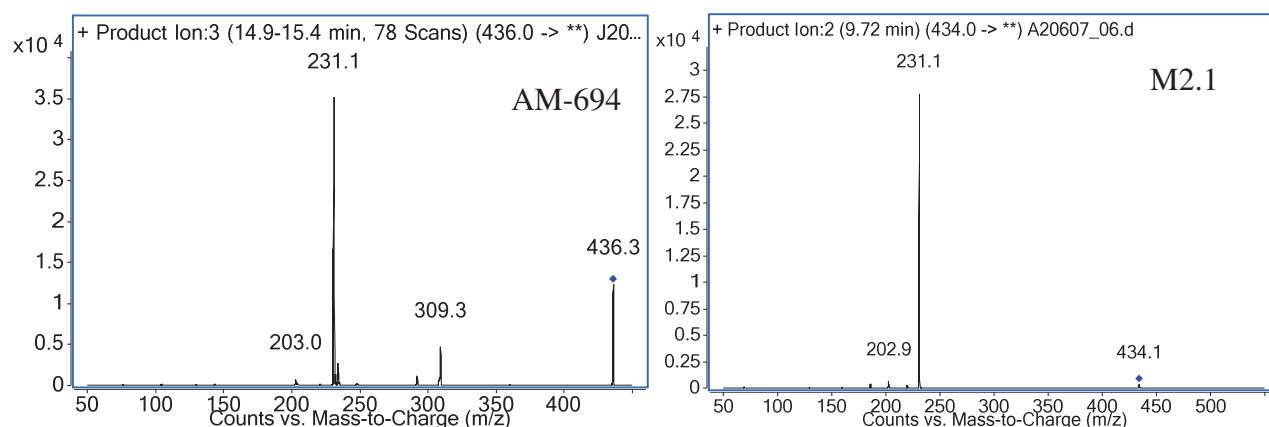


Рис. 4.108 Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) AM-694 и метаболита **M2.1**.

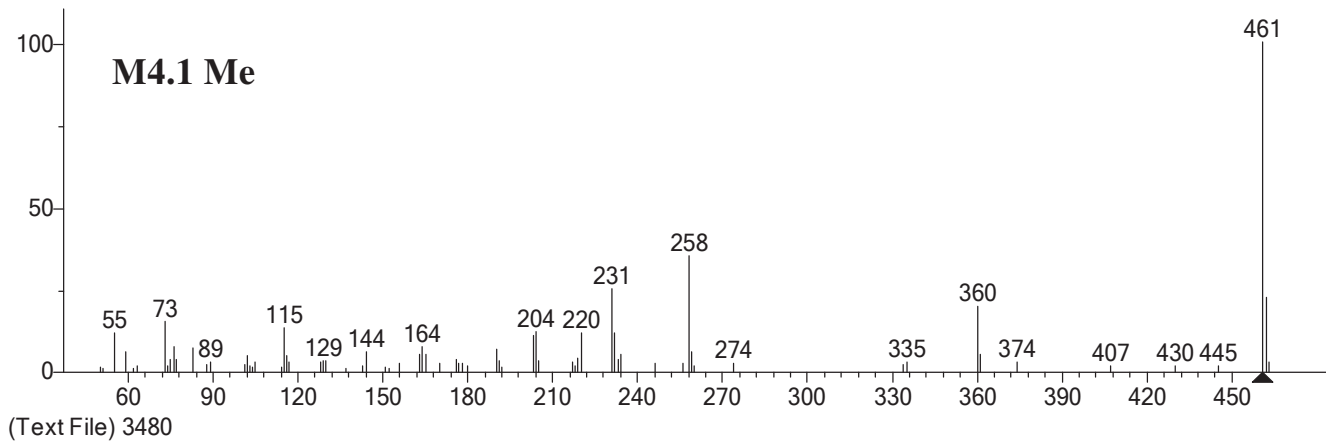
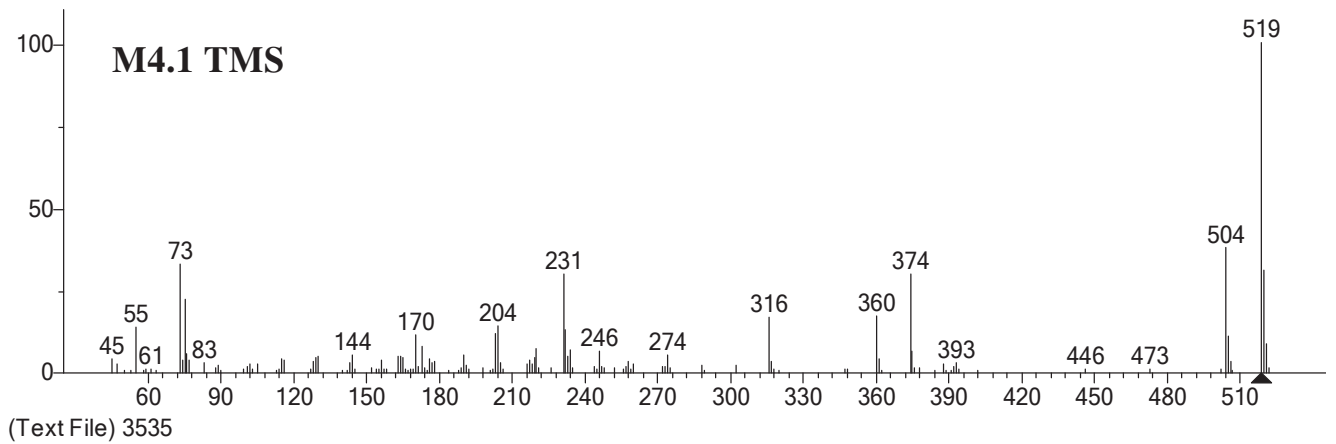
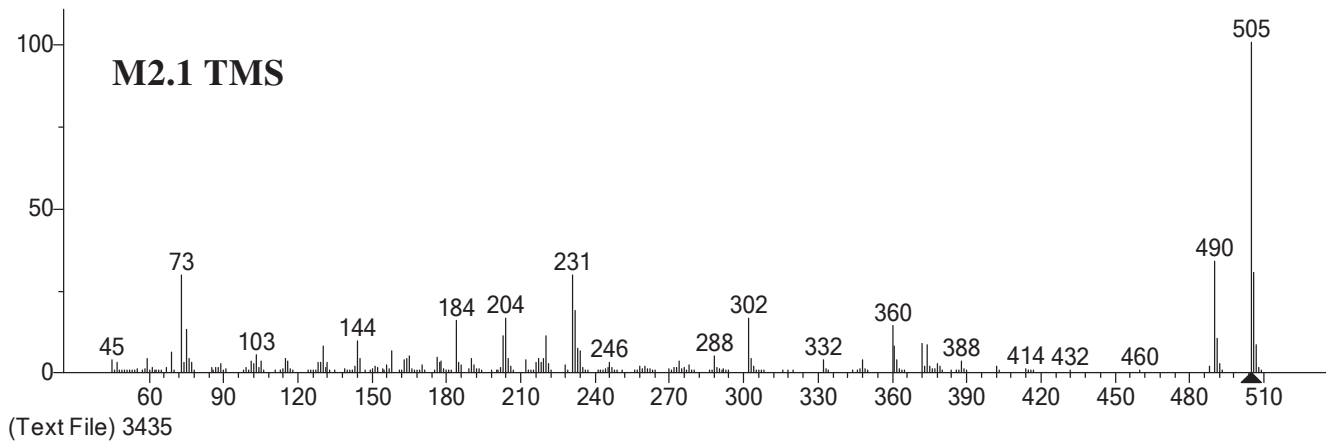
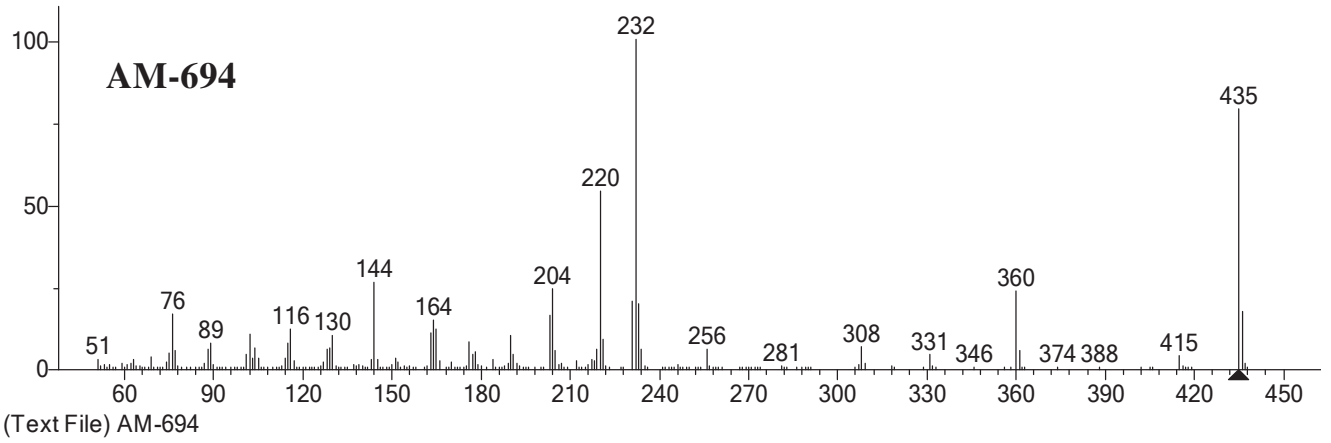


Рис. 4.109. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) AM-694 и его метаболитов.

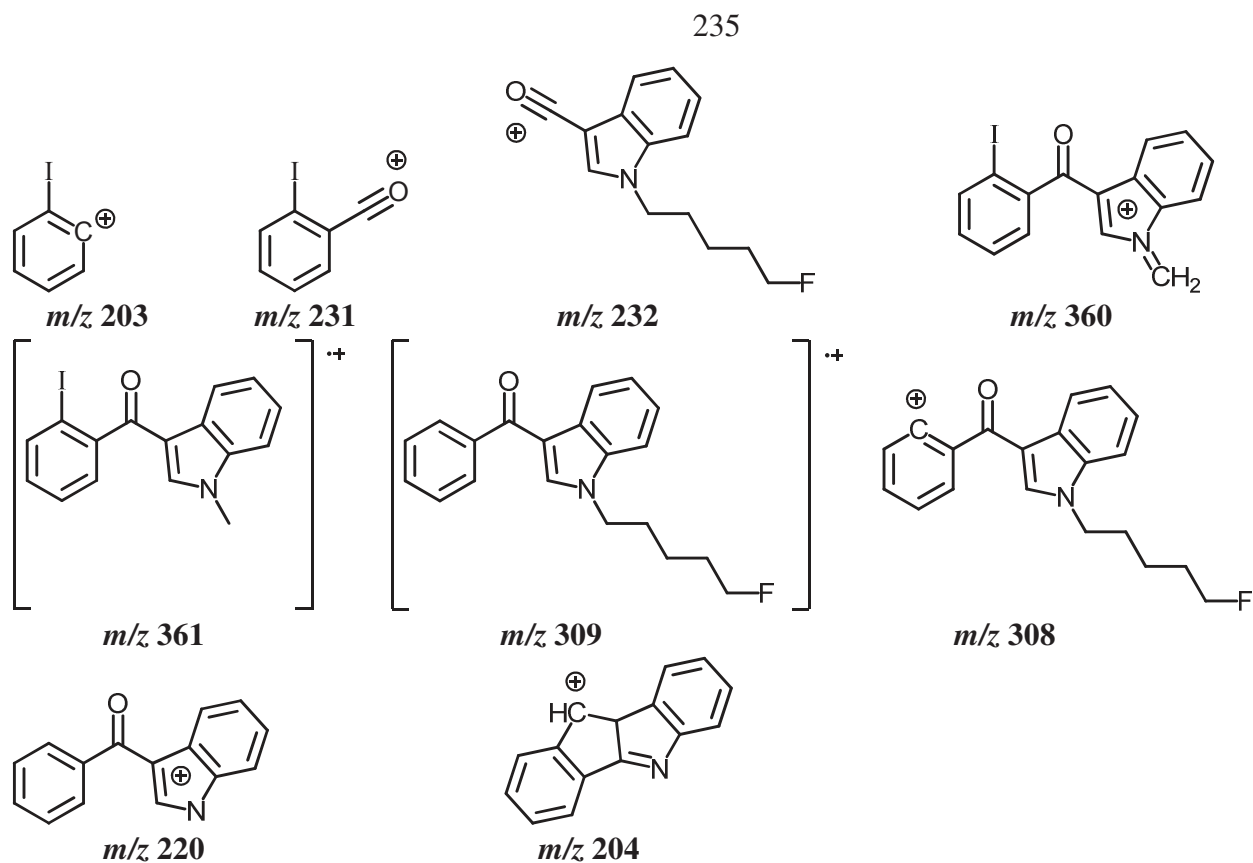


Рис. 4.110. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов АМ-694.

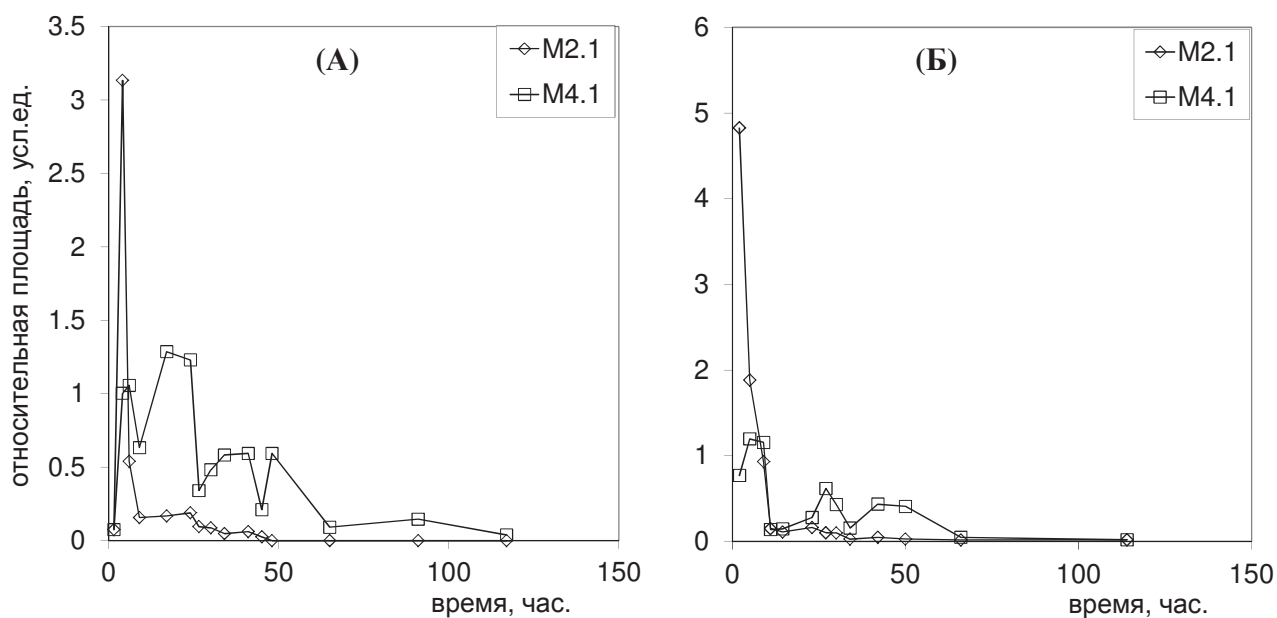


Рис. 4.111. Экскреция метаболитов АМ-694 с мочой, случаи С2 II (А), и С3 (Б), принимавших каннабимиметик пероральным и ингаляционным способами, соответственно.

4.11. Выявление метаболитов AM-2233

AM-2233 (Рисунок 4.112) распространялся в России и ряде других стран вместе с другими бензоиндольными каннабимиметиками после введения последовательных ограничений на оборот нафтоиндольных и фенилацетилиндольных производных [219]. Согласно нашим наблюдениям, AM-2233 пользовался средней популярностью среди потребителей психоактивных курительных смесей. Подобно рассмотренному выше AM-694, AM-2233 также синтезирован Makryannis et al, а его аффинность к рецептору CB1 весьма высока ($K_i=1.8$ нМ).

Представленные в данном подразделе результаты являются частью общей работы с AM-2233, и выбраны по критерию практической значимости для обнаружения его метаболитов.

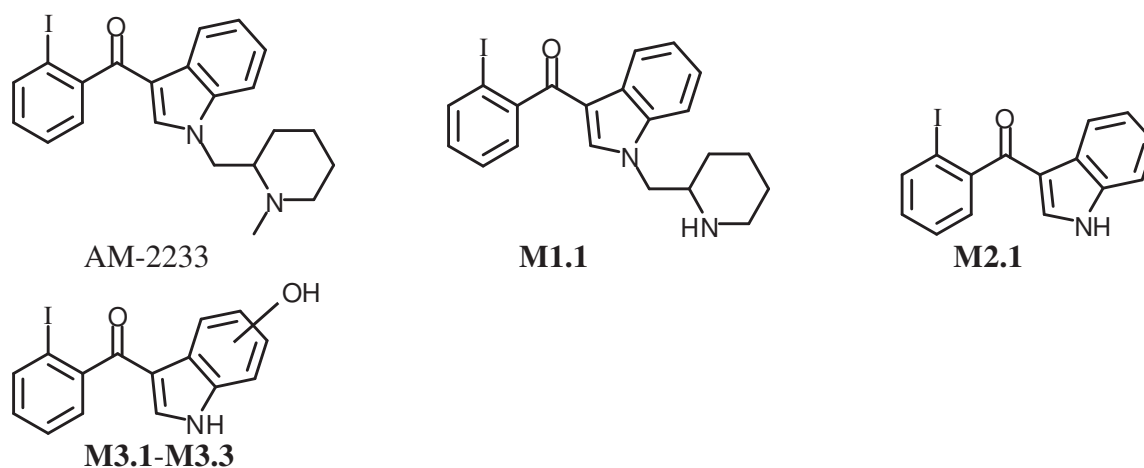


Рис. 4.112. Структуры AM-2233 и его метаболитов.

Для выявления метаболитов AM-2233 и определения их структурных характеристик использовали только образцы мочи, собранные у пациентов наркологических диспансеров (всего 16). Эти образцы сортировали так же, как и для случая JWH-018.

Наличие третичного алифатического азота в структуре AM-2233 представляет собой интересную особенность, отличающую это соединение от остальных каннабимиметиков, рассмотренных в нашей работе. Повышенная гидрофильность структуры AM-2233 выражалась в наличии исходного соединения во всех исследованных образцах мочи курильщиков.

Подготовка проб и условия анализа. Образцы мочи деконъюгировали кислотным и ферментативным способами. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 20 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 90 % фазы Б (20 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных,

ацетилированных, и метилированных образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS и метилированных образцов. Для подтверждения положения гидроксильных групп гидролизованные образцы мочи дериватизировали последовательно метилированием и триметилсилилированием. Кроме AM-2233, охарактеризовали 5 соединений, присутствовавших в моче (Рисунок 4.112). Индексы удерживания приведены в Таблице 4.19. Все метаболиты, рассмотренные в данном подразделе, обнаруживали независимо от способа деконъюгирования.

Таблица 4.19. Индексы удерживания AM-2233 и его метаболитов для слабополярной фазы в двух температурных режимах.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	VF-5ms	
				Реж. III	Реж. I
1	AM-2233	C ₂₂ H ₂₃ IN ₂ O	458	3544	3492
2	M1.1	C ₂₁ H ₂₁ IN ₂ O	444	3534	3480
3	M1.1 AC	C ₂₃ H ₂₃ IN ₂ O ₂	486	3920	3860
4	M2.1 TMS	C ₁₈ H ₁₈ INOSi	419	2885	2853
5	M3.1 TMS	C ₂₁ H ₂₆ INO ₂ Si ₂	507	3105	3078

Выявление метаболитов и определение их структурных характеристик.

МС фрагментация исходного AM-2233 (M.w. = 458). Два наиболее интенсивных пика в ЭР спектре AM-2233 соответствуют ионам метилпиперидиния (m/z 98) и метилпиперилинилметилия (m/z 112), Рисунок 4.116. Остальные ионы (m/z 231 и протонированный m/z 362) имеют то же происхождение, что и в случае AM-694. ЭИ спектр AM-2233 типичен для соединений, имеющих атом азота в алифатическом остатке; наиболее интенсивный пик (m/z 98) так же соответствует иону метилпиперидиния, Рисунки 4.117 и 4.118. Присутствие неизмененного AM-2233 в моче человека иллюстрировано на хроматограммах, Рисунки 4.113 и 4.114.

N-Дезметилированный метаболит M1.1 (M.w. = 444). Дезметилированный метаболит характеризуется наибольшей концентрацией в общем метаболическом профиле; этот вывод сделан по результатам ВЭЖХ-ДМД анализа мочевых образцов при допущении небольших различий в молярных коэффициентах экстинкции. Ионы, m/z 348 и 362, пики которых присутствуют в его ЭР спектре, образуются при элиминировании метилпиперидинилметильного остатка, а ион, m/z 328 – при дополнительной циклизации арильной части, Рисунок 4.118. Наиболее интенсивный пик ЭИ спектра **M1.1** соответствует иону тетрагидропиперидиния. При метилировании **M1.1** получали AM-2233.

В применяемых условиях **M1.1** не образует TMS дериватов, но практически нацело ацетируется. AC дериват **M1.1** обладает значительным удерживанием, что (учитывая снижение эффективной чувствительности) делает его обнаружение нецелесообразным.

N-Деалкилированный метаболит **M2.1** (M.w. = 347). Присутствие этого метаболита в мочевых образцах, собранных у людей, необычно; подобные формы (и в относительно малых концентрациях) были найдены только в моче крыс в случаях нафтоиндолов и фенилацетилиндолов. Ионы, m/z 144, 203 и 221 указывают на наличие неизмененных индольного и иодофенильного остатков, а ион, m/z 220, по-видимому, образуется при элиминировании иода, сопровождаемом циклизацией. В ЭИ спектре **M2.1** (TMS) присутствует пики иона, m/z 216, указывающий на наличие неизмененного индольного остатка и иона, m/z 292, образующегося при элиминировании иода.

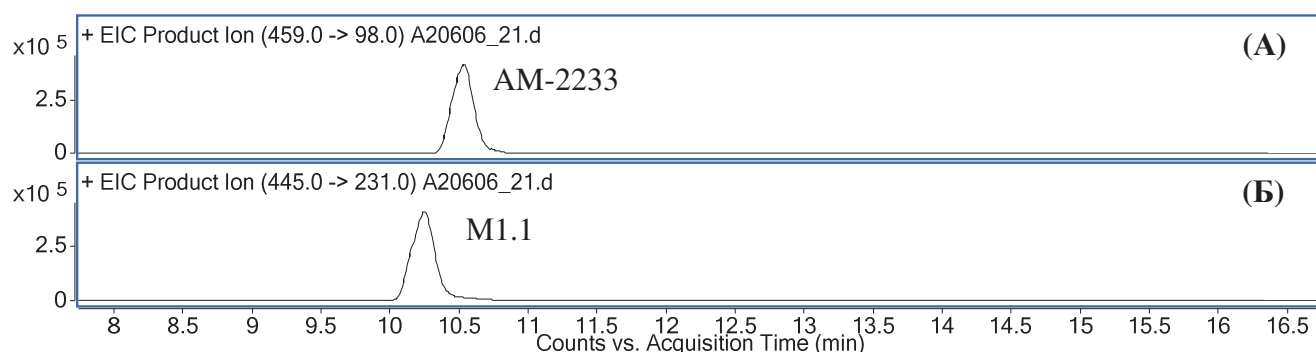


Рис. 4.113. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Неизмененный **AM-2233** (А) и его деметилированный метаболит (Б).

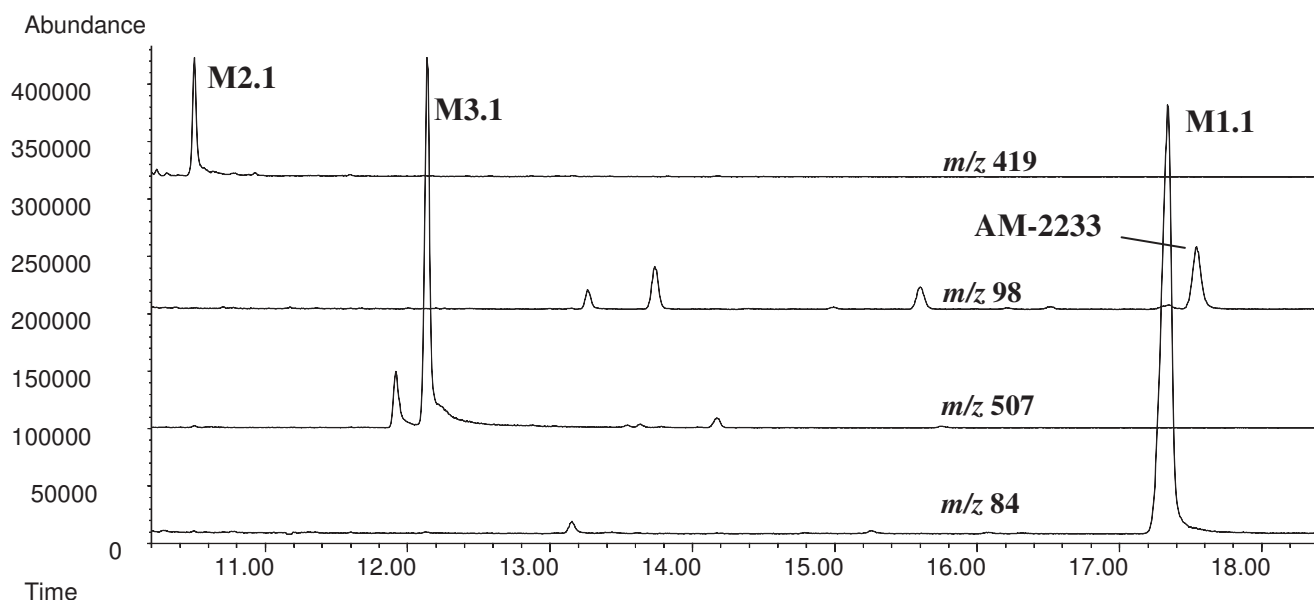


Рис. 4.114. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. **AM-2233** и его метаболиты, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим I).

N-Деалкилированные моногидроксилированные метаболиты **M3.1-M3.3** (M.w. = 363). Из трех метаболитов этой группы только один (**M3.1**) наблюдали методом ГХ-МС;

относительные концентрации **M3.2** и **M3.1** были невелики (Рисунок 4.115). Гидроксильные группы в структурах всех трех метаболитов расположены на индольных остатках; метаболиты, гидроксильрованные по иодофенильному остатку, не выявили. ЭР спектры **M3.1-M3.1** подобны: ион, m/z 231 указывает на наличие неизмененного иодофенильного, а m/z 160 – гидроксильрованного индольного остатков. В ЭИ спектре **M3.1** (TMS) кроме пиков ионов, m/z 203 и 231, присутствуют пики, m/z 304, указывающие на гидроксильрование индольного остатка (см. выше) и пик иона, m/z 380 (элиминирование иода).

Доклады, сделанные по теме подраздела: [328, 333].

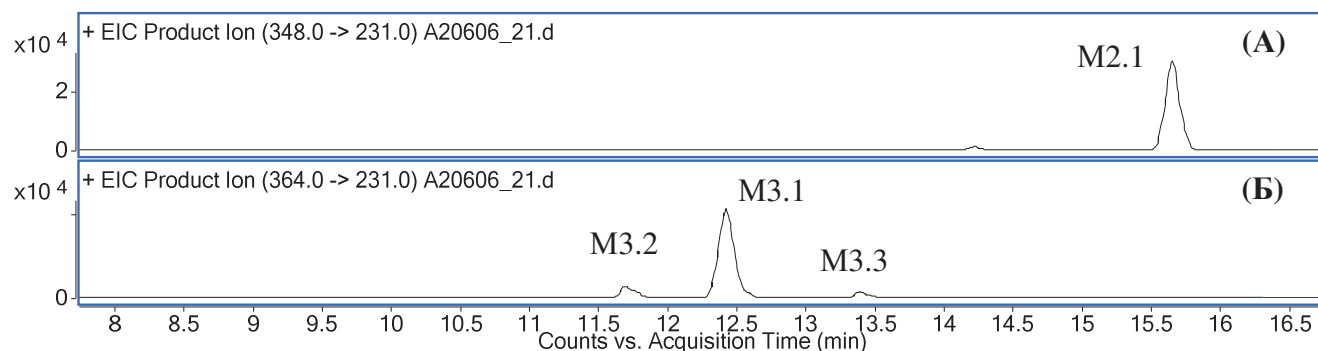


Рис. 4.115. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. N-дезалкилированный метаболит (А) и его моногидроксильрованные производные (Б).

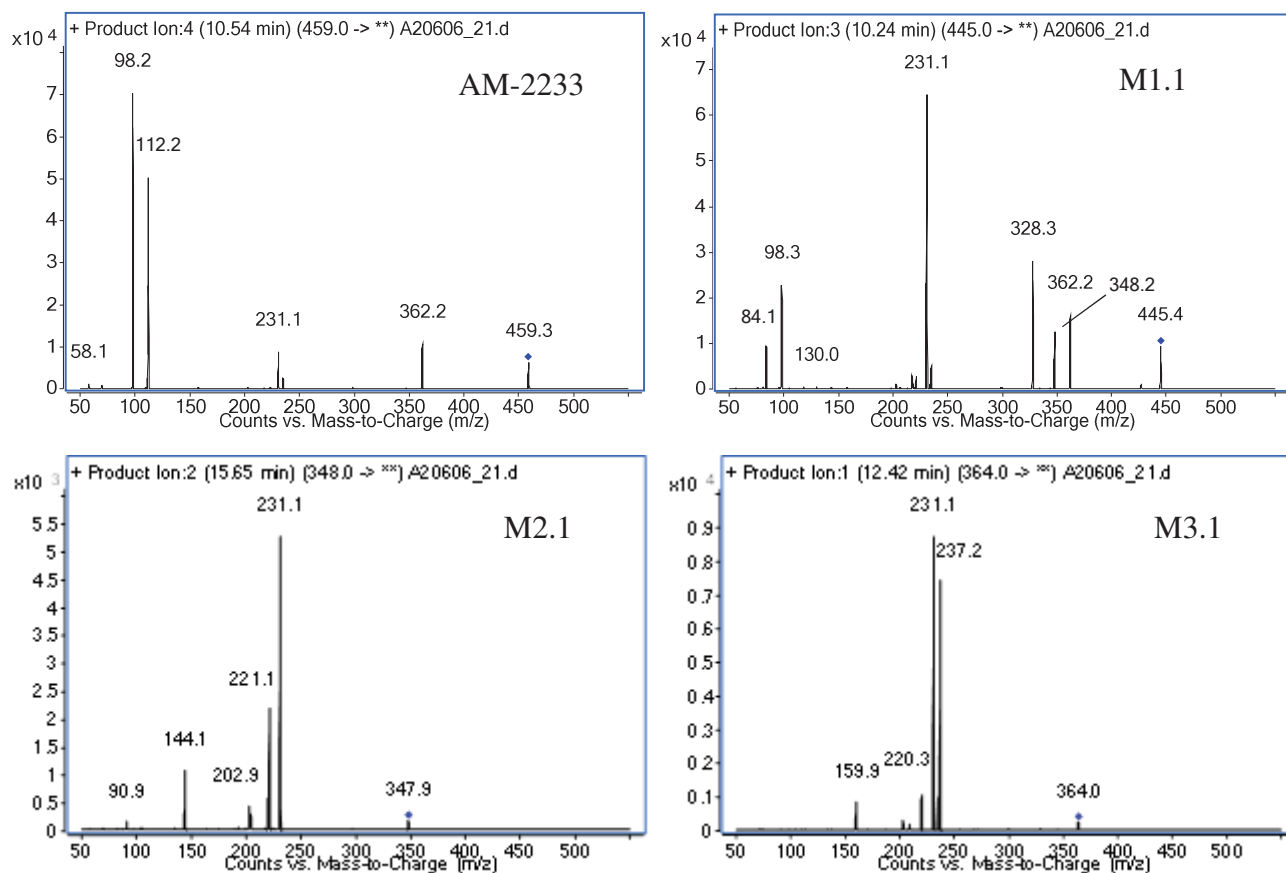


Рис. 4.116. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) AM-2233 и его метаболитов.

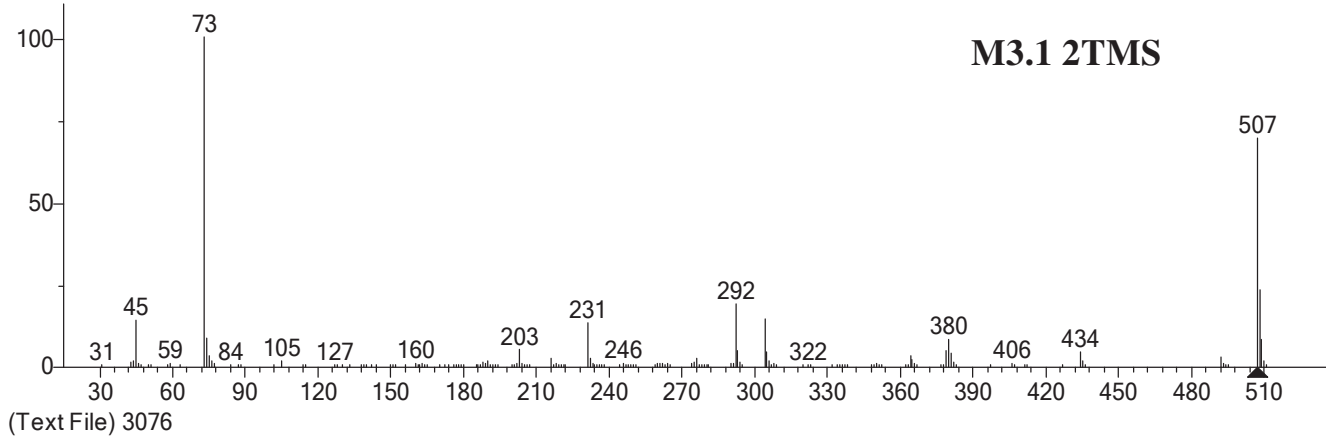
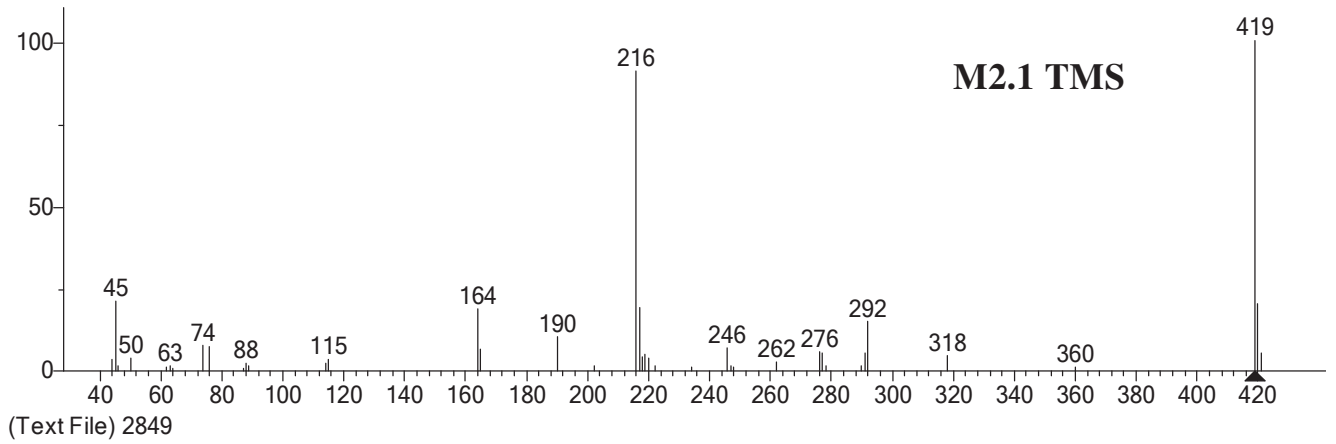
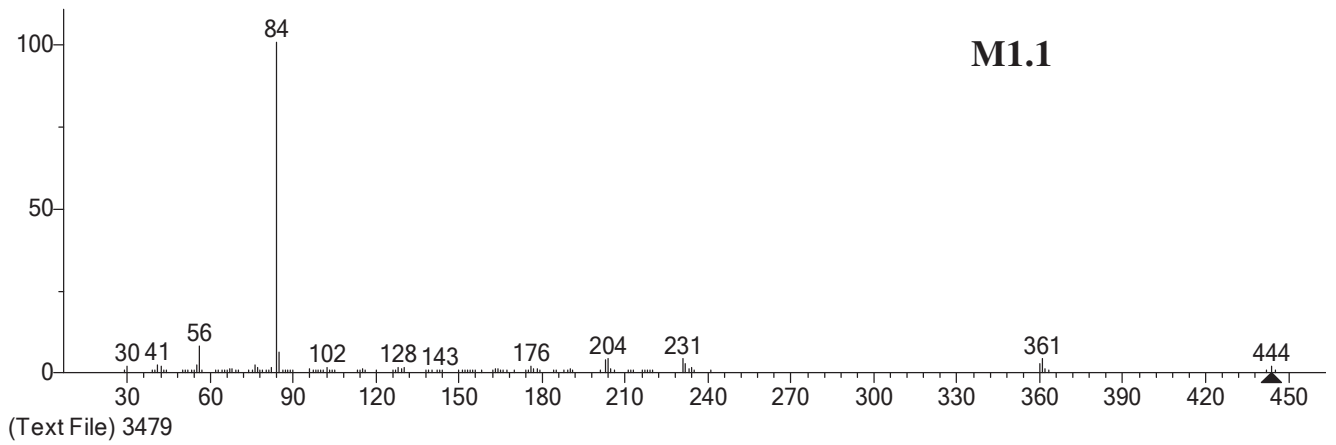
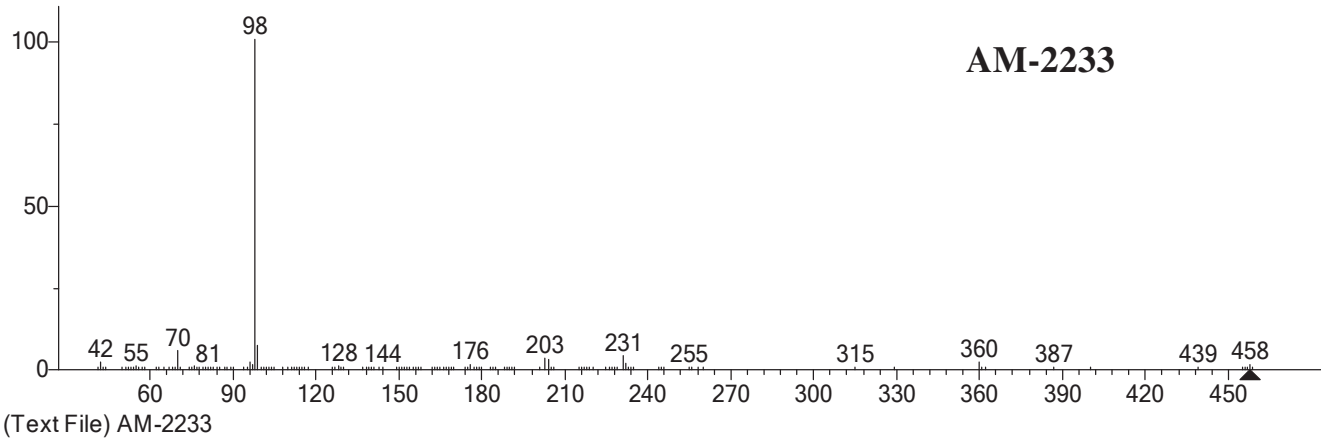


Рис. 4.117. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) AM-2233 и его метаболитов.

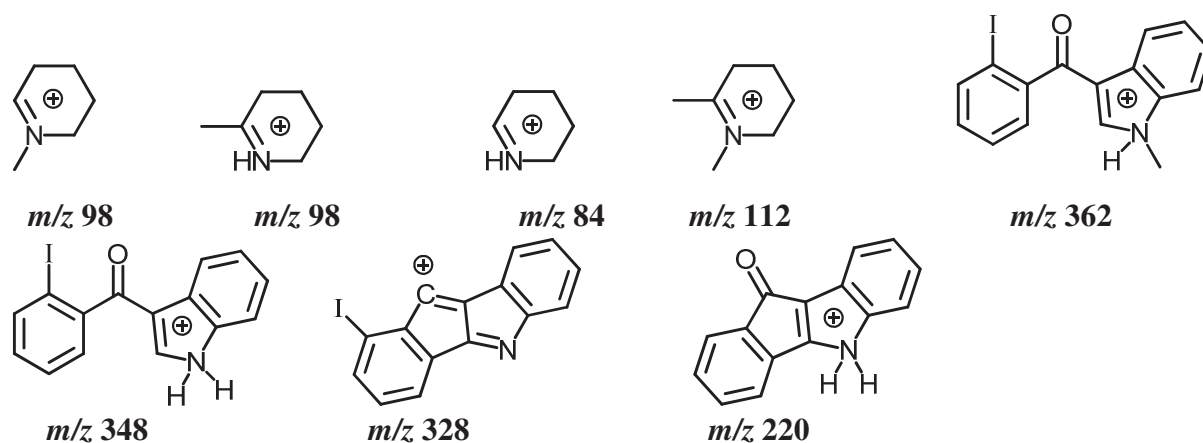


Рис. 4.118. Предполагаемая фрагментация и величины m/z (ЭИ и ЭР) метаболитов АМ-2233.

Таблица 4.20. Аналитические условия для обнаружения метаболитов синтетических каннабимиметиков нафтоиндольной, фененилацетилиндольной и бензоиндольной групп.

Каннабимиметик	Метод деконъюг.	Метод анализа (режим)	Дериватизация		Детектируемые соединения	
			Предпочтительная	Возможная	Основные	Дополнительные
JWH-018	Ф, К	ГХ-МС (I, III)	TMS	АС	M1.1,	M1.2
JWH-018	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.1	M3.1, M1.2
JWH-073	Ф	ГХ-МС (I, III)	TMS	-	M1.1	M1.2
JWH-073	К	ГХ-МС (III)	TMS	-	M1.1	M/A2, M/A6
JWH-073	Ф	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.1	M1.2
JWH-210	Ф, К	ГХ-МС (III)	TMS	-	M2.1	M3.1
JWH-210	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M2.1	M2.2, M4.1
JWH-250	Ф, К	ГХ-МС (I, II)	TMS	АС	M1.1	M2.1
JWH-250	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.1	M1.2, M1.3
JWH-203	Ф, К	ГХ-МС (I, II)	TMS	АС	M1.1	M1.2, M2.1
JWH-203	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.1, M1.2	M4.1, M4.3
JWH-251	Ф, К	ГХ-МС (I, II)	TMS	АС	M1.1	M1.2
JWH-251	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.1, M1.2	M4.1
RCS-4	Ф, К	ГХ-МС (I, III)	TMS	АС	M5.1	M6.1
RCS-4	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M6.1	M5.1, M4.1
AM-694	Ф, К	ГХ-МС (III)	TMS	-	M2.1	M4.1
AM-694	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M2.1	M4.1
AM-2233	Ф, К	ГХ-МС (I, III)	TMS	-	M1.1	M3.1, AM-2233
AM-2233	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.1	M3.1, AM-2233

Примечание. Ф, К – ферментативный и кислотный методы деконъюгирования

4.12. Краткие методические замечания по главе

В Таблице 4.20 приведены общие аналитические условия для обнаружения метаболитов синтетических каннабимиметиков, рассмотренных в данной Главе. Для метода ГХ-МС указаны режимы элюирования при использовании слабополярных фаз и рекомендуемые способы

дериватизации. Частные условия проведения каждой стадии анализа указаны в соответствующих подразделах и Приложении 1. Пробоподготовка включает ЖЖЭ основных растворов; описание метода ТФЭ для обнаружения метаболитов JWH-018 и JWH-250 приведено в тексте.

Заключение

Все соединения, рассмотренные в данной главе (кроме AM-2233), не были обнаружены в моче в исходном состоянии из-за полного метаболизма. Единственным пунктом, объединяющим все девять синтетических каннабимиметиков, следует считать способ подготовки проб. Он должен включать:

- стадию деконъюгирования (гидролиза), причем допустим кислотный метод, хотя предпочтительно ферментативное деконъюгирование;
- экстракцию метаболитов из гидролизатов после подстраивания их pH до 9-10;
- анализ методами ЖХ-МС/МС или – после дериватизации - ГХ-МС, причем предпочтительно триметилсилилирование.

Основными мочевыми метаболитами для двух нафтоиндольных (JWH-018 и JWH-073) и всех трех фенилацетилиндольных каннабимиметиков являются моногидроксилированные формы, причем гидроксильная группа у соединений, характеризующихся наиболее интенсивными сигналами, расположена на боковой N-алкильной цепи. Эти метаболиты наиболее удобны для обнаружения их в моче и (по крайней мере, для JWH-018 и JWH-250), в сыворотке крови методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Для второго метода (при подтверждении) также удобно обнаружение карбоксилированных метаболитов. Возможными биомаркерами третьего (наиболее гидрофобного) нафтоиндола в мочевых образцах следует считать ди- и тригидроксилированные метаболиты. Судя по мочевым метаболическим профилям, наиболее вероятным путем метаболизма нафтоиндолов и фенилацетилиндолов у человека является гидроксилирование боковых алкильных цепей, а не ароматических остатков. Для метаболизма этих же соединений в организме крыс более вероятно N-деалкилирование, совмещенное с гидроксилированием.

Благодаря *p*-ориентации метоксигруппы к N-пентилоксометилиндольному остатку у RCS-4 (в отличие от *o*-ориентации у JWH-250), его основными мочевыми метаболитами являются O-дезметилированные формы. Метаболиты RCS-4, у которых O-дезметилирование совмещено с окислением боковой N-пентильной цепи (гидроксилированием или образованием карбонильной группы), наиболее удобны для обнаружения как методом ГХ-МС, так и ЖХ-МС/МС.

Для AM-2233, который благодаря значительной гидрофильности своей структуры присутствует в моче в неизменном состоянии, рекомендуется обнаружение N-дезметилированного метаболита (пики которого наиболее интенсивны) наряду с моногидроксилированными структурами. Подобно остальным синтетическим каннабимиметикам, рассмотренным в этой главе, гидроксильные группы у этих структур локализованы преимущественно на алкильных фрагментах (в данном случае, на пиперидиновом цикле).

При появлении на метильном конце боковой N-алкильной цепи атома фтора (AM-694), метаболический профиль резко меняется: основным метаболическим путем оказывается окислительное дефторирование, а гидроксילирование фторированной алкильной цепи маловероятно. В данном случае, наиболее удобным для обнаружения (ГХ-МС или ЖХ-МС/МС) найден карбоксилированный метаболит.

Глава 5. Выявление метаболитов алканойльных и индазольных каннабимиметиков в моче человека. Циклогексилфенольный каннабимиметик CP47, 497 (C8)

5.1. Идентификация производных UR-144

Каннабимиметик UR-144 (1-пентил-1*H*-индол-3-ил)(2,2,3,3-тетраметилциклопропил)метанон, структура которого содержит тетраметилциклопропановый остаток, был синтезирован в Abbot Laboratories (США) [334] 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, Рисунок 5.1) обладает высокой аффинностью к рецептору CB2 ($K_i=1.8$ нМ) и малой - к рецептору CB1 ($K_i=150$ нМ) [334]. Согласно этим значениям, UR-144 не должен формировать значительные психотропные эффекты [335]. 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. Об обнаружении UR-144 в продуктах рынка психотропных веществ сообщали сотрудники UNODC [336] в 2012, и эта информация была вскоре подтверждена [223, 229, 236]. 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. Сам циклопропан изомеризуется в пропилен с заметной скоростью при температурах выше 420°C [337], при более высоких температурах образуются и другие продукты [338, 339]. В целом, как замещенные, так и незамещенные циклопропаны образуют ряд продуктов раскрытия цикла при нагревании [340]. Было найдено, что пиролиз 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 [341]. Следовательно, для поиска биомаркеров UR-144 необходимо оценить компонентный состав смеси, попадающей в организм человека при его ингаляции UR-144. Работы с UR-144 проводились совместно с ирландскими исследователями.

Для проведения исследований девять продуктов, содержащих UR-144, были приобретены у анонимных распространителей через Интернет: шесть растительных (№ 1-6), один резиноподобный (№ 7) и два светло-желтых кристаллических порошка (№№ 8, 9), см. далее.

Экстракция компонентов из образцов и выделение UR-144 и компонента II. Все растительные и резиноподобный образцы (100 мг) экстрагировали этанолом (2 мл) при обработке ультразвуком в течение 10 мин. Экстракты фильтровали через 0.45 мкм фильтр

(Millipore, USA). Порошкообразные образцы (10 мг) растворяли в этаноле (2 мл). Полученные растворы анализировали методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС.

Компонент **II.1** выделяли методом полупрепаративной ВЭЖХ-ДМД с предварительной очисткой с помощью ТФЭ по следующей методике. Часть образца № 3 (около 400 мг) экстрагировали этанолом трижды (по 5 мл), и объединенные экстракты упаривали досуха в потоке азота при температуре не выше 45°C. Сухой остаток растворяли в ацетонитриле (1 мл) и добавляли воду (4 мл). Полученный раствор загружали на промытый (ацетонитрил, 6 мл) и кондиционированный (ацетонитрил-вода, 1:4 об., 6 мл) патрон AccuBond SPE ODS-C18. Сорбент промывали кондиционирующим раствором (6 мл), сушили в потоке воздуха (30 сек) и элюировали ацетонитрилом (3 мл). Элюат упаривали досуха в потоке азота и сухой остаток растворяли в ацетонитриле (200 мкл). Полученную смесь разделяли методом ВЭЖХ при изократическом элюировании смесью ацетонитрил-ацетатный буфер (20 мМ, *pH* 5), 4:1 об. Фракции, соответствующие пику соединения **II.1**, Рисунок 5.1, упаривали до 1/4 изначального объема в потоке азота и экстрагировали этилацетатом (1 мл). Отделенную органическую фазу упаривали досуха, полученный остаток (14 мг) анализировали методом ЯМР ¹H и ¹³C. UR-144 выделяли из порошка № 8 подобным способом.

Пиролиз UR-144 и сопутствующих соединений. Для моделирования процесса курения, два растительных образца (300 мг, №№ 3 и 4), содержащие значительные количества как самого UR-144, так и сопутствующих соединений, сжигали в кварцевых трубках (110 мм × 10 мм) в потоке воздуха (около 0.8 л/мин, что примерно соответствует потоку, формируемому при курении). Продукты собирали из потока слоем стеклянной ваты, находящейся в холодном конце трубок. После сгорания растительной основы вату и стенки трубок смывали этанолом (5 мл) и этилацетатом (3 мл). Полученные растворы объединяли, упаривали досуха и анализировали сухие остатки методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС.

Разделение продуктов сжигания выполняли колоночной хроматографии с помощью колонки (90 мм × 20 мм) заполненной силикагелем (20 г, Хромресурс, РФ). Смесью элюировали последовательными порциями (15 мл) раствора этилацетата в гексане (0, 10, 15 и 20% об.). Фракции (5 мл) собирали, анализировали методом ГХ-МС и те из них, которые содержали наибольшие количества соединения **III** (основного продукта пиролиза UR-144) объединяли и упаривали досуха в токе азота. Соединение **III**, содержащееся в сухом остатке, дополнительно очищали методом ВЭЖХ согласно способу, описанному выше, и анализировали методом ЯМР. Всю процедуру повторяли; для образцов №№ 3 и 4 получали 12 и 13 мг очищенного соединения **III**, соответственно.

Для подтверждения получаемых результатов также сжигали отрезки обеззоленной фильтровальной бумаги, пропитанные растворами очищенных UR-144 и **II.1** в этилацетате и предварительно высушенными.

Синтез компонента II.1. Часть образца № 8 (32 мг, кристаллический порошок) растворяли в этаноле (10 мл), добавляли воду (10 мл) и соляную кислоту (2 мл, около 35 % масс.). После добавления воды, часть UR-144 образовала медленно оседающий осадок. Смесь нагревали на водяной бане в течение 1 ч; при этом осадок UR-144 полностью растворился. После охлаждения, полученный прозрачный раствор слабо-розового цвета и не содержащий осадка нейтрализовали водным раствором аммиака, что сопровождалось выпадением тонкого белого осадка. Смесь оставляли на ночь при комнатной температуре, затем экстрагировали этилацетатом дважды (20 мл) и объединенные экстракты упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток разделяли колоночной ЖХ подобно описанному выше. Целевые фракции упаривали досуха, и полученный остаток (25 мг) анализировали методом ЯМР, а также использовали для УФ-спектроскопических измерений.

Общая схема всех обнаруженных трансформаций UR-144 изображена на Рисунке 5.1.

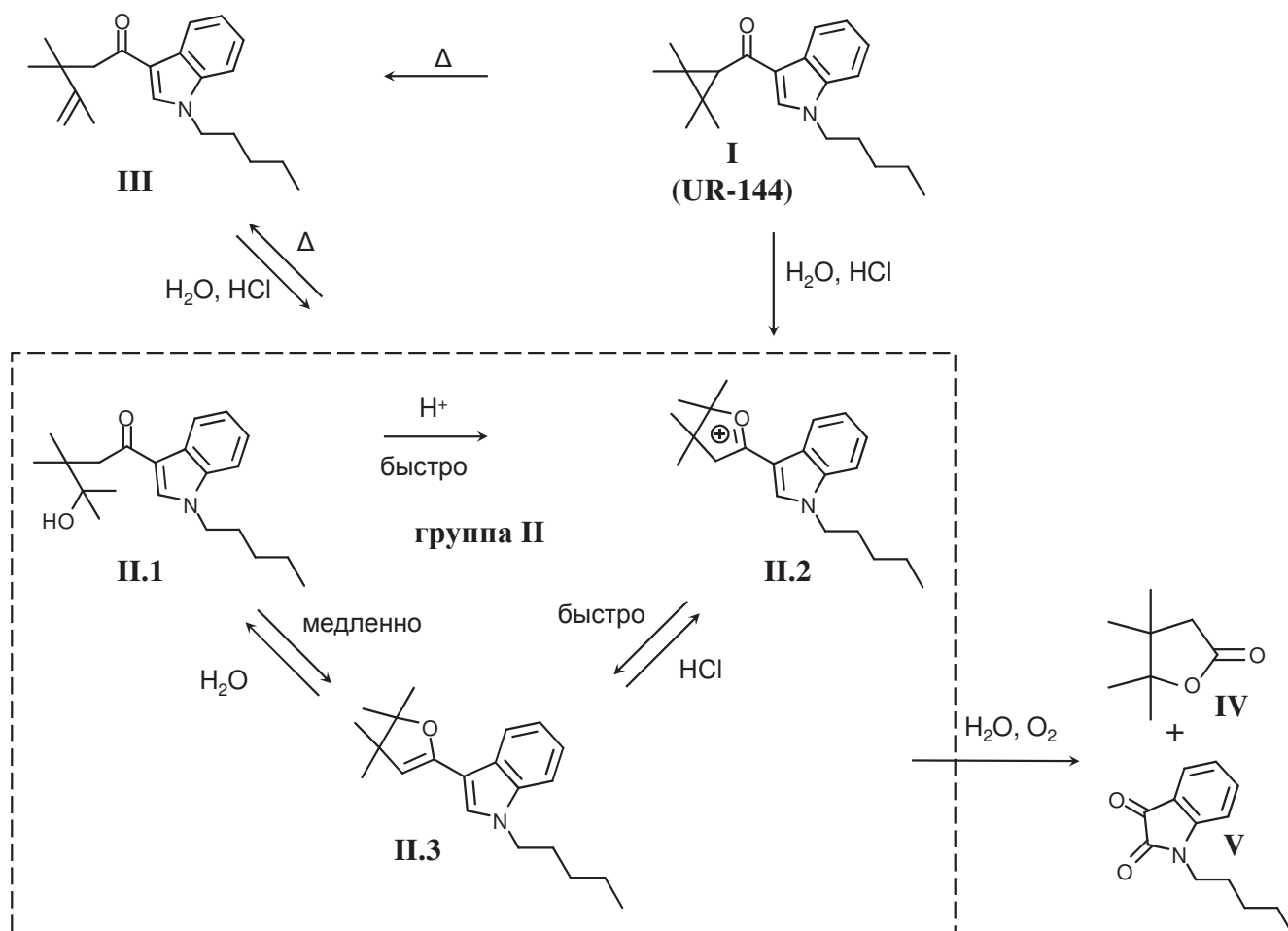


Рис. 5.1. Схема трансформаций UR-144.

Гидролиз UR-144. На Рисунке 5.2 приведены ГХ-МС и ЖХ-МС/МС хроматограммы двух растительных образцов (№№ 3 и 4), причем в смеси 4 преобладал сам UR-144, а в смеси 3 кроме небольшого количества UR-144 был обнаружен дополнительный компонент, пикам которого соответствуют соединения **II.3** и **II.1**. для ГХ-МС и ЖХ-МС/МС, соответственно. Соединение **II.1**, являющееся постоянным спутником UR-144 в его препаратах, было идентифицировано нами как продукт гидролиза тетраметилциклопропанового остатка UR-144 (кетол). Его УФ-спектр подобен UR-144 (Рисунок 5.3), равно как и другим фенилацетилиндольным каннабимиметикам, структуры которых содержат оксометилиндольный хромофор, не сопряженный с другими остатками (см. например, [202, 205, 208]).

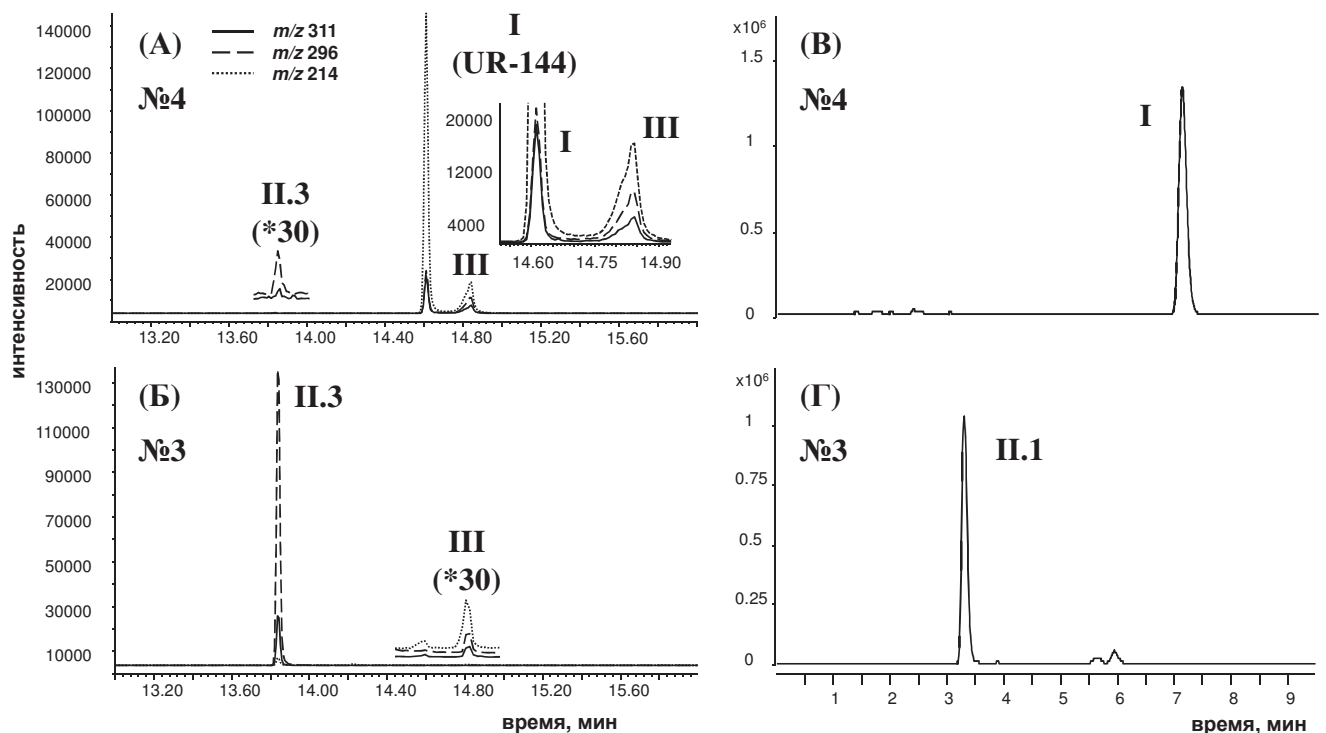


Рис. 5.2. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы экстрактов растительных образцов № 4 (А) и № 3 (Б). ЖХ-МС (ЭР, ЕИС) хроматограммы экстрактов № 4 (В) и № 3 (Г), m/z 312.

Масс-спектр (ЖХ-МС, ЭР) ионов-предшественников **II.1** свидетельствует об элиминировании воды от протонированной молекулы ($[M+H]^+$), в то время как соответствующий спектр UR-144 включает только пик протонированной молекулы. Кроме пиков изотопных ионов, оба спектра имеют пики катионизированных (Na^+) молекул и соответствующих кластерных (димерных) ионов.

ЖХ-МС/МС (ЭР) спектр ионов-продуктов UR-144 имеет интенсивный пик иона, m/z 125, соответствующий оксометилтетраметилциклопропановому остатку (малоинтенсивные пики

ионов с меньшими m/z образуются в результате его фрагментации) и менее интенсивный пик иона, m/z 214, характерный для N-пентилиндольных каннабимиметиков и образующийся при элиминировании тетраметилциклопропанового остатка. Спектр соединения **II.1** имеет интенсивный пик иона, m/z 214, образующийся, скорее всего, в результате дегидратации.

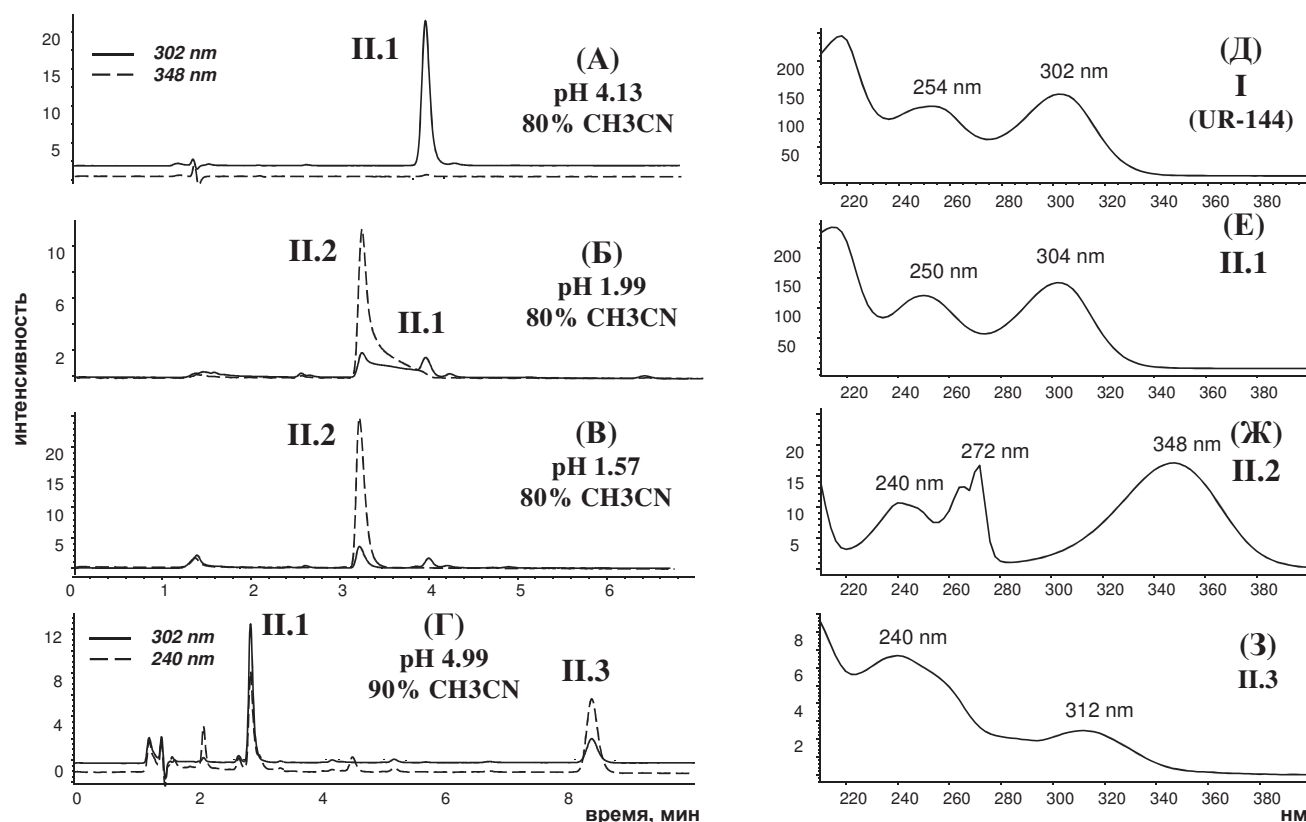


Рис. 5.3. ВЭЖХ-трансформация **II.1** → **II.2** (А-В) при снижении pH элюента и соединение **II.3** (Г). УФ-спектры UR-144 (Д), **II.1** (Е), **II.2** (Ж) и **II.3** (З). Водная часть ВЭЖХ элюентов: раствор формиата аммония (20 мМ, pH подстраивали муравьиной кислотой) (А) и (Г), ортофосфорная кислота (200 мМ, pH подстраивали раствором гидроксида натрия) (Б), ортофосфорная кислота (200 мМ) (В).

ГХ-МС (ЭИ) фрагментация UR-144 весьма подобна фенилацетилиндолам: в спектре присутствует интенсивный пик иона, m/z 214 и менее интенсивный, m/z 144 (Рисунок 5.9). Соединение **II.1** наблюдали методом ГХ-МС после триметилсилилирования; его фрагментация в основном, сводится к ступенчатому элиминированию алифатической части, образованной раскрытием тетраметилциклопропанового остатка.

Соединение **II.2** наблюдали только в кислых растворах, причем оно образовывалось из **II.1** при снижении pH элюента (Рисунок 5.3). Кроме того, методом УФ-спектроскопии установили, что трансформация **II.1** → **II.2** протекает почти мгновенно при подкислении (0.007-0.1 М HCl) растворов **II.1** в ацетонитриле или водно-ацетонитрильных смесях (до 50% воды

об.). Катионная природа **П.2** следует из характера УФ-спектра (Рисунок 5.3Ж), имеющего интенсивную полосу при 348 нм, а также из резкого снижения ЖХ удерживания [342]. Дополнительным свидетельством в пользу катионной природы **П.2** служит отсутствие катионизированных (Na^+) молекул и кластерных (димерных) ионов в ЭР спектре его ионов-предшественников (Рисунок 5.4В). Соединение **П.2** стабильно только в сильноокислых растворах.

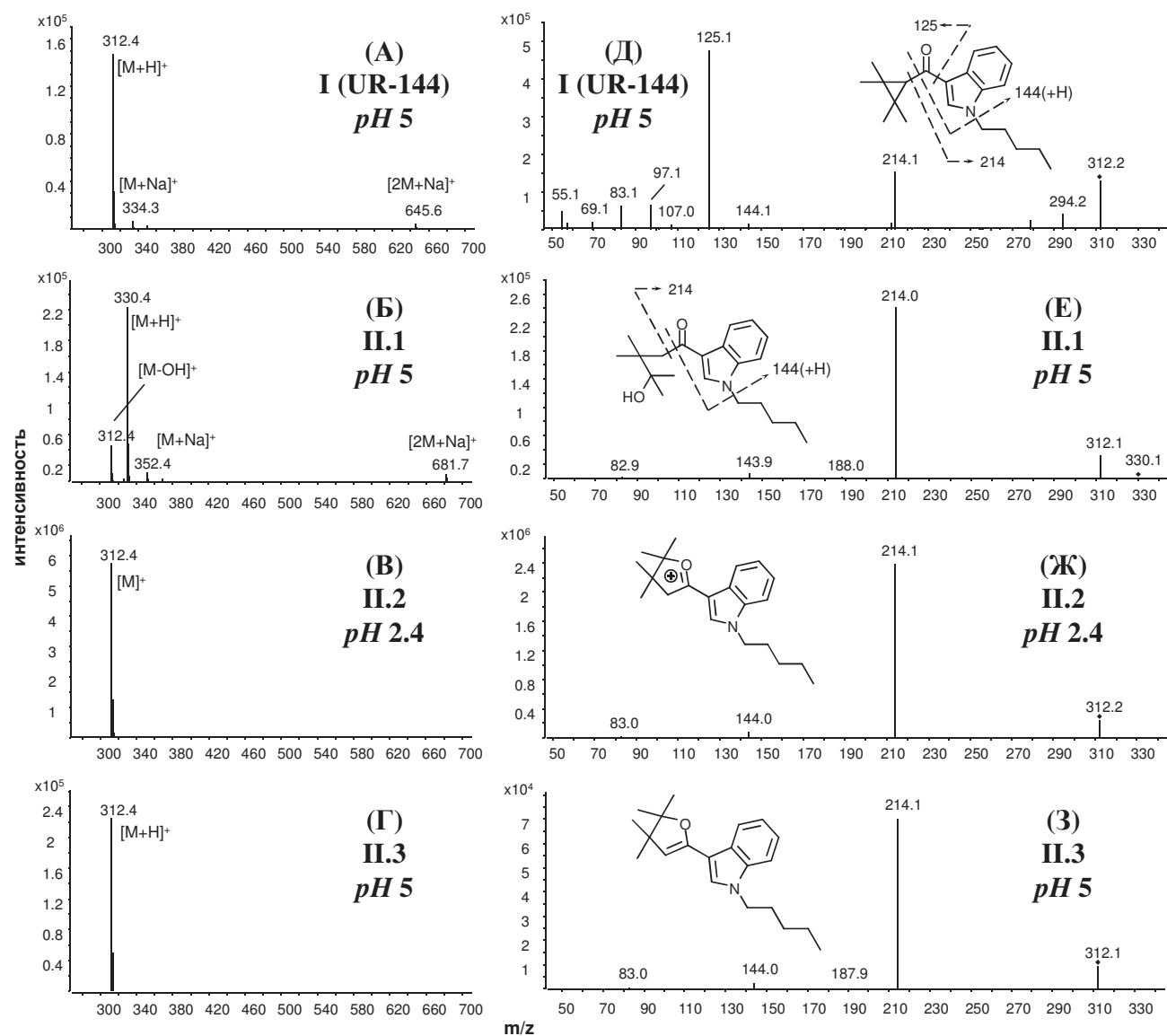


Рис. 5.4. ЖХ-МС (ЭР) спектры ионов-предшественников соединений **I**, **П.1**, **П.2** и **П.3** (А)-(Г). ЖХ-МС/МС (ЭР) спектры ионов-продуктов этих же соединений (Д)-(З). Элюенты: ацетонитрил-аммонийно-формиатный буфер (4:1 об.), состав водной части 20 мМ формиата аммония (А), (Б), (Г); ацетонитрил-водный раствор муравьиной кислоты (4:1 об.), состав водной части 20 мМ муравьиной кислоты (В).

Методом УФ-спектрофотометрии определили, что повышение основности раствора **II.2** (следующего начального состава: водный ацетонитрил, 50% об. в присутствии 0.05 М HCl) приводило к быстрой (несколько секунд) трансформации **II.2**→**II.3**, после которой происходила медленная (около 1 ч) трансформация **II.3**→**II.1**. Этот процесс наблюдали в кювете спектрофотометра при добавлении требуемых растворов пипеточными дозаторами и быстрым перемешиванием. Подкисление и последующее подщелачивание раствора **II.1** (в водном ацетонитриле, 50% об.) приводило к полному циклу трансформаций: **II.1**→**II.2**→**II.3**→**II.1**. Наиболее длинноволновая полоса в УФ-спектре **II.3** характеризуется батохромным сдвигом (10 нм) по сравнению с подобной полосой для UR-144 и **II.1**, Рисунок 5.33. Соединение **II.3** стабильно только в растворах с малым содержанием воды и в этих условиях хроматографируется методом ЖХ (Рисунок 5.3Г). Спектр ЭР ионов-предшественников **II.3** весьма подобен спектру **II.2**, а спектр ионов-продуктов - **II.1** и **II.2**. Последнее, скорее всего, связано с трансформацией соединений группы **II** в условиях электрораспыления.

Сходства масс-спектров и различие УФ-спектров соединений группы **II** делало удобным наблюдение их трансформаций методом ВЭЖХ-ДМД, а не ХМС. В режиме ГХ-МС соединение **II.3** является ГХ артефактом, образующемся при испарении или ГХ элюировании **II.1** и **II.2**, Рисунок 5.2 (А) и (Б). Его ЭИ фрагментация состоит преимущественно в элиминировании метильного радикала от молекулярного иона, Рисунок 5.9.

В целом, поведение соединений группы **II** подобно антоцианам [342, 343].

Состав продуктов пиролиза UR-144 и сопутствующих соединений. *Основной продукт пиролиза.* Основным компонентом в продуктах пиролиза было найдено соединение **III** (Рисунок 5.5), и оно же является ГХ артефактом при ГХ элюировании UR-144. Оно идентифицировано как продукт несимметричного раскрытия тетраметилцилопропанового остатка. УФ-спектр **III** подобен спектрам UR-144 и соединения **II.1** (Рисунок 5.6). ЭР спектр подобен соединениям **II.1-III**, а ЭИ фрагментация свидетельствует о появлении дополнительных легко элиминируемых остатков (ион, m/z 229, $C_{15}H_{19}NO^+$). Подобно UR-144, соединение **III** в кислой среде (HCl) легко гидратируется с образованием соединений группы **II**, Рисунок 5.1. ЯМР спектры UR-144 и соединений **II.1** и **III** и отнесения линий (DEPT, H/C-NMQC и регистрация спектра ^{13}C без спиновой развязки от протонов) приведены в Таблице 5.1.

Сопутствующие соединения. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы смеси продуктов пиролиза образца № 4 изображены на Рисунке 5.7, их ЭР спектры – на Рисунке 5.8. Соединения **IV** и **V** (Рисунок 5.1), обнаруживаемые в продуктах, содержащих UR-144, и в субстанции **II.1** при хранении, идентифицировали с помощью библиотек NIST11 и Wiley Registry (8th edition). Их спектры не приведены. Можно утверждать, что **IV** и **V** являются следствием деградации соединений группы **II**.

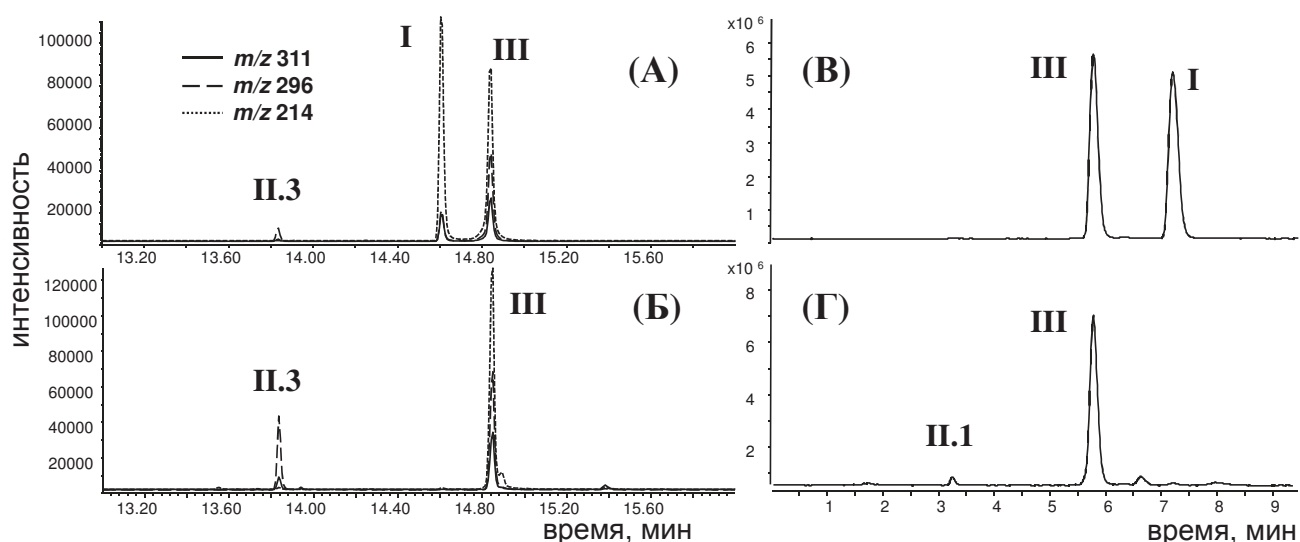


Рис. 5.5. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы продуктов пиролиза растительных смесей № 4 (А) и № 3 (Б). ЖХ-МС (ЭР) хроматограммы этих продуктов (В) и (Г), соответственно. Элюент: ацетонитрил-аммиачно-формиатный буфер (4:1), состав водной фазы – раствор формиата аммония (20 мМ, *pH* 5).

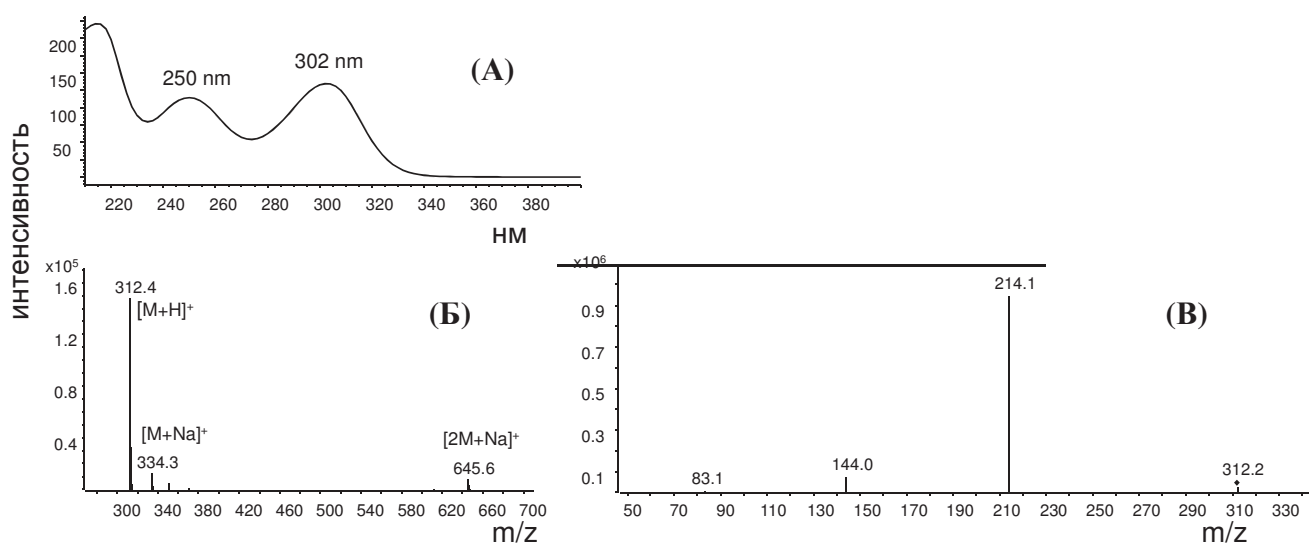


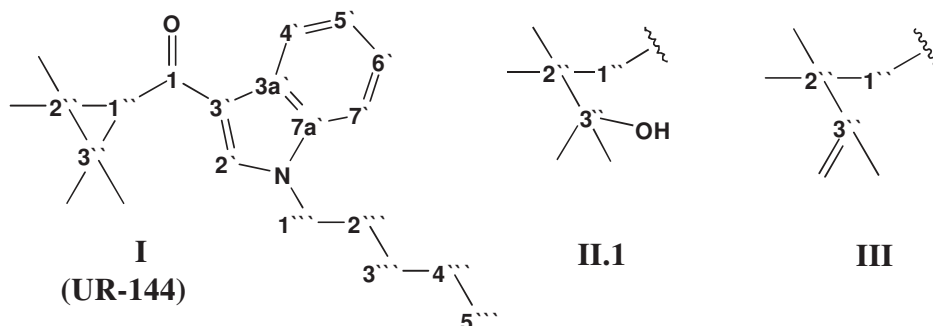
Рис. 5.6. УФ-спектр соединения III (А). ЖХ-МС (ЭР) спектр ионов-предшественников (Б) и ЖХ-МС/МС (ЭР) спектр ионов-продуктов III (В).

Соединение VI идентифицировали как N-дезалкилированный UR-144, и присутствует в образцах в качестве полупродукта его синтеза. Соединение VII – продукт пиролиза VI, аналогичный N-дезалкилированному III. Эти заключения, безусловно, аргументируются полным подобием ЭР и ЭИ фрагментации UR-144, III и их N-дезалкилированных форм, соответственно. В Таблице 5.2 приведены их индексы удерживания, вместе индексами для остальных обсуждаемых соединений.

Соединения **VIII** и **IX** найдены только в продуктах пиролиза, и их идентификация также не вызывает сомнений: в ЭИ спектрах присутствуют интенсивные пики ионов, m/z 214 и 144, указывающие на наличие оксометилиндольного остатка. ЭИ спектр соединения **X** (N-пентилиндол) присутствует в библиотеке NIST11. Его ЭР спектр подобен **VIII** и **IX**: все они имеют ионы, m/z 118 и 132, характеризующие протонированный индольный остаток.

Таблица 5.1. ЯМР спектры UR-144, соединений **II.1** и **III** (ppm)

Положение, №.	I (UR-144)		II.1		III	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	194.6	–	197.3	–	194.6	–
2'	133.4	7.69, s	135.4	7.79, s	134.5	7.66, s
3'	119.6	–	118.0	–	118.2	–
3'a	126.4	–	126.7	–	126.6	–
4'	122.8	8.43, m	123.2	8.43, m	123.2	8.43, m
5'	122.0	7.29, m	123.0	7.31, m	122.4	7.26, m
6'	122.7	7.29, m	123.6	7.31, m	123.1	7.26, m
7'	109.6	7.37, m	110.1	7.37, m	109.7	7.32, m
7'a	136.6	–	137.1	–	136.8	–
1''	41.7	1.98 (1H), s	48.5	3.04 (2H), s	49.7	2.87 (2H), s
2''	31.5	–	41.5	–	39.0	–
3''	31.5	–	74.3	–	152.6	–
2''-CH ₃	24.0	1.34, s	24.8	1.12, s	27.7	1.23, s
3''-CH ₃	24.0	1.34, s	26.1	1.27, s	20.0	1.83, m
3''=CH ₂	–	–	–	–	109.1	4.76 (1H), s 4.78 (1H), s
1'''	47.0	4.18, t, $J=7.3$ Hz	47.5	4.17, t, $J=7.3$ Hz	47.1	4.13, t, $J=7.2$ Hz
2'''	29.7	1.93, qi, $J=7.2$ Hz	29.8	1.91, qi, $J=7.4$ Hz	29.6	1.87, qi, $J=7.4$ Hz
3'''	29.0	1.33, m	29.2	1.36, m	29.0	1.32, m
4'''	22.2	1.33, m	22.5	1.36, m	22.3	1.32, m
5'''	13.9	0.94, t, $J=7.0$ Hz	14.1	0.92, t, $J=7.1$ Hz	13.9	0.88, t, $J=7.1$ Hz



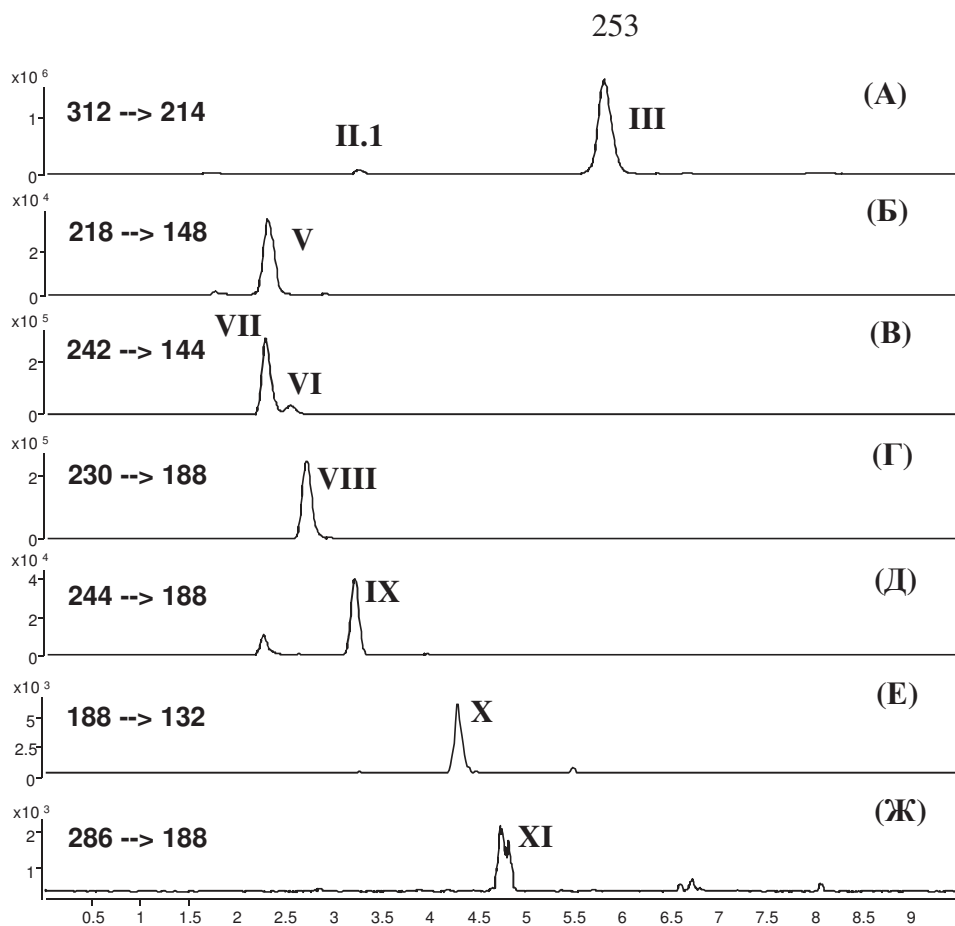


Рис. 5.7. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы продуктов пиролиза образца №4. Элюент: ацетонитрил-аммонийно-формиатный буфер (20 мМ формиата аммония, подстроенного водным аммиаком до *pH* 8.5), 4:1 об.

Таблица 5.2. Индексы удерживания соединений, сопутствующих UR-144 в смесях и продуктах пиролиза.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	HP-5ms	
				Реж. I	Реж. II
1	I (UR-144)	C ₂₁ H ₂₉ NO	311	2569	2548
2	II.1 TMS	C ₂₄ H ₃₉ NO ₂ Si	401	2879	2854
3	II.3	C ₂₁ H ₂₉ NO	311	2428	2412
4	III	C ₂₁ H ₂₉ NO	311	2610	2591
5	IV	C ₈ H ₁₄ O ₂	142	1146	1141
6	V	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	217	2014	1989
7	VI	C ₁₆ H ₁₉ NO	241	2379	2354
8	VII	C ₁₆ H ₁₉ NO	241	2424	2398
9	VIII	C ₁₅ H ₁₉ NO	229	2183	2160
10	IX	C ₁₆ H ₂₁ NO	243	2260	2239
11	X	C ₁₃ H ₁₇ N	187	1646	1632
12	XI	C ₁₉ H ₂₇ NO	285	2382	2364

В структуре последнего выявленного соединения (**XI**) присутствует пентильный остаток у карбонильной группы, о чем свидетельствует наличие иона, m/z 71, в ЭР спектре. Молекулярный ион в ЭИ спектре соединения **XI** весьма малоинтенсивен.

Присутствие всех сопутствующих соединений во всех рассмотренных образцах и в продуктах пиролиза образцов №№ 3 и 4 указано в Таблице 5.3.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [344, 345].

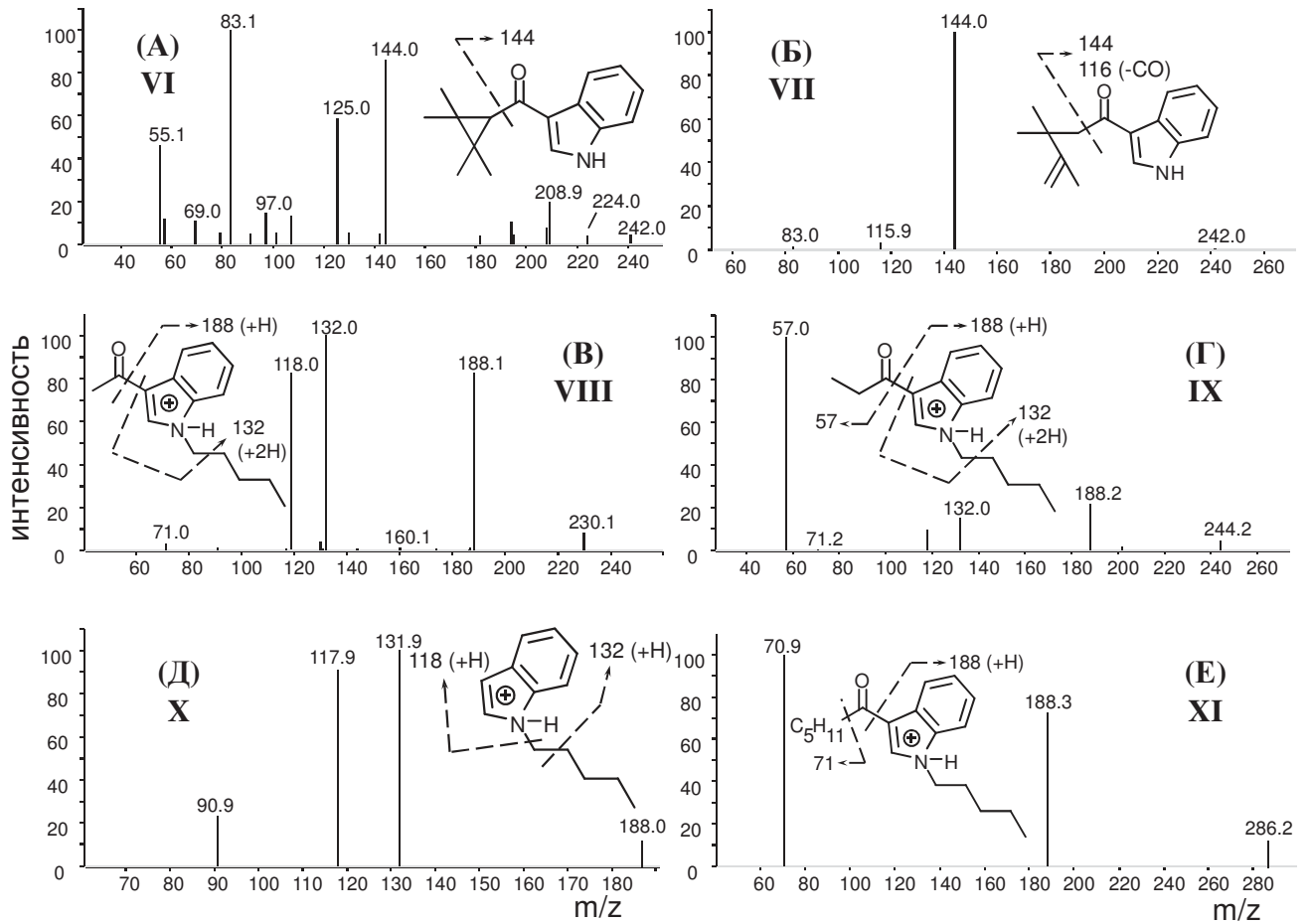


Рис. 5.8. ЖХ-МС/МС (ЭР) спектры соединений VII-XI.

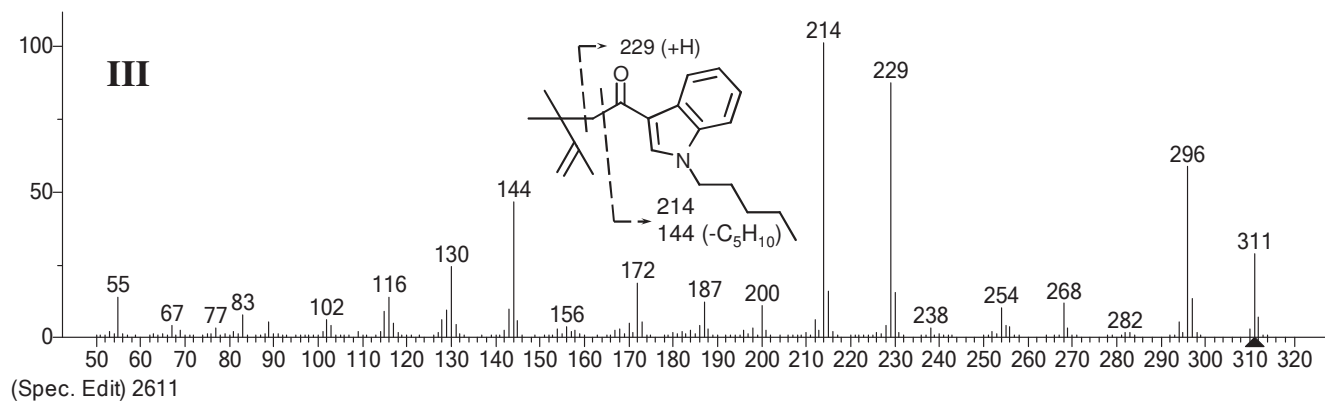
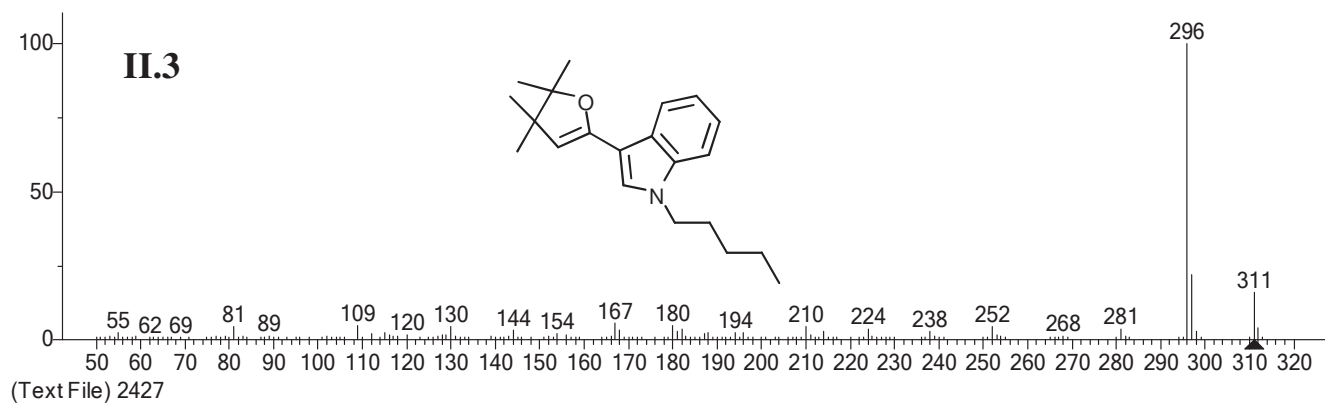
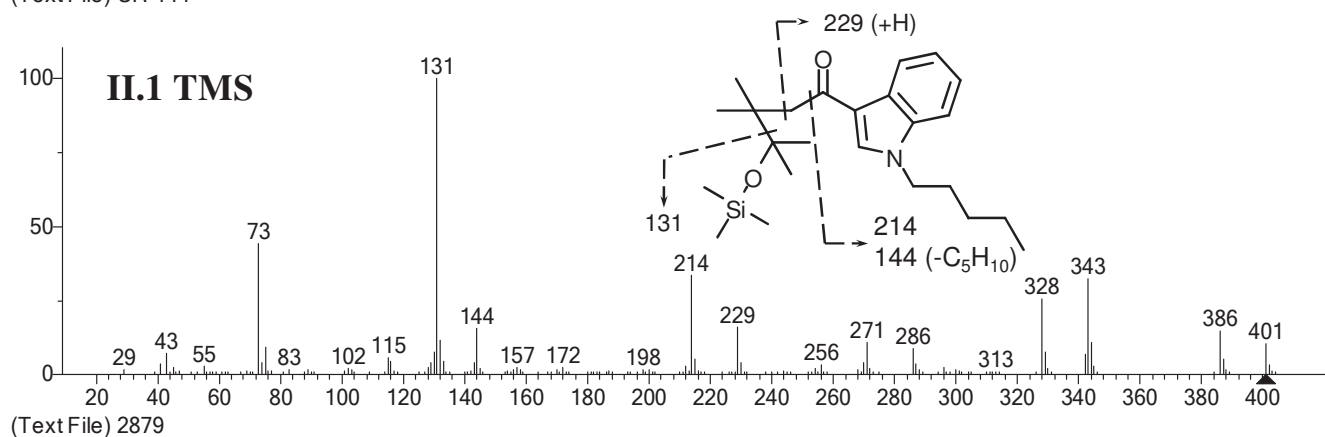
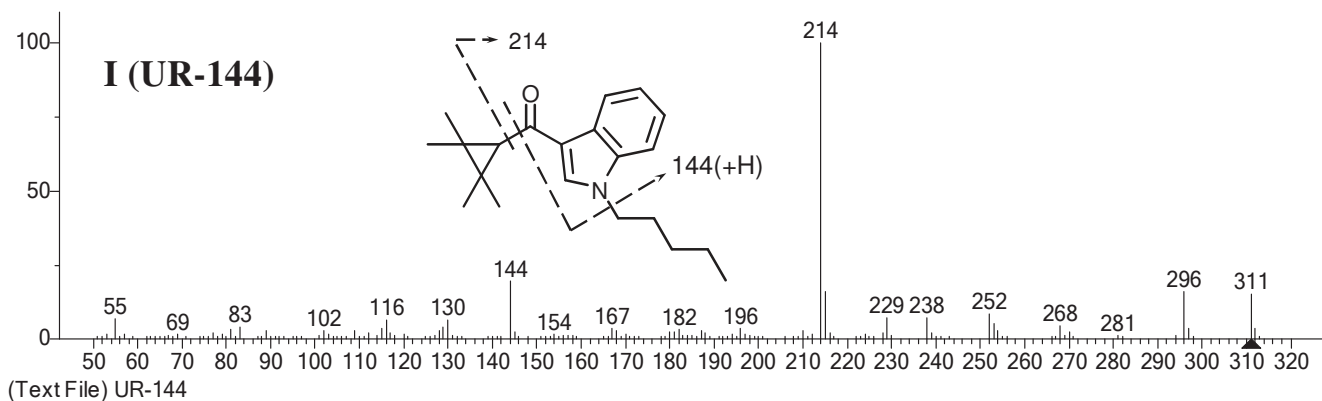


Рис. 5.9. ГХ-МС спектры UR-144 и его производных.

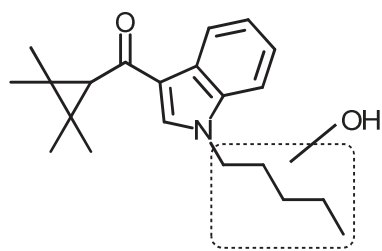
Таблица 5.3. Соединения, найденные в торговых образцах UR-144 и продуктах пиролиза.

Образец, №	Соединение									
	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
<i>Торговые образцы</i>										
1 (растительный)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2 (растительный)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 (растительный)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
4 (растительный)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5 (растительный)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
6 (растительный)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7 (резиноподобный)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
8 (порошок)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (порошок)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Продукты пиролиза</i>										
3 (растительный)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
4 (растительный)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

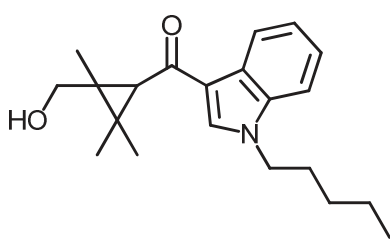
5.2. Выявление метаболитов UR-144 и его производных

Для исследования метаболизма UR-144 были использованы образцы мочи людей, принимавших каннабимиметик перорально или ингаляционно. Учитывая гидролизуюемость 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 их обнаружения с помощью дешевого аналитического метода.

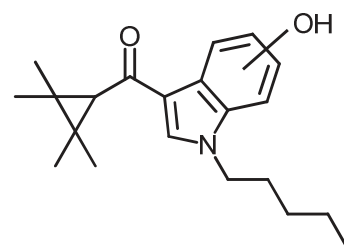
Всего охарактеризовали 58 метаболитов и артефактов кислотного деконъюгирования UR-144 и соединения **II**; их предполагаемые структурные формулы приведены на Рисунке 5.10, индексы удерживания – в Таблицах 5.4-5.6. Все метаболиты можно разделить на 4 группы: (i) соединения с неизменным триметилциклопропановым 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 ЖХ колонке при градиентном элюировании было отмечено по характеру хроматограмм (Рисунок 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**.



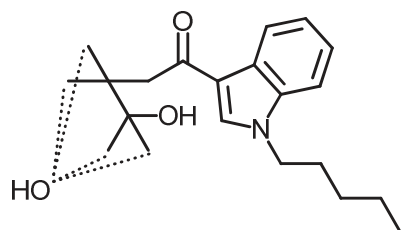
M1.1-M1.3



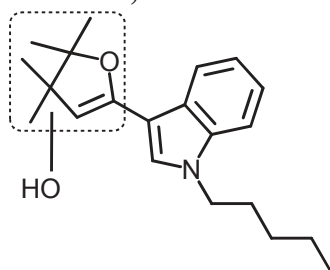
M1.4, M1.5



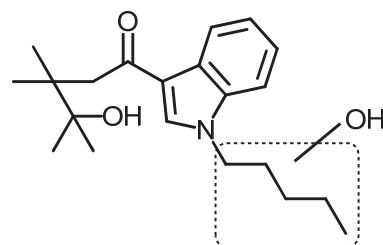
M1.6, M1.7



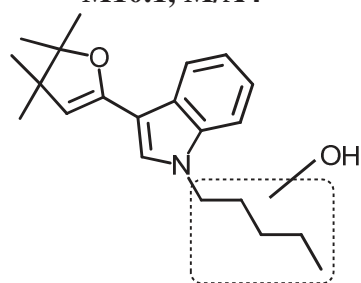
M10.1, M/A4



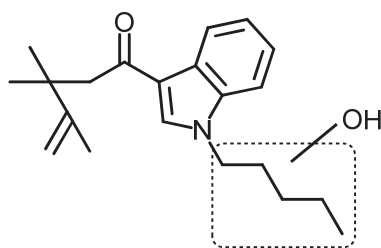
M10.1-H2O, M/A4-H2O



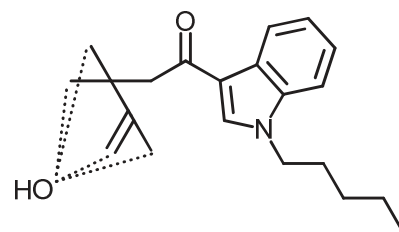
M10.2, M/A1



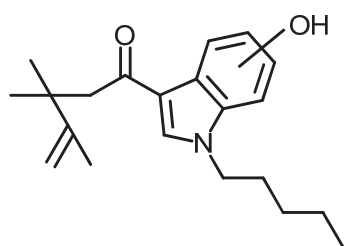
M10.2-H2O, M/A1-H2O



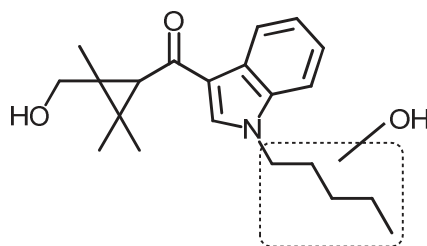
M11.1-M11.3



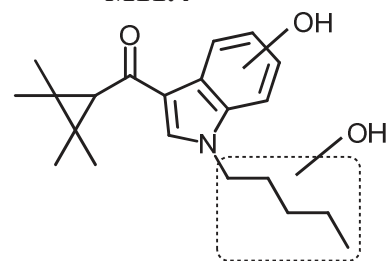
M11.4



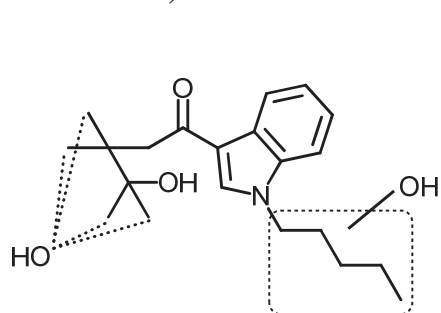
M11.5, M11.6



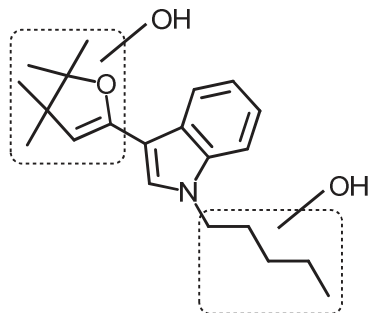
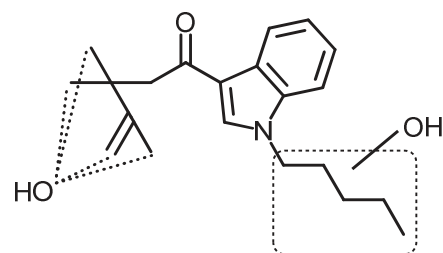
M2.1-M2.4



M2.5



M20.1, M20.2, M/A5, M/A6

M20.1-H2O, M20.2-H2O,
M/A5-H2O, M/A6-H2O

M21.1, M21.2

Рис. 5.10. Структуры метаболитов и артефактов UR-144 и его производных.

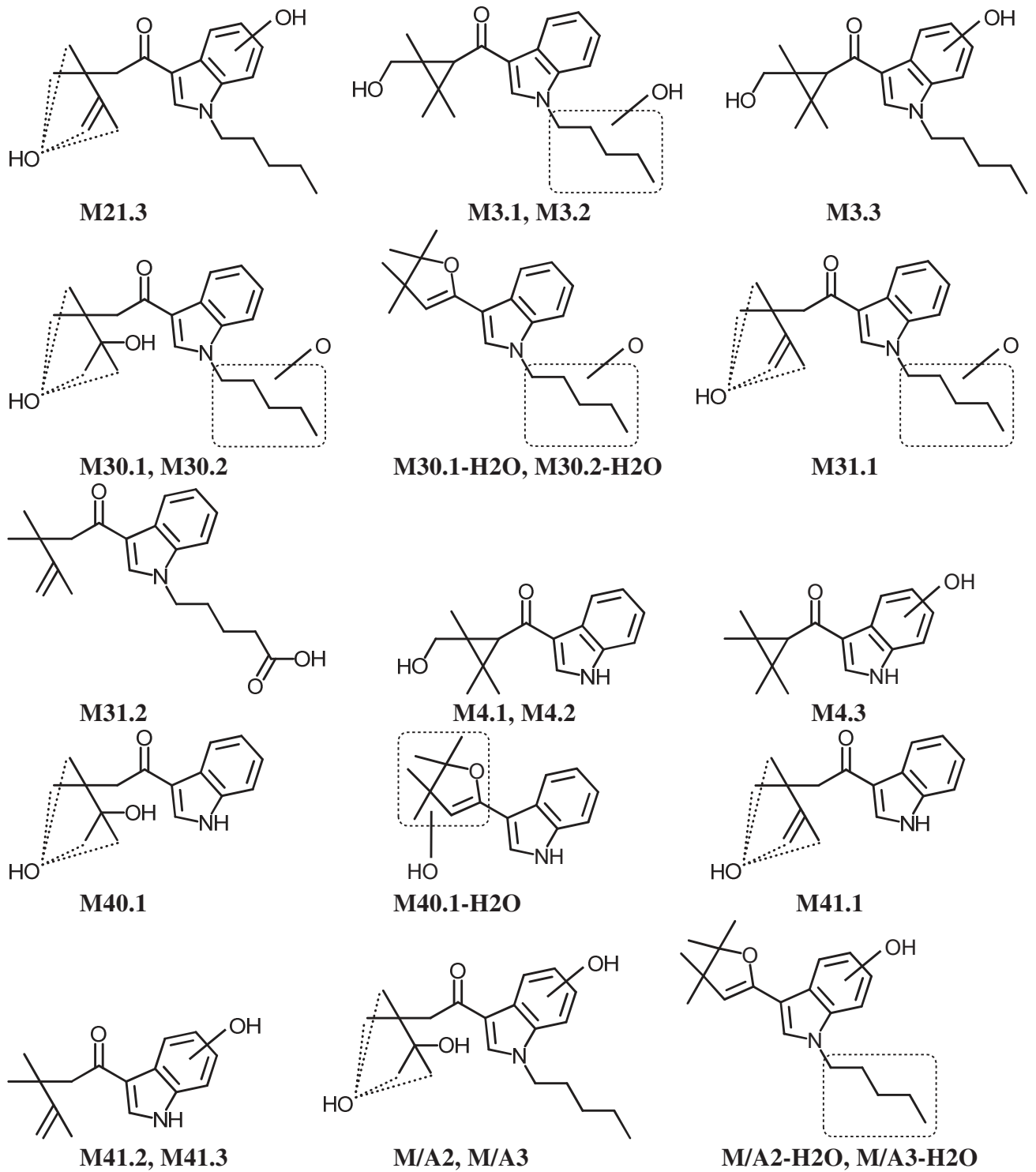


Рис. 5.10. Структуры метаболитов и артефактов UR-144 и его производных (окончание).

В каждой группе были найдены четыре основные метаболические формы – продукты моно- и дигидроксилирования, моногидроксилирования с образованием карбонильной группы на N-пентильной цепи, моногидроксилирования с N-деалкилированием. Карбоксилированный метаболит (**M31.2**) найден только для соединения **III**.

Неизмененный UR-144 и продукт его пиролиза (**III**) находили лишь в следовых концентрациях методом ЖХ-МС/МС. Однако кетол **II.1** был обнаружен почти во всех образцах, хотя интенсивности его хроматографических 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.

Таблица 5.4. Индексы удерживания моно- и дигидроксилированных метаболитов UR-144 и его производных в двух температурных режимах (колонка VF-5ms). Для продуктов термолиза приведены приблизительные величины.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺⁺	Исходные		Термолиз		Фр. №
				Реж. I	Реж. II	Реж. I	Реж. II	
1	M1.2 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2792	2770	-	-	11
2	M1.3 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2763	2740	2802	2779	12
3	M1.4 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2781	2760	2813	2793	12
4	M1.5 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2773	2752	2811	2791	13
5	M1.6 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2812	2801	2847	2831	13
6	M1.7 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2789	2774	2826	2811	13
7	M10.1 2TMS	C ₂₇ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	489	3048	3030	-	-	9
8	M10.1-H₂O TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2642	2629	-	-	9
9	M10.2 2TMS	C ₂₇ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	489	3076	3055	-	-	6
10	M10.2-H₂O TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2641	2626	-	-	6
11	M11.1 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2919	2895	-	-	10
12	M11.2 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2832	2813	-	-	10
13	M11.3 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2805	2783	-	-	11
14	M11.4 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2843	2824	-	-	12
15	M11.6 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2825	2812	-	-	12
16	M11.7 TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2848	2832	-	-	12
17	M2.1 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	3058	3043	3093	3074	5
18	M2.2 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2975	2959	3011	2999	5
19	M2.3 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2975	2956	3015	3001	6
20	M2.4 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2940	2924	2979	2962	6, 7
21	M2.5 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2985	2973	3011	3003	7
22	M20.1 3TMS	C ₃₀ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	577	3240	3226	-	-	3
23	M20.1-H₂O 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2835	2827	-	-	9
24	M20.2 3TMS	C ₃₀ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	577	3221	3207	-	-	4
25	M20.2-H₂O 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2816	2808	-	-	10
26	M21.1 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	3039	3024	-	-	5
27	M21.3 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	3015	3006	-	-	6

Для ферментативного деконъюгирования образцов и последующего анализа методом ЖХ/МС/МС (Рисунок 5.11) наиболее пригодны моногидроксилированные формы. По нашему мнению, наиболее объективным результатом количественного определения является сумма

содержания форм с неизменным (M1.1) и открытым (M11.1) циклопропановым остатком. Циклизуемость гидратных форм (iii) делает их пригодными только для качественных обнаружений методом ГХ-МС после силилирования.

Таблица 5.5. Индексы удерживания моногидроксилированных метаболитов с карбонильной группой и дезалкилированных моногидроксилированных метаболитов UR-144 и его производных в двух температурных режимах (колонка VF-5ms). Для продуктов термоллиза приведены приблизительные величины.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	Исходные		Термоллиз		Фр. №
				Реж. I	Реж. II	Реж. I	Реж. II	
1	M3.2 TMS	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃ Si	413	2958	2930	2997	2967	6,7
2	M3.3 TMS	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃ Si	413	2963	2942	3006	2985	8
3	M30.1 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₄ Si ₂	503	3231	3208	-	-	4
4	M30.1-H ₂ O TMS	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃ Si	413	2824	2808	-	-	10
5	M30.2 2TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₄ Si ₂	503	3209	3187	-	-	
6	M30.2-H ₂ O TMS	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃ Si	413	2811	2799	-	-	5
7	M31.1 TMS	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃ Si	413	3026	3004	-	-	6
8	M31.2 TMS	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃ Si	413	3020	3003	-	-	2
9	M4.2 2TMS	C ₂₂ H ₃₅ NO ₂ Si ₂	401	2553	2538	2589	2570	4, 5
10	M4.3 2TMS	C ₂₂ H ₃₅ NO ₂ Si ₂	401	2599	2587	2620	2609	7
11	M40.1 3TMS	C ₂₅ H ₄₅ NO ₃ Si ₃	491	2846	2831	-	-	2
12	M40.1-H ₂ O 2TMS	C ₂₂ H ₃₅ NO ₂ Si ₂	401	2438	2430	-	-	8
13	M41.1 2TMS	C ₂₂ H ₃₅ NO ₂ Si ₂	401	2620	2605	-	-	4
14	M41.2 2TMS	C ₂₂ H ₃₅ NO ₂ Si ₂	401	2592	2578	-	-	6
15	M41.3 2TMS	C ₂₂ H ₃₅ NO ₂ Si ₂	401	2625	2612	-	-	6

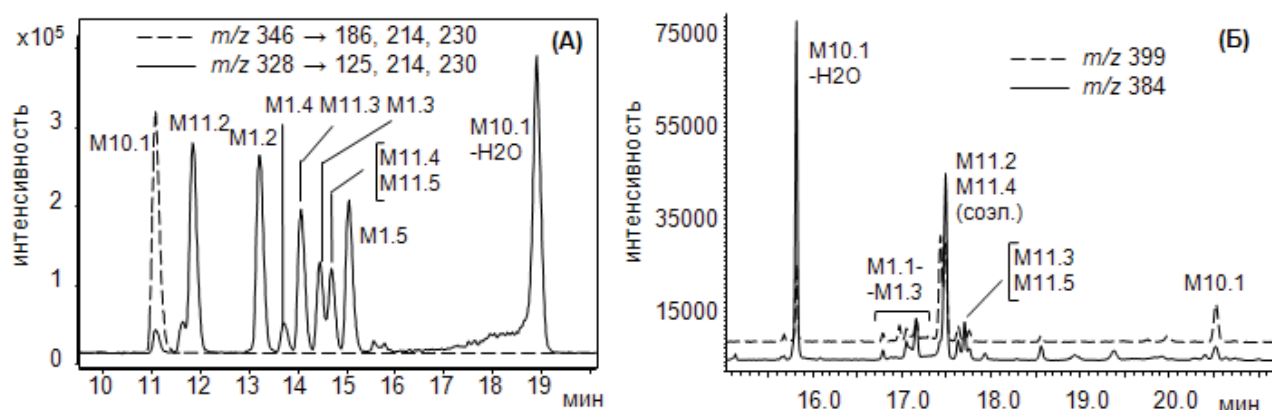


Рис. 5.11. Хроматограммы метаболитов UR-144 и соединения III в моче человека: ЖХ-МС/МС, ЭР (А), ГХ-МС, ЭИ (Б).

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 Рисунке. 5.1. Такое сведение форм значительно упрощает хроматограммы (Рисунок 5.12), но может быть использовано только для качественных обнаружений. Полученные результаты были подтверждены работой [346].

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [347, 348].

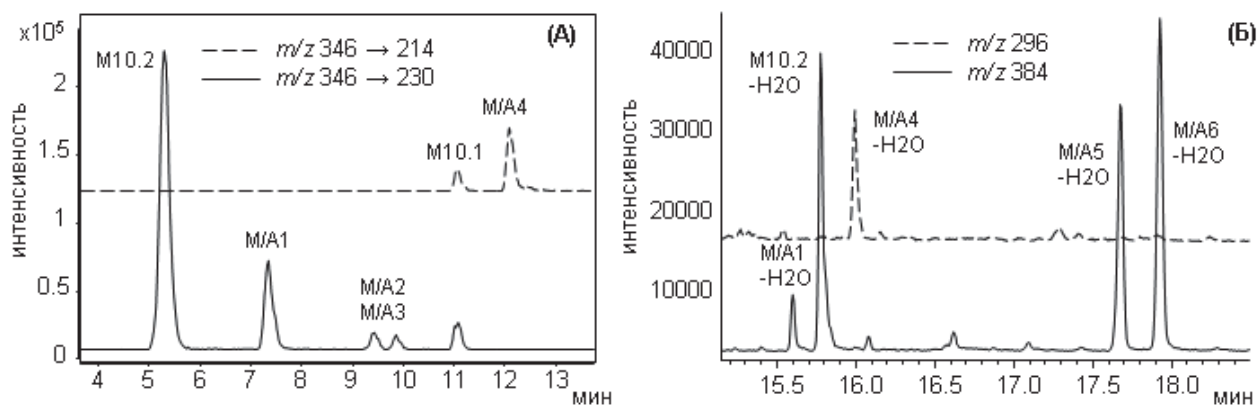


Рис. 5.12. Хроматограммы метаболитов UR-144 и их гидратных артефактных форм (M/A) в моче человека: ЖХ-МС/МС, ЭР (А), ГХ-МС, ЭИ (Б). Гидратированные формы **M10.2** и **M/A1** моногидроксилированы по N-пентильной цепи, **M/A2** и **M/A3** – по индольному кольцу, **M10.1** и **M/A4** – по гептильному остатку, **M/A5** и **M/A6** – по цепи и по гептильному остатку.

Таблица 5.6. Индексы удерживания моно- и дигидроксилированных артефактов пробоподготовки (кислотное деконъюгирование) метаболитов и производных UR-144 в двух температурных режимах (колонка VF-5ms).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺⁺	Исходные	
				Реж. I	Реж. II
1	M/A1 2TMS	C ₂₇ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	489	3055	3035
2	M/A1-H₂O TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2620	2606
3	M/A2 2TMS	C ₂₇ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	489	3072	3058
4	M/A2-H₂O TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2642	2633
5	M/A3 2TMS	C ₂₇ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	489	3092	3076
6	M/A3-H₂O TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2670	2660
7	M/A4 2TMS	C ₂₇ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	489	3104	3079
8	M/A4-H₂O TMS	C ₂₄ H ₃₇ NO ₂ Si	399	2664	2652
9	M/A5 2TMS	C ₃₀ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	577	3098	3086
10	M/A5-H₂O TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2836	2827
11	M/A6 2TMS	C ₃₀ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	577	3126	3112
12	M/A6-H₂O TMS	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	487	2855	2846

5.3. Выявление метаболитов АВ-001

Хотя синтез и исследование некоторых адамантоиндольных каннабимиметиков были осуществлены группой Makriyannis (например, [183]), N-пентилиндольное производное АВ-001

(Рисунок 5.13) является неавторизованным соединением; его аффинность к каннабиноидным рецепторам человека неизвестна. АВ-001 был идентифицирован в составе курительных смесей, продаваемых в Ирландии [211]. Впоследствии это соединение обнаруживали другие исследователи [214, 216]. Согласно нашим данным, АВ-001 мало распространен в России, тем не менее, его оборот ограничен в соответствии с постановлением Правительства РФ от 6 октября 2011 г. № 822 ("О внесении изменений в некоторые акты Правительства Российской Федерации в связи с совершенствованием контроля за оборотом наркотических средств"). Работы по АВ-001 были выполнены совместно с ирландскими исследователями.

Образец АВ-001 (мелкокристаллический порошок белого цвета) был синтезирован в лаборатории Kavanagh и охарактеризован там же методами ЯМР, ТСХ, ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Примерное содержание целевого вещества, оцененное данными методами, составляло более 95%.

Для исследования мочевого метаболического профиля АВ-001 использовали образцы мочи персон (44), доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания неизвестными соединениями. Исходный АВ-001 не был обнаружен ни в одном из образцов.

Образцы мочи, полученные из наркодиспансеров, сортировали так же, как и для случая JWH-018.

Случаи, использованные для измерения профилей экскреции (подтвержденные анализом изъятых смесей).

C1 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 166 часа после приема.

C2 – пероральный прием. Мочу собирали в течение 163 ч., однако, после 113 ч. метаболиты АВ-001 более не обнаруживали.

C3 – курение. Мочу собирали в течение 165 ч.

Подготовка проб и условия анализа. Образцы мочи деконъюгировали кислотным и ферментативным способами. Для ЖХ-МС/МС хроматограммы регистрировали (Приложение 1) в условиях градиентного элюирования фазами А (0.3 об.% муравьиной кислоты в воде) и Б (ацетонитрил) согласно следующей программе: 40 об.% фазы Б (1 мин), линейный градиент до 100 % фазы Б (15 мин) и сохранение состава (4 мин). Для ГХ-МС хроматограммы регистрировали при помощи системы ГХ-МС(III) (при анализе недериватизированных и метилированных образцов) и системы ГХ-МС(II) при анализе TMS и метилированных образцов. Всего охарактеризовали 60 соединений (Рисунок 5.13), индексы удерживания и распределение соединений по ВЭЖХ фракциям приведены в Таблице 5.7. Ни в одном из образцов не обнаружили неизмененный АВ-001.

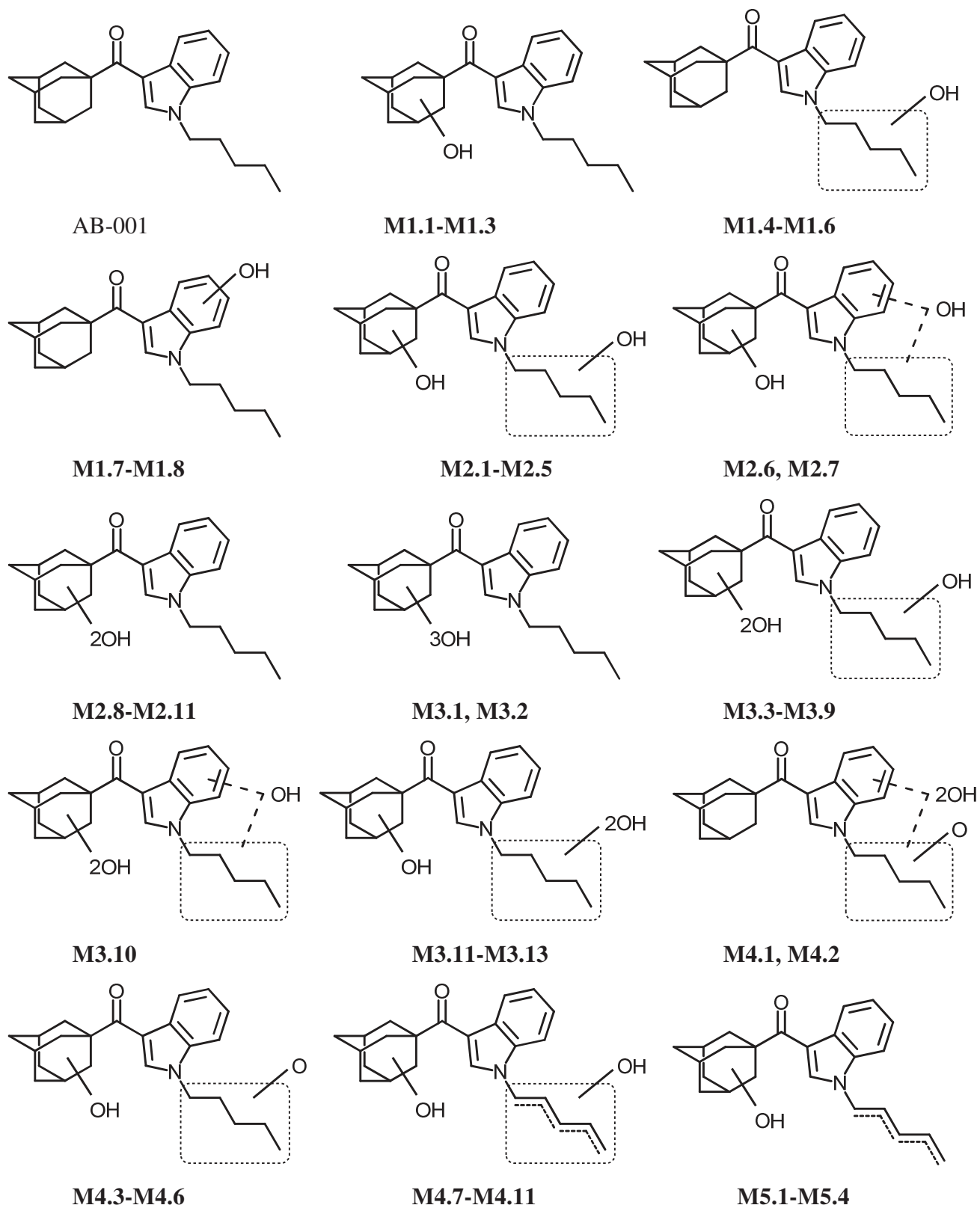


Рис. 5.13. Структуры AB-001 и его метаболитов.

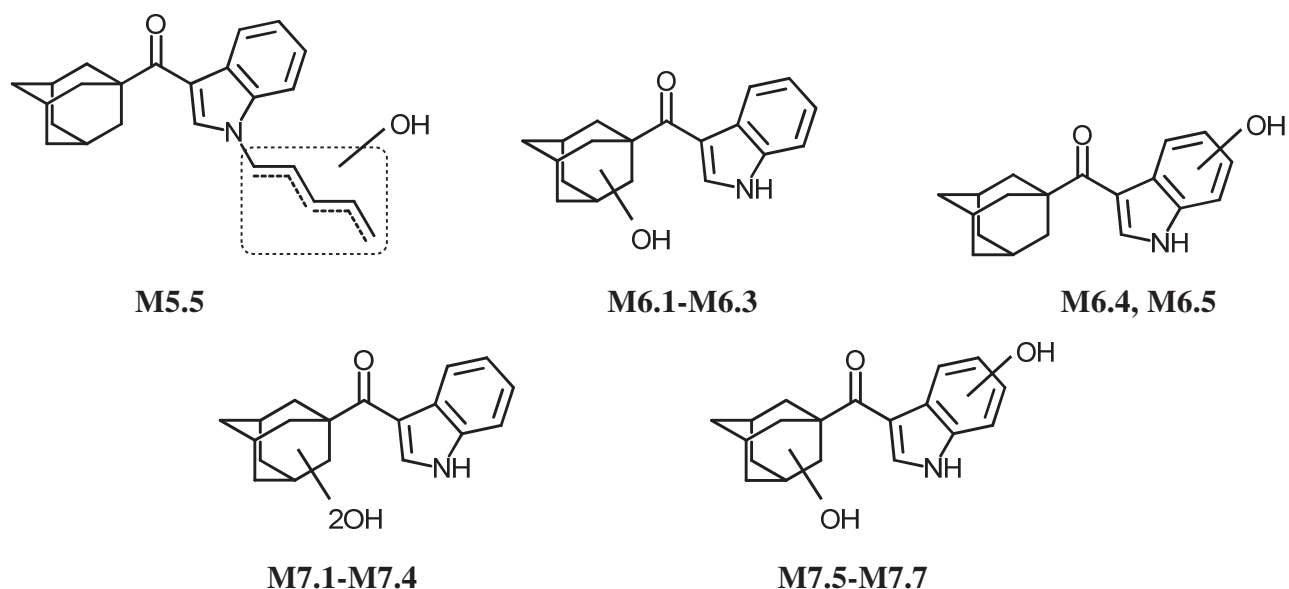


Рис. 5.13. Структуры АВ-001 и его метаболитов (окончание).

Концентрирование метаболитов АВ-001 проводили методом полупрепаративной ВЭЖХ-ДМД (Приложение 1), колонка Zorbax SB-C18. 50 мл мочи обработали по схеме кислотного гидролиза. Остаток, полученный после упаривания экстракта, растворили в 0.5 мл этилацетата и загрузили на патрон AccuBond C18 (3 мл, 200 мг). Сорбент промыли этилацетатом (3 мл); смыв упарили досуха и остаток растворили в ацетонитриле (400 мкл). Полученный раствор разделили на 8 фракций при изократическом элюировании (вода-ацетонитрил 5:95 об.).

Скорость потока была 1 мл/мин, вводимый объем 40 мкл. Времена отбора фракций, мин: (1) 1.5-1.7, (2) 1.7-1.9, (3) 1.9-2.1, (4) 2.1-2.3, (5) 2.3-2.7, (6) 2.7-3.1, (7) 3.1-3.5, (8) 3.5-3.9. Мертвый объем системы оценивали по удерживанию урацила (1.25 мин); удерживание исходного АВ-001 составляло 4.65 мин. Каждую фракцию упаривали в вакуумном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) досуха и анализировали методом ГХ-МС.

Выявление метаболитов и определение их структурных характеристик. МС фрагментация исходного АВ-001. ЭР спектр АВ-001, зарегистрированный в наших условиях, малохарактеристичен. Основной пик (m/z 135) соответствует иону адамантилиума. Этот же ион (пик которого, в данном случае, малоинтенсивен) присутствует и в ЭИ спектре АВ-001 (Рисунки 5.22-5.24). Основные направления ЭИ фрагментации АВ-001 подобны фенилацетилиндолами и, в значительной степени, алканоилиндолу UR-144: в спектре представлен преимущественно оксометилилиндольный остаток АВ-001 (ионы, m/z 144 и 214).

Таблица 5.7. Индексы удерживания АВ-001 и его метаболитов для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах.

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺⁺	VF-5ms		EVDX-5ms		Фр. №
				Реж. III	Реж. I	Реж. III	Реж. I	
1	АВ-001	C ₂₄ H ₃₁ NO	349	3269	3229	3250	3217	-
2	M1.1 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	3361	3329	3348	3320	5
3	M1.2 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	3412	3379	3401	3370	5
4	M1.3 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	3384	3349	3370	3340	5, 6
5	M1.4 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	3463	3425	3448	3415	5
6	M1.5 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	3554	3516	3539	3505	5
7	M1.6 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	-	-	3419	-	6
8	M1.7 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	-	-	3475	-	6, 7
9	M1.8 TMS	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂ Si	437	-	-	3440	-	6, 7
10	M2.1 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3520	3494	3510	3482	3
11	M2.2 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3545	3516	3532	3506	3
12	M2.3 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3547	3520	3536	3510	3
13	M2.4 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3561	3531	3549	3521	3
14	M2.5 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3562	3533	3553	3525	3
15	M2.6 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3569	3547	3558	3538	3
16	M2.7 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3595	3565	3585	3556	3
17	M2.8 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3380	3361	3372	3354	3
18	M2.9 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3443	3424	3434	3417	3
19	M2.10 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3457	3438	3449	3430	3
20	M2.11 2TMS	C ₃₀ H ₄₇ NO ₃ Si ₂	525	3528	3503	3519	3496	5
21	M3.1 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3333	3330	3330	3327	3
22	M3.2 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3457	3444	3453	3440	3
23	M3.3 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3534	3519	-	-	2
24	M3.4 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3560	3543	-	-	2
25	M3.5 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3593	3573	-	-	2
26	M3.6 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3609	3594	-	-	2
27	M3.7 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3624	3610	-	-	2
28	M3.8 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3646	3623	3639	3616	3
29	M3.9 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3672	3649	3666	3643	3
30	M3.10 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3702	3680	3696	3675	3
31	M3.11 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3629	3606	3622	3599	3
32	M3.12 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3655	3632	3646	3625	3
33	M3.13 3TMS	C ₃₃ H ₅₅ NO ₄ Si ₃	613	3678	3654	3667	3644	3
34	M4.3 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₃ Si	451	3545	3509	3534	3502	3
35	M4.4 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₃ Si	451	3558	3520	3546	3511	3
36	M4.5 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₃ Si	451	3574	3536	3564	3530	3
37	M4.6 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₃ Si	451	3599	3558	3589	3554	3
38	M4.7 2TMS	C ₃₀ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	523	3501	3471	3491	3462	3
39	M4.8 2TMS	C ₃₀ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	523	3577	3545	3565	3534	3
40	M4.9 2TMS	C ₃₀ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	523	3587	3553	3574	3542	3
41	M4.10 2TMS	C ₃₀ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	523	3615	3583	3605	3573	3
42	M4.11 2TMS	C ₃₀ H ₄₅ NO ₃ Si ₂	523	3624	3593	3615	3582	3

Моногидроксилированные метаболиты M1.1-M1.8 (M.w. = 365). Особенностью АВ-001 можно считать его глубокий метаболизм, который объясняется повышенным (по сравнению с

большинством рассмотренных ранее каннабимиметиков) липофильным характером структуры. Эта особенность АВ-001 – и обилие метаболитов со структурами, значительно отличающимися от исходного соединения - делает его мочевой метаболический профиль подобным липофильному JWH-210.

Таблица 5.7. Индексы удерживания АВ-001 и его метаболитов для двух слабополярных фаз в двух температурных режимах (окончание).

№	Соединение	Брутто-формула	[M] ⁺	VF-5ms		EVDX-5ms		Фр. №
				Реж. III	Реж. I	Реж. III	Реж. I	
43	M5.1 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₂ Si	435	3353	3321	3341	3313	5
44	M5.2 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₂ Si	435	3374	3338	3360	3329	5
45	M5.3 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₂ Si	435	3393	3355	3378	3345	5
46	M5.4 TMS	C ₂₇ H ₃₇ NO ₂ Si	435	3423	3388	3411	3379	5
47	M6.1 Me TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂ Si	381	3141	3105	3128	3099	2
48	M6.2 Me TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂ Si	381	3208	3170	3198	3165	2
49	M6.3 Me TMS	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂ Si	381	3161	3123	3148	3117	2
50	M6.4 2TMS	C ₂₅ H ₃₇ NO ₂ Si ₂	439	3245	3218	-	-	3
51	M6.5 2TMS	C ₂₅ H ₃₇ NO ₂ Si ₂	439	3200	3173	-	-	3
52	M7.1 Me 2TMS	C ₂₆ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	469	3171	3148	3160	3143	2
53	M7.2 Me 2TMS	C ₂₆ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	469	3245	3218	3237	3216	2
54	M7.3 Me 2TMS	C ₂₆ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	469	3294	3263	3288	3259	2
55	M7.4 Me 2TMS	C ₂₆ H ₃₉ NO ₃ Si ₂	469	3343	3314	3337	3312	2
56	M7.5 2Me TMS	C ₂₄ H ₃₃ NO ₃ Si	411	3394	3358	3386	3358	2
57	M7.6 2Me TMS	C ₂₄ H ₃₃ NO ₃ Si	411	3414	3377	3406	3376	2
58	M7.7 2Me TMS	C ₂₄ H ₃₃ NO ₃ Si	411	3458	3422	3452	3422	2

Несмотря на то, что мы выявили 8 моногидроксилированных метаболитов, относительная интенсивность их хроматографических сигналов невелика, причем предпочтительным местом локализации гидроксильной группы найдена не N-пентильная цепь (метаболиты **M1.4-M1.6**), а алмагтановый остаток (**M1.1-M1.3**). Этот факт подтверждает сделанное выше заключение о преимущественном гидроксировании алифатических, а не ароматических остатков. Хроматограммы, иллюстрирующие присутствие моногидроксилированных метаболитов АВ-001 в необогащенных образцах мочи, приведены на Рисунках 5.14 и 5.15.

Метод ГХ-МС был основным при выявлении метаболитов АВ-001 ввиду большей разделительной способности, что необходимо при наличии многочисленных изомеров. Ввиду меньшей чувствительности метода ГХ-МС по сравнению с ЖХ-МС/МС, значительное число метаболитов наблюдали этим методом только в ВЭЖХ фракциях (Рисунок 5.16). Несмотря на большую фактическую чувствительность, метод ЖХ-МС/МС применяли в качестве вспомогательного – для обнаружения групп изомеров и подтверждения их существования.

Точных сопоставлений между удерживанием определенных соединений, наблюдаемых обоими методами, не выполняли.

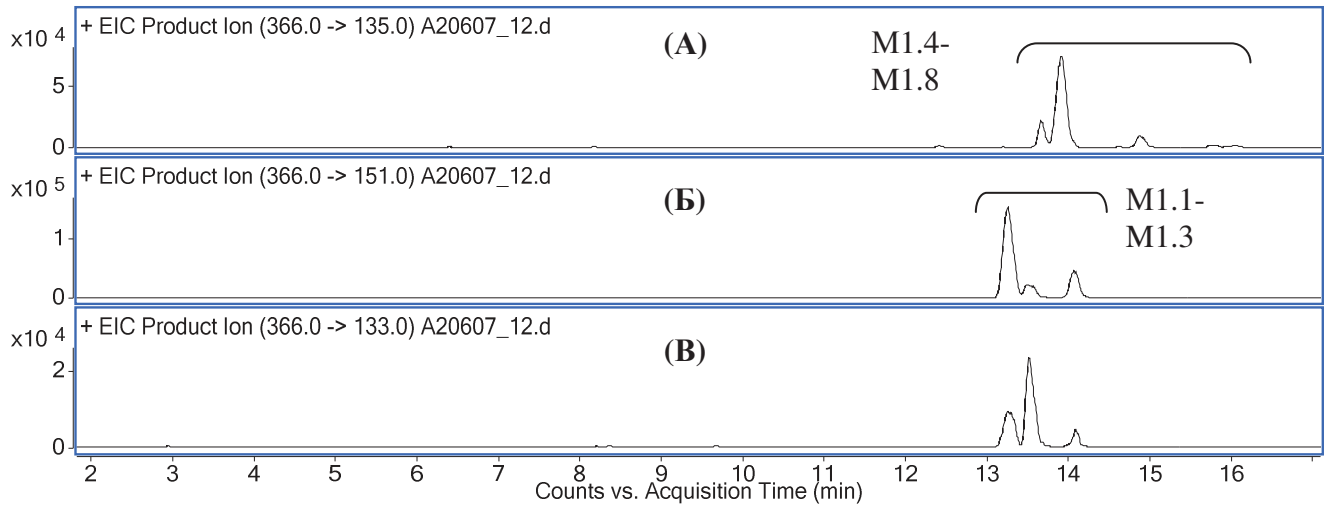


Рис. 5.14. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Моногидроксилированные метаболиты АВ-001 с расположением гидроксильных групп на пентилиндольном (А) и адамантановом (Б, В) остатках.

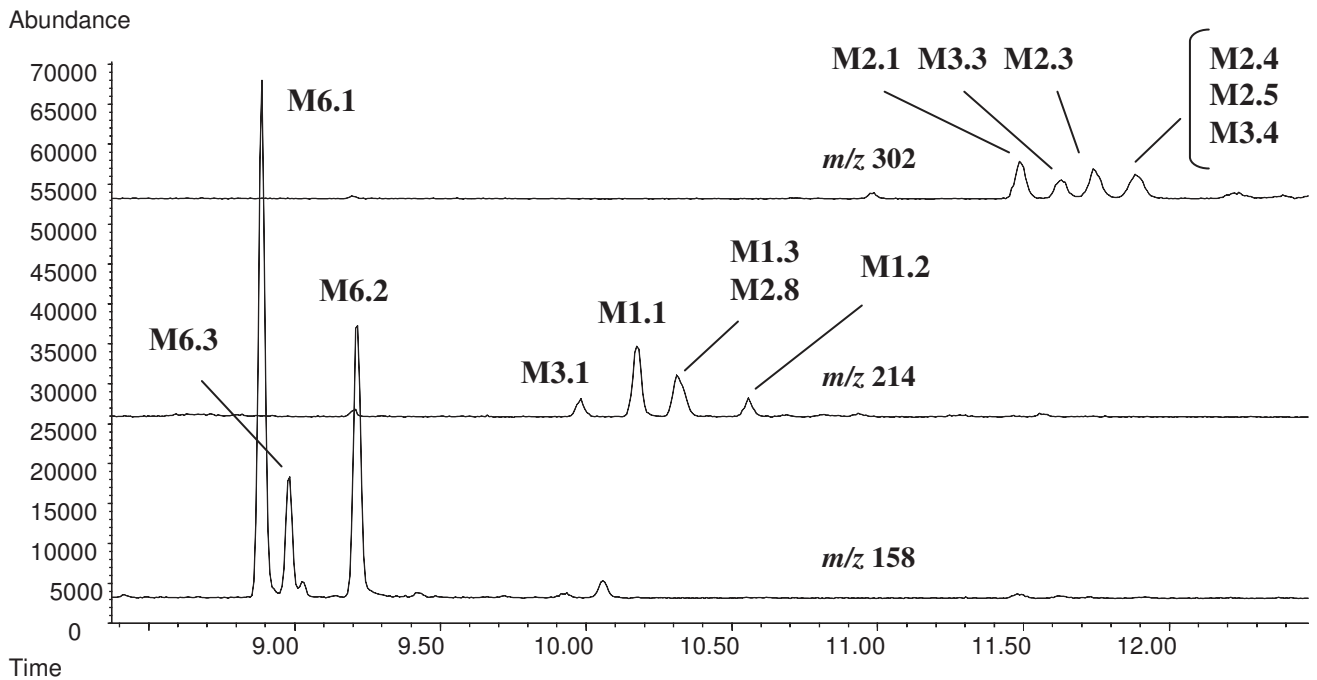


Рис. 5.15. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы образца мочи человека. Метаболиты АВ-001, кислотный гидролиз, TMS (колонка VF-5ms, режим III).

Для ЭР спектров метаболитов с гидроксильной группой, расположенной на адамантановом остатке (M1.1-M1.3) характерно наличие пиков ионов, m/z 151, (моногидроксилированный адамантановый остаток) и, по крайней мере, в ряде случаев –

дегидратированного иона, m/z 133, Рисунок 5.14. На Рисунке 5.22 приведены спектры, зарегистрированные в максимумах хроматографических пиков. ЭИ спектры этих метаболитов (TMS) подобны исходному АВ-001 за исключением молекулярного иона и иона, m/z 223, соответствующего тому же моногидроксилированному адамантановому остатку.

В ЭР спектрах метаболитов, гидроксилированных по пентилиндольному остатку (**M1.4-M1.8**) наиболее интенсивен пик иона, m/z 135, соответствующий неизмененному адамантановому остатку. Ион, m/z 186, образуется при дегидратации метаболитов с гидроксильной группой на боковой цепи (см. выше). ЭИ спектры этих метаболитов подобны спектрам фенилацетилиндолов, моногидроксилированных по пентилиндольному остатку, и имеют интенсивный пик иона, m/z 302. Положение гидроксильных групп у **M1.7** и **M1.8** (гидроксилированных по индольному циклу) подтверждали метилированием.

Дигидроксилированные метаболиты M2.1-M2.11 (M.w. = 381). Пять метаболитов (**M2.1-M2.5**) гидроксилированы по боковой цепи и адамантановому циклу, Рисунок 5.17. Для ЭР спектров этих метаболитов характерно наличие иона, m/z 151, и – по крайней мере, в ряде случаев – иона, m/z 186, образующегося при дегидратации боковой цепи. В ЭИ спектрах **M2.1-M2.5** наиболее интенсивен пик иона, m/z 302 (Рисунок 5.23), соответствующий моногидроксилированному (TMS) пентилиндольному остатку.

Концентрации двух метаболитов (**M2.6**, **M2.7**) были недостаточными для уверенной детализации положения гидроксильных групп; можно лишь заключить, что одна из них находится на адамантановом, а вторая – на пентилиндольном остатках.

В ЭР спектрах метаболитов **M2.8-M2.11** присутствует интенсивный пик иона, m/z 167, что указывает на дигидроксилирование адамантанового остатка. ЭР спектры этих метаболитов весьма подобны исходному АВ-001 и содержат пики ионов, m/z 144 и 214, указывающие на наличие неизмененного пентилиндольного остатка.

Тригидроксилированные метаболиты M3.1-M3.13 (M.w. = 397). Первые два представителя этой группы (**M3.1** и **M3.2**) имеют тригидроксилированный адамантановый остаток. Хотя эти соединения не были выявлены методом ЖХ-МС/МС (возможно, из-за ошибочных представлений об их масс-фрагментации), оба метаболита наблюдали методом ГХ-МС в ВЭЖХ фракции (Рисунок 5.16И), а **M3.1** – в небогатенной моче (Рисунок 5.15). ЭИ спектры **M3.1** и **M3.2** весьма подобны исходному АВ-001. Несколько необычным кажется ГХ удерживание **M3.1** (оно меньше, чем у моногидроксилированных метаболитов). Однако, этот факт может быть объяснен малой стерической доступностью атомов кислорода в тригидроксилированном (TMS) адамантановом остатке; следует также отметить, что подобное поведение наблюдали в случае метаболита JWH-203, дигидроксилированного по хлорбензильному остатку (см. выше).

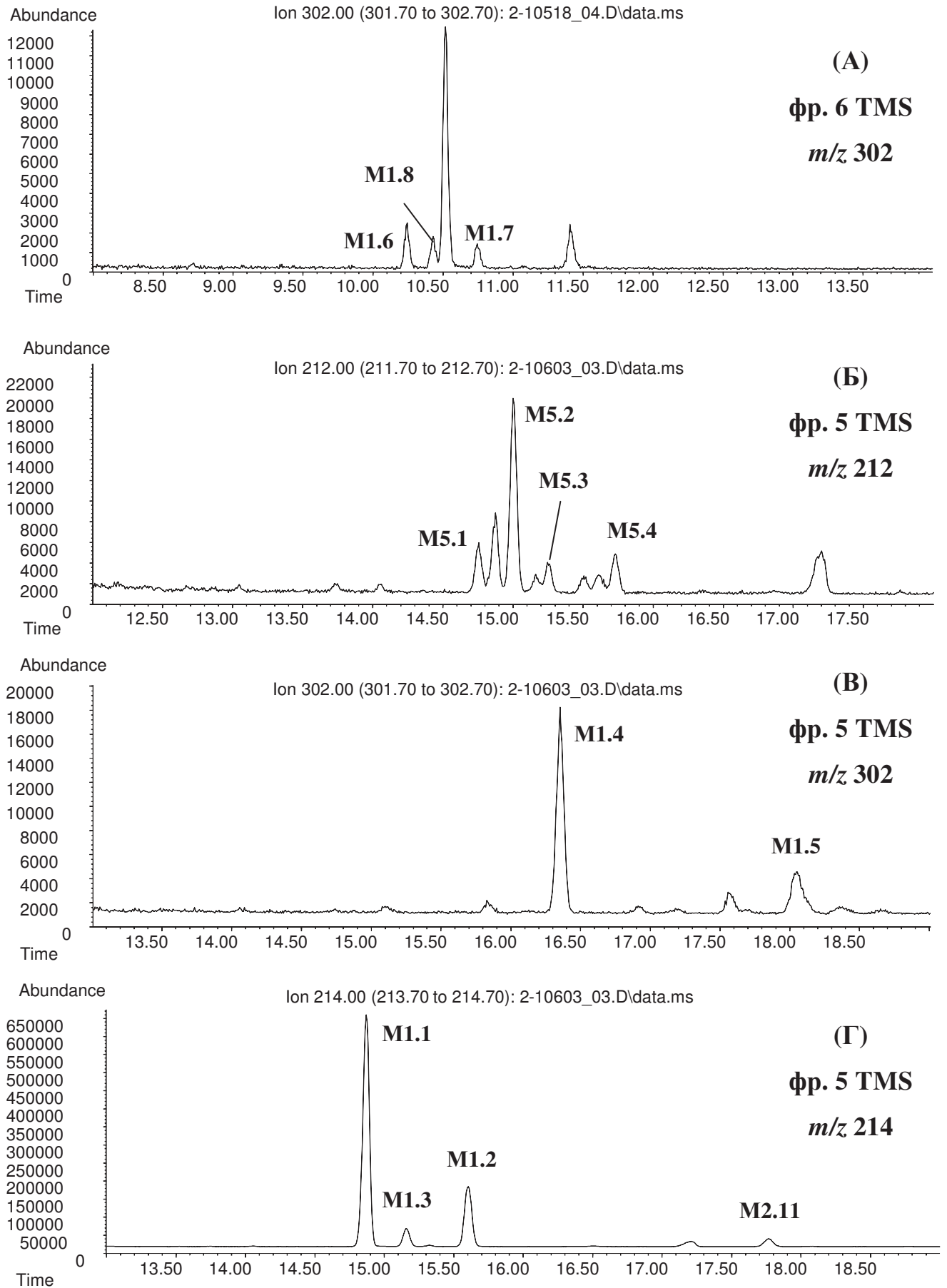


Рис. 5.16. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракций. Колонка VF-5ms, режим I (для фр. 6 колонка EVDX-5ms, режим III).

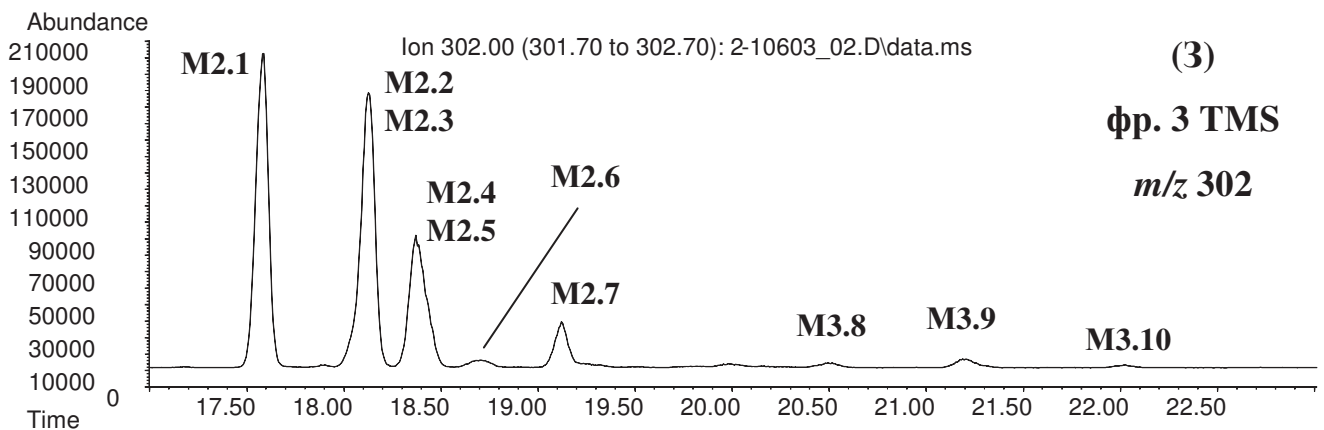
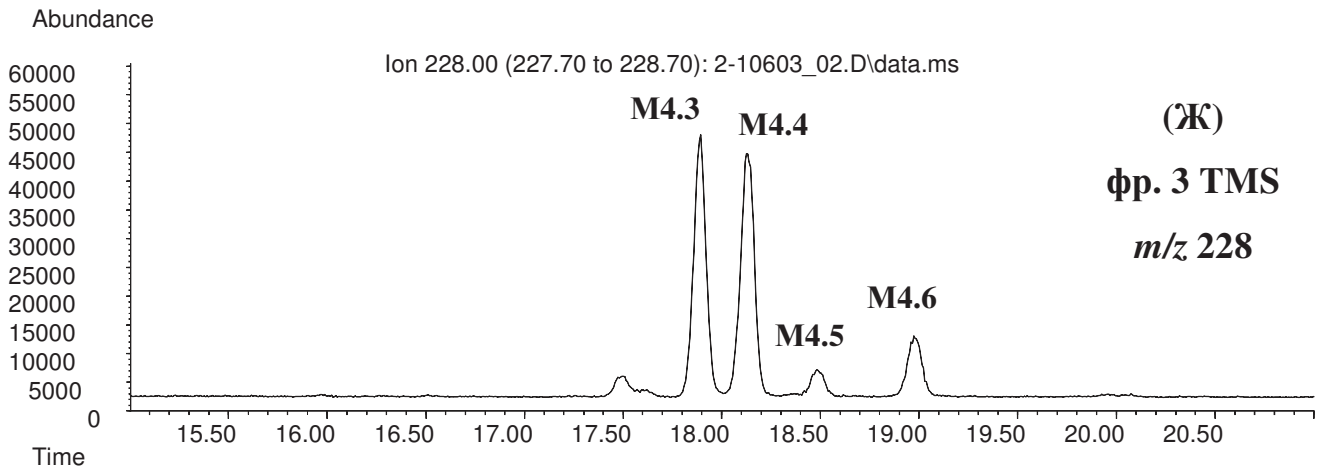
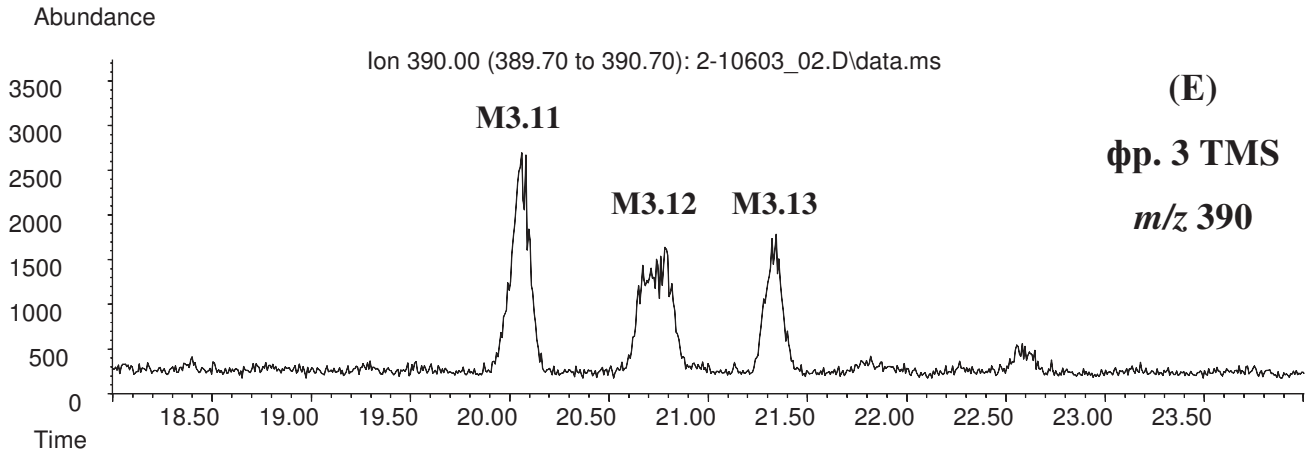
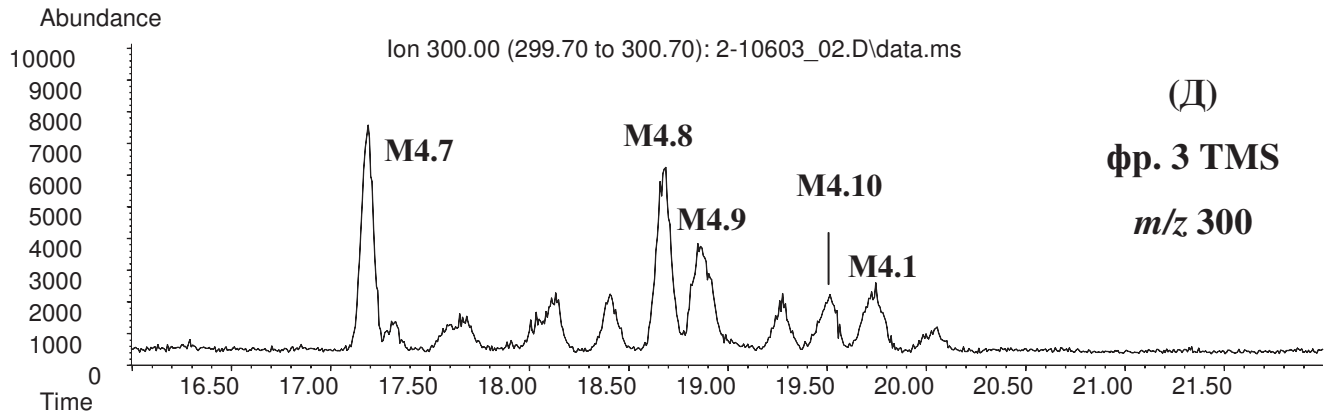


Рис. 5.16. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракций. Колонка VF-5ms, режим I (продолжение).

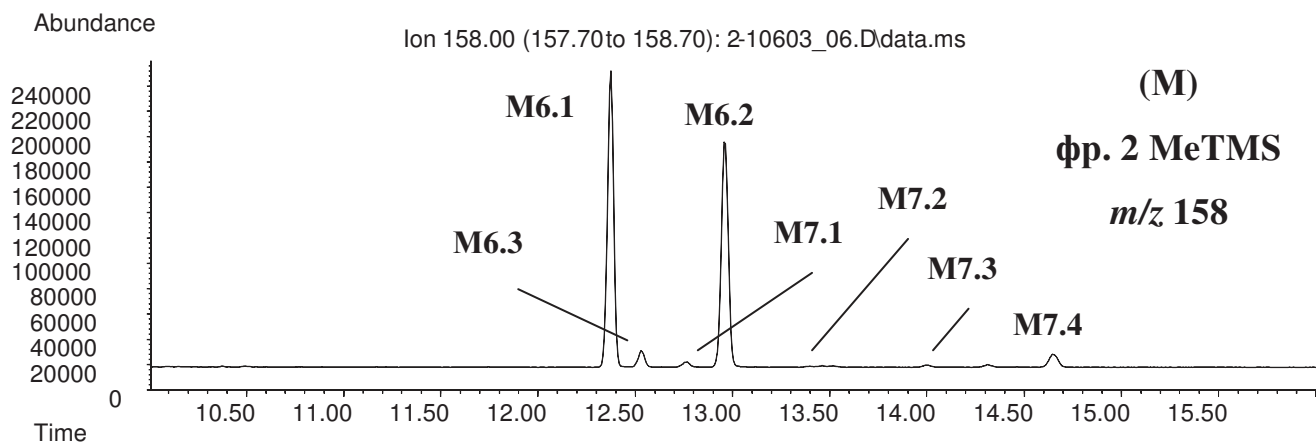
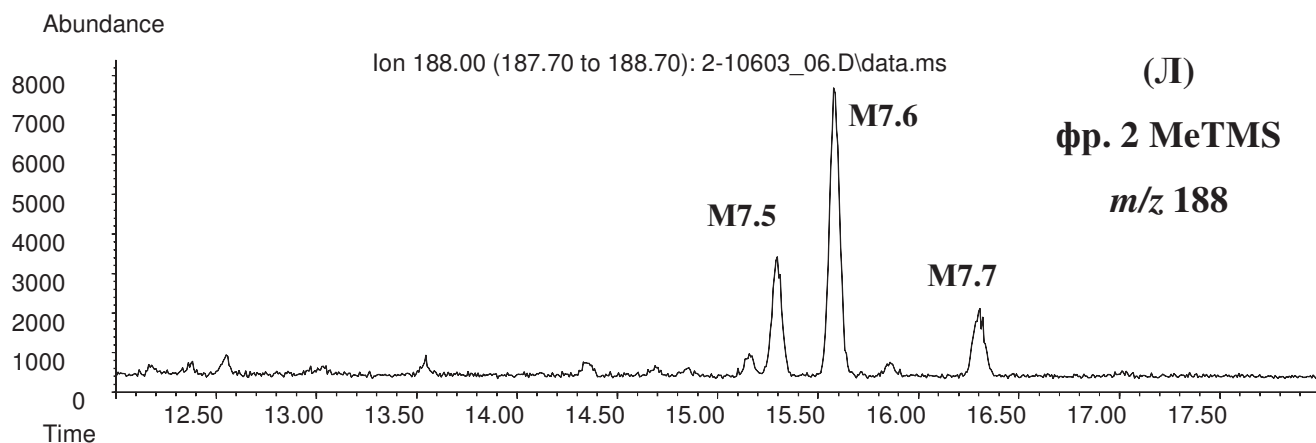
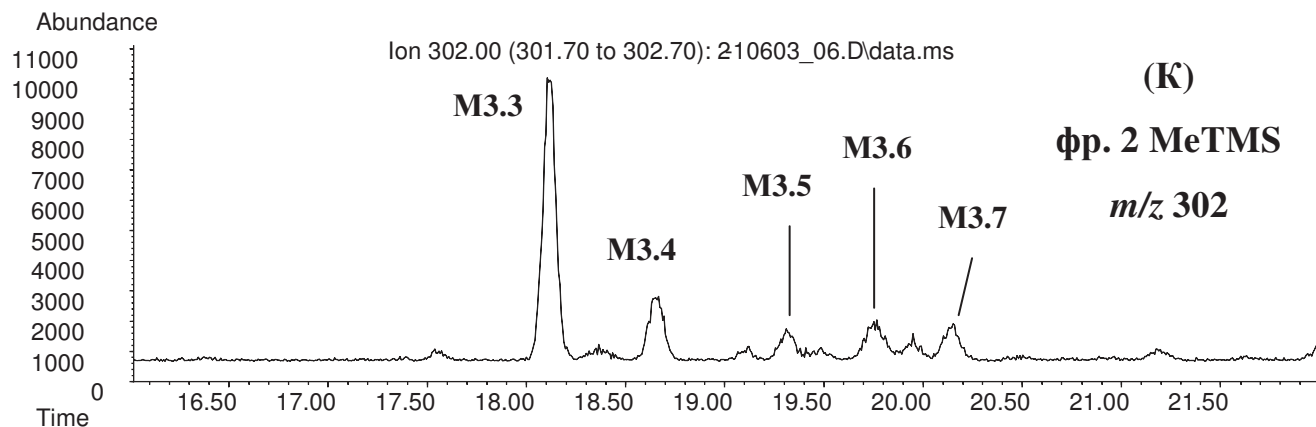
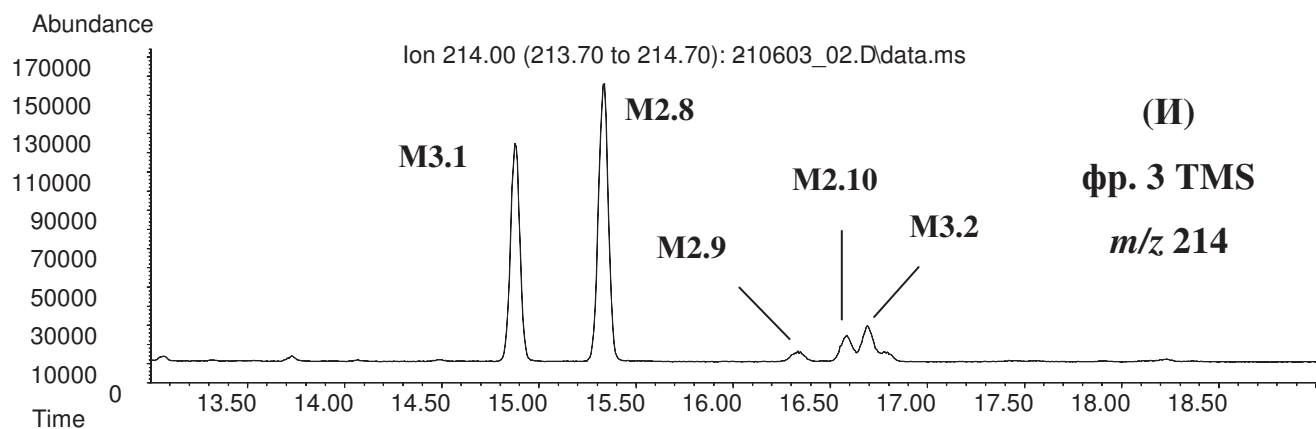


Рис. 5.16. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракций. Колонка VF-5ms, режим I (продолжение).

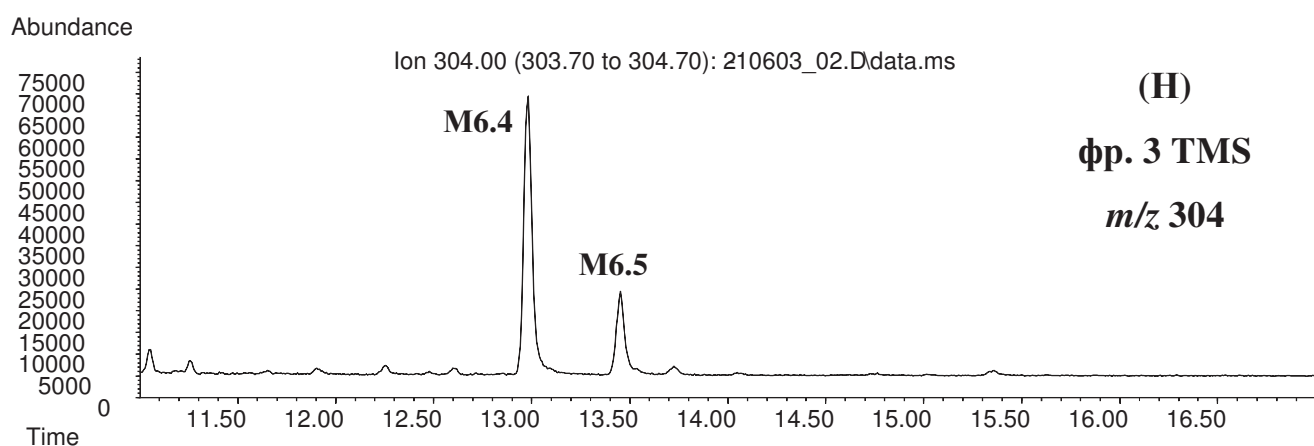


Рис. 5.16. ГХ-МС (ЭИ) хроматограммы ВЭЖХ фракций. Колонка VF-5ms, режим I (окончание).

Семь метаболитов (**M3.3-M3.9**) дигидроксилированы по адамантановому остатку и моногидроксилированы по боковой цепи. Их ЭР спектры имеют интенсивный пик иона, m/z 167, соответствующий дигидроксилированному адамантановому остатку; спектры, по крайней мере, части из них – продукт дегидратации боковой цепи, ион, m/z 186, Рисунок 5.18. Наиболее интенсивный пик в ЭИ спектрах **M3.3-M3.9** соответствует иону, m/z 302.

У метаболита **M3.10** также две гидроксильные группы локализованы на адамантановом остатке (и его ЭИ спектр, в целом, подобен **M3.3-M3.9**), но расположение третьей гидроксильной группы в пределах пентилиндольного остатка не определили из-за малой концентрации **M3.10**.

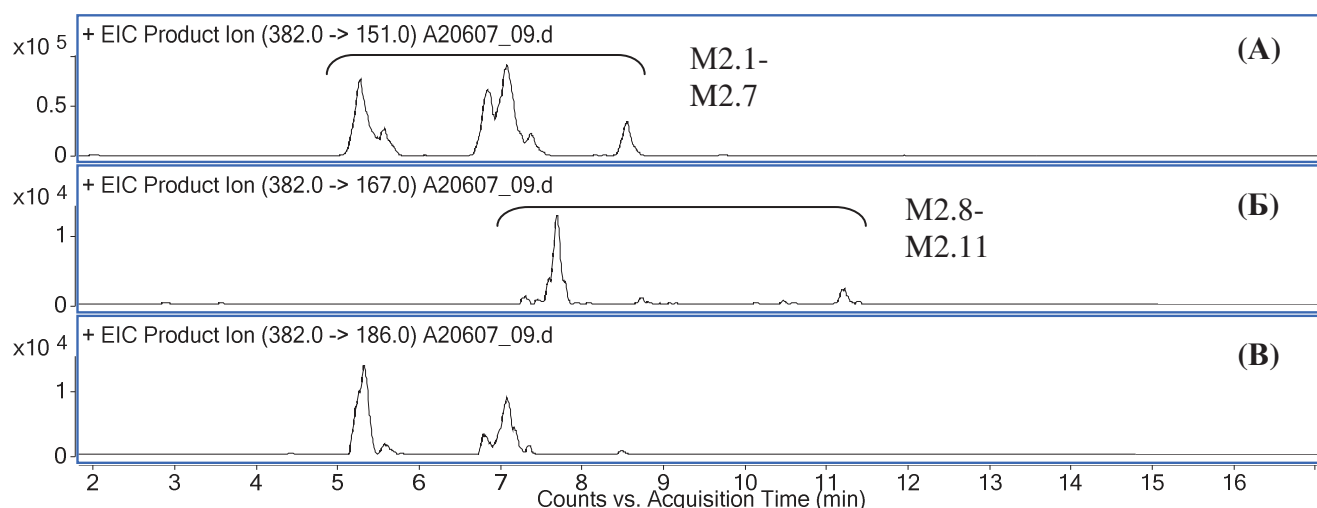


Рис. 5.17. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Дигидроксилированные метаболиты АВ-001 расположением гидроксильных групп на пентилиндольном и адамантановом остатках (А, В) и адамантановом (Б) остатках.

Три оставшихся метаболита группы (**M3.11-M3.13**) моногидроксилированы по адамантановому остатку, на что указывает наличие иона, m/z 151, в их ЭР спектрах. Наиболее интенсивный пик их ЭИ спектров (ион, m/z 390), указывает на наличие двух гидроксильных групп на пентилиндольном остатке. Наличие иона, m/z 381 (Рисунок 5.23), в ЭИ спектрах этих соединений позволяет детализировать расположение этих групп – обе они находятся на боковой цепи. Это предположение подтверждали метилированием.

Моногидроксилированные метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи M4.1-M4.6. Дигидроксилированные метаболиты с двойной связью на боковой цепи M4.7-M4.11. (M.w. = 379). Два метаболита с неизменным адамантановым остатком, **M4.1** и **M4.2**, наблюдали только методом ЖХ-МС/МС из-за малого содержания (Рисунок 5.19) и по этой причине детализация их структур затруднительна. Однако, ЖХ удерживание **M4.1** (см. выше) позволяет предположить, что это соединение является продуктом карбоксилирования АВ-001.

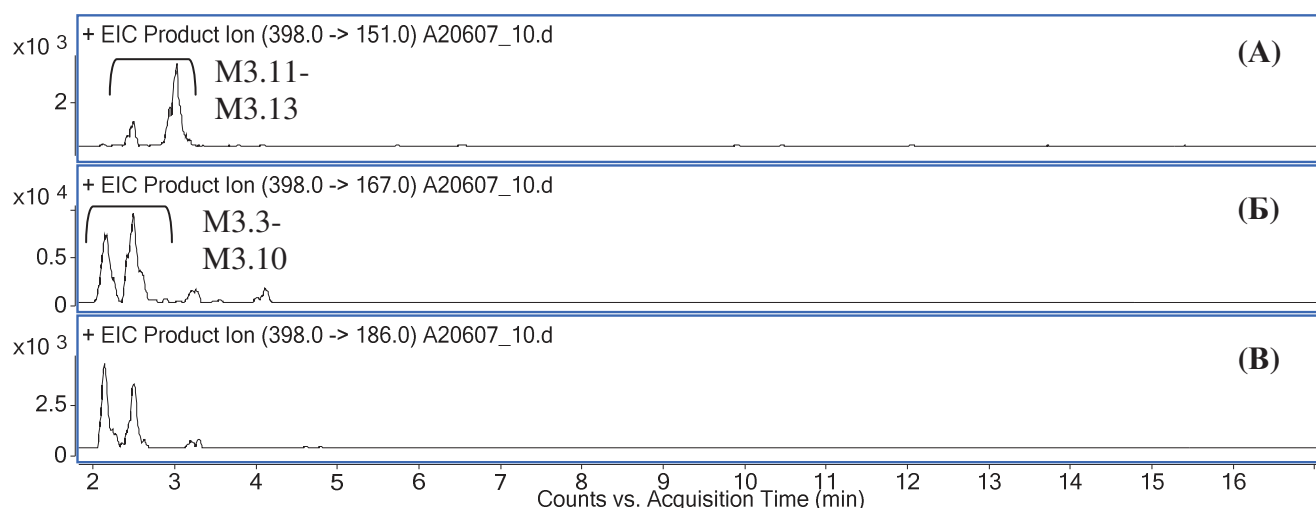


Рис. 5.18. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Тригидроксилированные метаболиты АВ-001 расположением одной (А) и двух (Б, В) гидроксильных групп на адамантановом остатке.

Метаболиты **M4.3-M4.6** гидроксилированы по адамантановому остатку и имеют карбонильную группу на боковой цепи, на что указывает существование пиков ионов, m/z 151 (моногидроксилированный адамантановый остаток) и 85 (оксопентилиум) в ЭР спектрах. ЭИ спектры **M4.3-M4.6** характеризуются наличием интенсивного пика иона, m/z 228, соответствующего оксометилпентилиндольному остатку с карбонильной группой.

Пять метаболитов, гидроксилированных по адамантановому остатку и боковой цепи, имеющей двойную связь (**M4.7-M4.11**) изобарны **M4.1-M4.6**. Эти соединения наблюдали только методом ГХ-МС в той же ВЭЖХ фракции (3), что и остальные метаболиты данной массовой группы. Отсутствие во фракции 3 метаболитов, дигидроксилированных по

пентилиндольному остатку не позволяет предположить их возможную дегидратацию и, следовательно, артефактную природу **M4.7-M4.11**. Возможно, затруднения, возникшие при обнаружении этих соединений методом ЖХ-МС/МС связаны с их соэлюированием с другими метаболитами группы. В ЭИ спектрах **M4.7-M4.11** присутствует интенсивный пик иона, m/z 300, соответствующий моногидроксилированному (TMS) оксометилпентилиндольному остатку с двойной связью на боковой цепи и пик иона, m/z 380, указывающий на моногидроксилирование адамантоилиндольного остатка (Рисунки 5.23, 5.24). Возможность образования кратной связи на алифатическом остатке подтверждается работой [289] и рассмотрена далее.

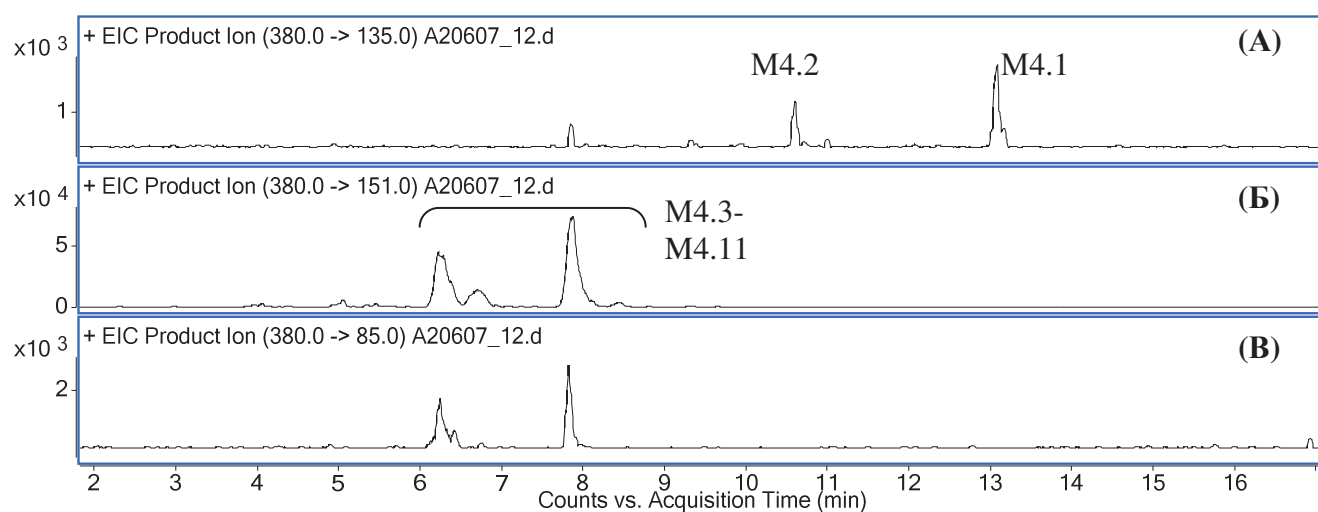


Рис. 5.19. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи и гидроксильной группой на пентилиндольном (А) и адамантановом (Б, В) остатках.

Моногидроксилированные метаболиты с двойной связью на боковой цепи M5.1-M5.5 (M.w. = 363). Существование этих метаболитов подтверждено как методом ГХ-МС (Рисунок 5.16Б, кроме **M5.5**), так и ЖХ-МС/МС (Рисунок 5.20).

Кроме иона, m/z 151 (моногидроксилированный адамантановый остаток), в ЭР спектрах по крайней мере, некоторых из **M5.1-M5.4** присутствует ион, m/z 186, указывающий на существование двойной связи на боковой цепи оксопентилиндольного остатка. Наличие иона, m/z 212, в ЭИ спектрах этих соединений подтверждает эту особенность (Рисунок 5.24).

Метаболит **M5.5** наблюдали только методом ЖХ-МС/МС, и предположения относительно его структуры (кроме присутствия пика иона, m/z 135) основаны на наличии пика иона, m/z 184 в его ЭР спектре, указывающего на существование фрагмента с двумя двойными связями на боковой цепи, причем одна из них образовалась в результате дегидратации в путях масс-спектрометра.

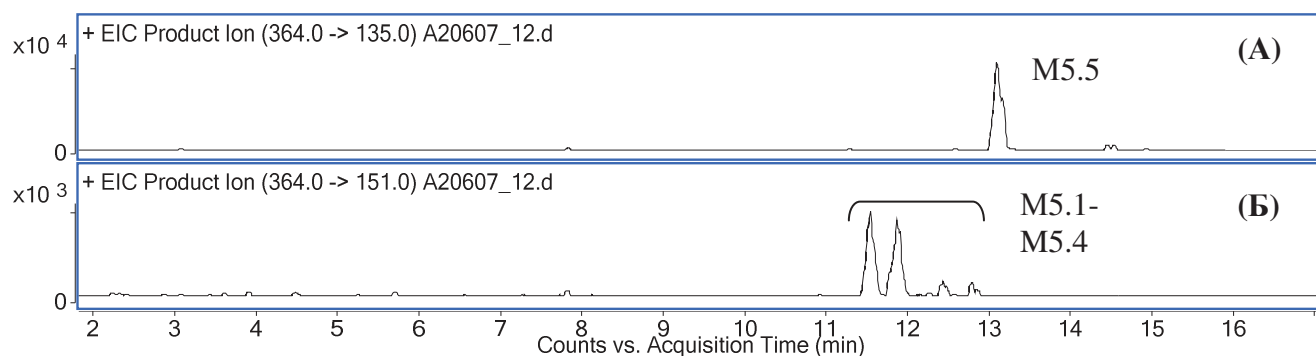


Рис. 5.20. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Метаболиты с двойной связью на боковой цепи, гидроксированные по боковой цепи (А) и адамантановому остатку (Б).

N-дезалкилированные моногидроксированные метаболиты **M6.1-M6.5**. (M.w. = 295). ЭР спектры трех метаболитов, **M6.1-M6.3**, содержат пики ионов, m/z 151 и 188 или 144, что указывает на моногидроксирование адамантанового остатка. ЭИ спектры этих соединений (derivatization метилированием и триметилсилилированием, Рисунок 5.23) содержат пики ионов, m/z 158 (метилированный индольный остаток) и 223 (гидроксированный, TMS, адамантановый остаток). Хроматографические пики **M6.1-M6.3** весьма интенсивны как для метода ГХ-МС, так и ЖХ-МС/МС (Рисунки 5.15 и 5.21, соответственно). Тем не менее, использование этих соединений для аналитических заключений нецелесообразно по причинам малого удерживания и, следовательно, значительных матричных влияний (ЖХ-МС/МС), усложненной дериватизации (ГХ-МС) и существенного снижения информативности вследствие отсутствия важного структурного фрагмента – боковой цепи.

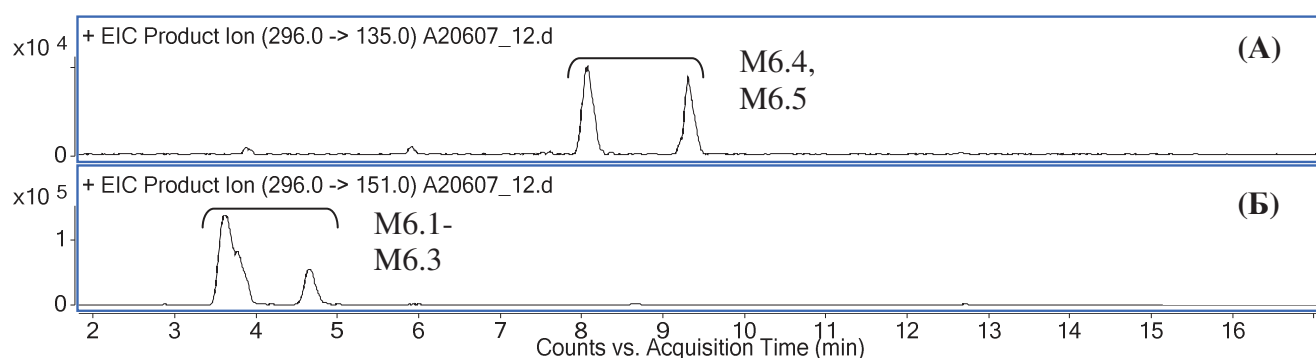


Рис. 5.21. ЖХ-МС/МС (ЭР) хроматограммы образца мочи человека, ферментативный гидролиз. Дезалкилированные метаболиты с гидроксильной группой на индольном (А) и адамантановом (Б) остатках.

Два оставшихся метаболита (**M6.4** и **M6.5**) гидроксированы по индольному остатку. Их ЭР спектры малоинформативны и содержат только один пик иона m/z 135. ЭИ спектры

(TMS) включают интенсивный пик иона, m/z 304. Эти характеристики позволяют сделать уверенное заключение о гидроксировании индольного остатка.

N-деалкилированные дигидроксированные метаболиты **M7.1-M7.7** (M.w. = 311). Метаболиты этой группы наблюдали только методом ГХ-МС (Рисунки 5.16Л и М) из-за малого удерживания в применяемых условиях ЖХ-МС/МС; однако, выявление **M7.1-M7.7** можно считать вполне достоверным. ЭИ спектры метилированных и триметилсилилированных **M7.1-M7.4** имеют интенсивный пик иона, m/z 158 (метилированный индольный остаток), а **M7.5-M7.7** – m/z 188, соответствующий диметилированному гидроксированному индольному остатку (см. выше).

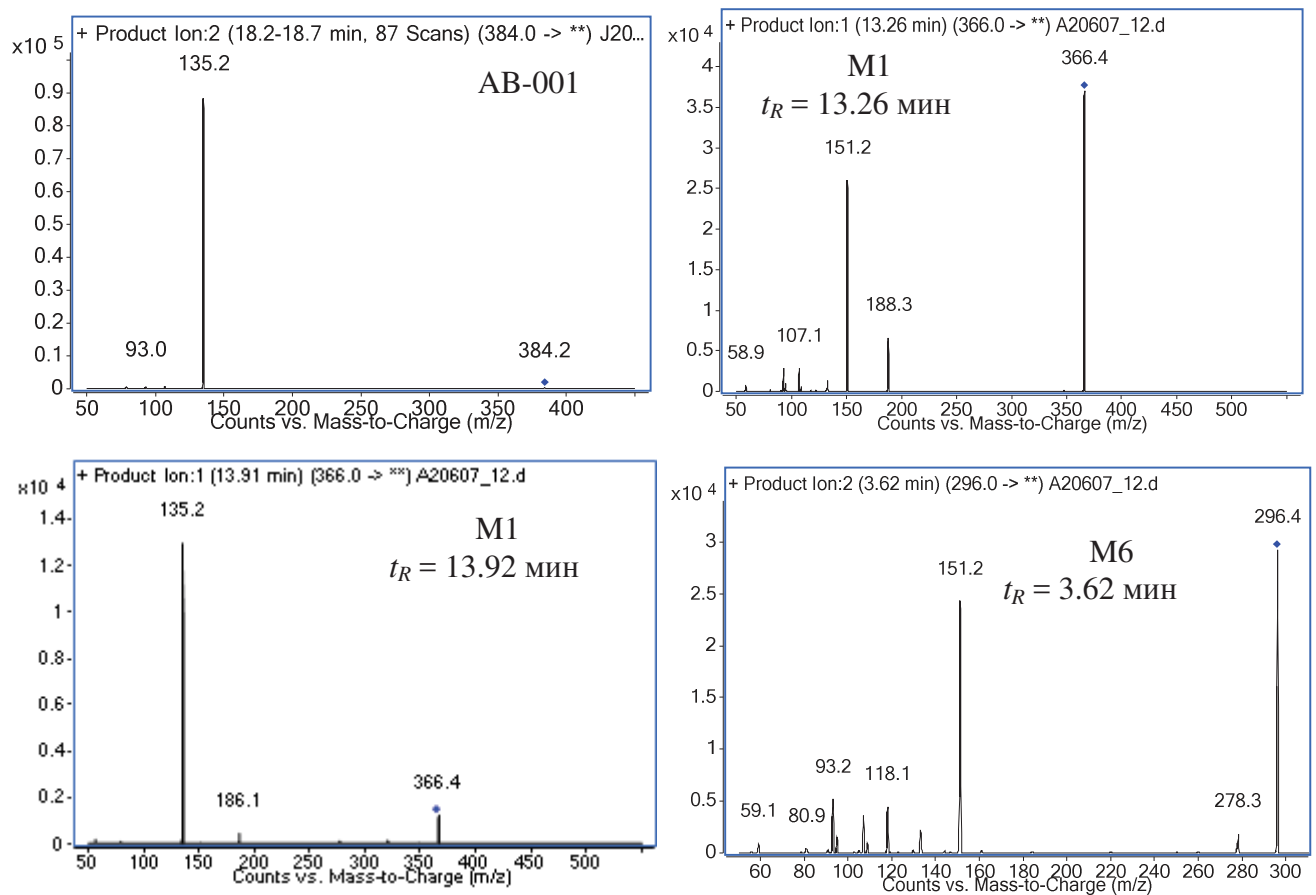


Рис. 5.22. Масс-спектры (ЖХ-МС/МС, ЭР) АВ-001 и его метаболитов.

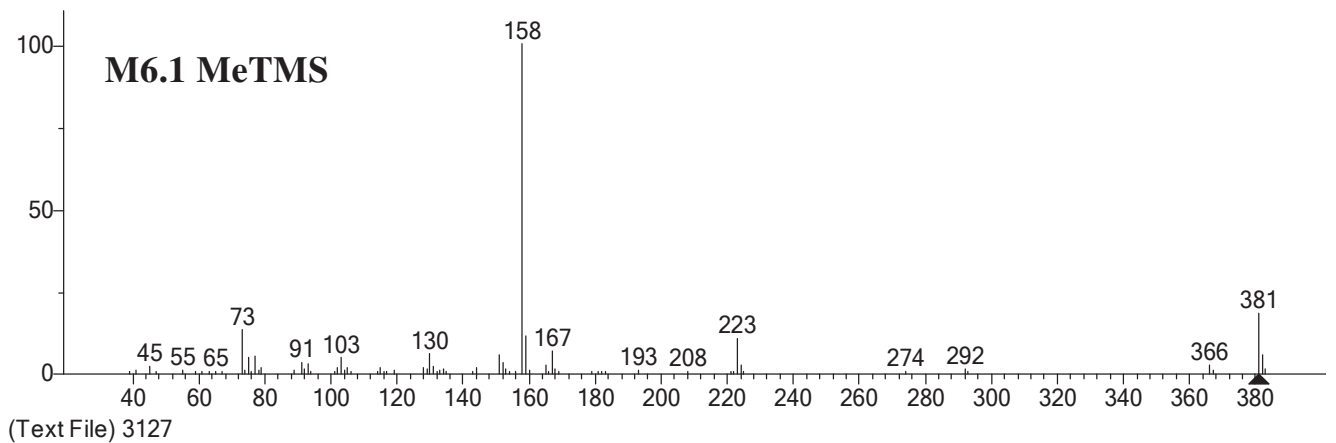
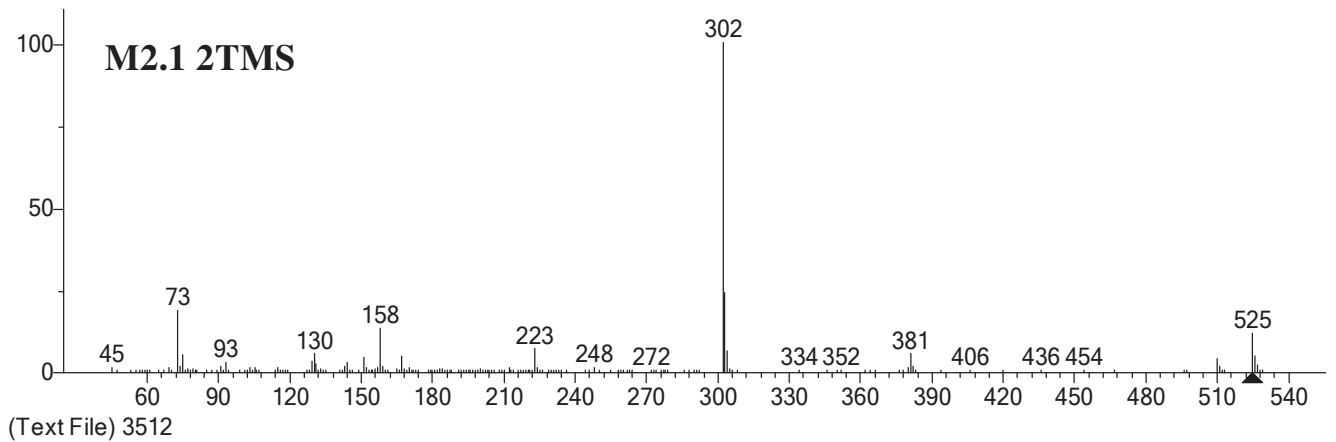
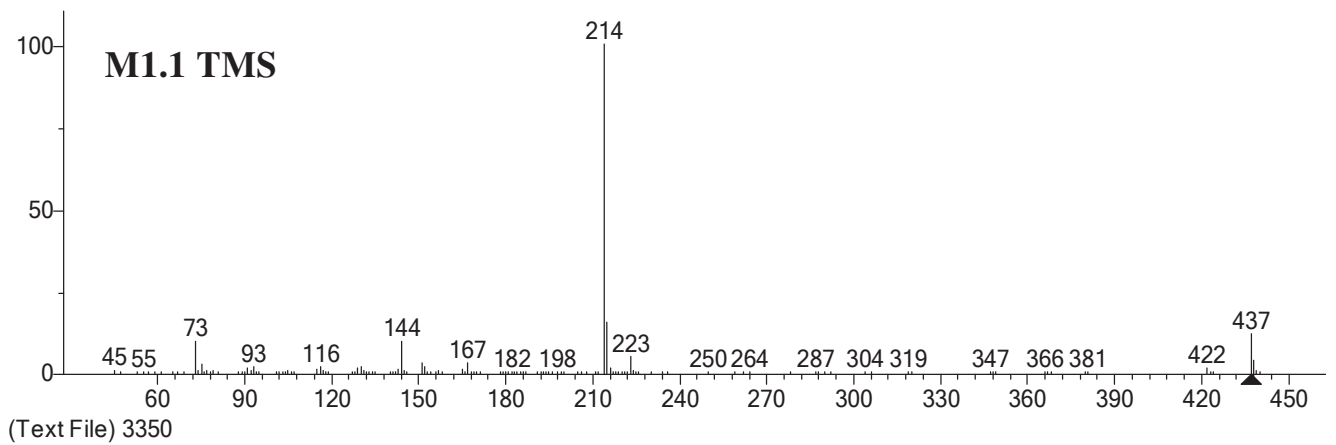
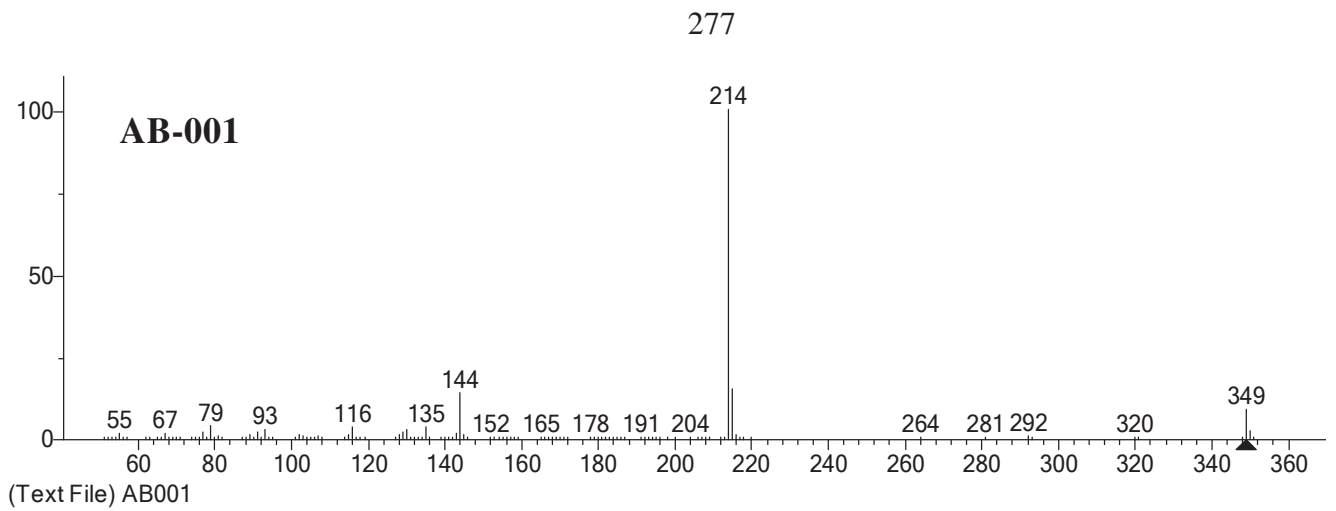


Рис. 5.23. Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) АВ-001 и его метаболитов.

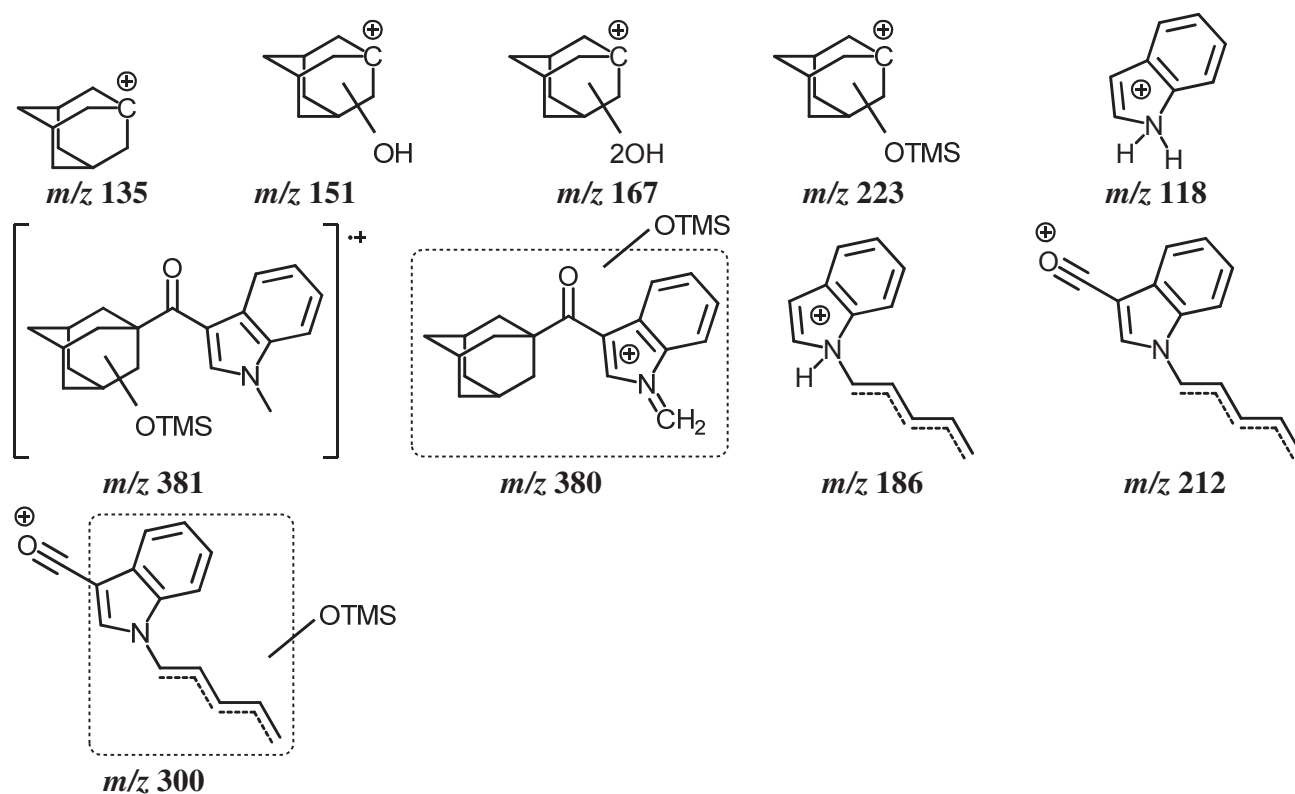


Рис. 5.24. Предполагаемая фрагментация и величины m/z АВ-001 и его метаболитов.

Полуколичественные измерения. Экскрецию метаболитов АВ-001 исследовали наблюдением за метаболитами моно-, ди-, тригидроксилированной и дезалкилированной с моногидроксилированием групп. Диаграммы экскреции метаболитов АВ-001 приведены на Рисунке 5.25 и выглядят вполне типовыми для большинства каннабимиметиков. Максимальную концентрацию метаболитов в моче наблюдали после 7 и 4 часов от времени перорального приема каннабимиметика. При курении (Рисунок 5.25В) метаболиты АВ-001 обнаружили уже после 2 ч.; резкий спад концентрации при 3 ч. объясняется значительным объемом мочи. Максимальную концентрацию метаболитов в этом случае наблюдали в образце, собранном через 6 ч. после курения, хотя это значение следует признать ориентировочным. Присутствие метаболитов **M1.1** и **M2.1** в моче отмечали в течение 166, 113 и 165 ч. для случаев *C1*, *C2* и *C3*, соответственно.

Диаграммы экскреции были получены посредством анализа образцов мочи после кислотного деконъюгирования и с использованием внутреннего стандарта папаверина с помощью метода, описанного выше. Для определения гидроксилированных метаболитов образцы дериватизировали TMS, для дезалкилированных – метилированием с последующим TMS. Количественной характеристикой послужили площади пиков ион-хроматограмм для ионов, соответствующих наиболее интенсивным пикам в спектрах (m/z 214 для **M1.1**, **M1.3** и **M3.1**; m/z 302 для **M2.1**; m/z 158 для **M6.1**). Анализ проводили методом ГХ-МС, режим SIM.

Опубликованные печатные работы и доклады по теме подраздела: [348, 349].

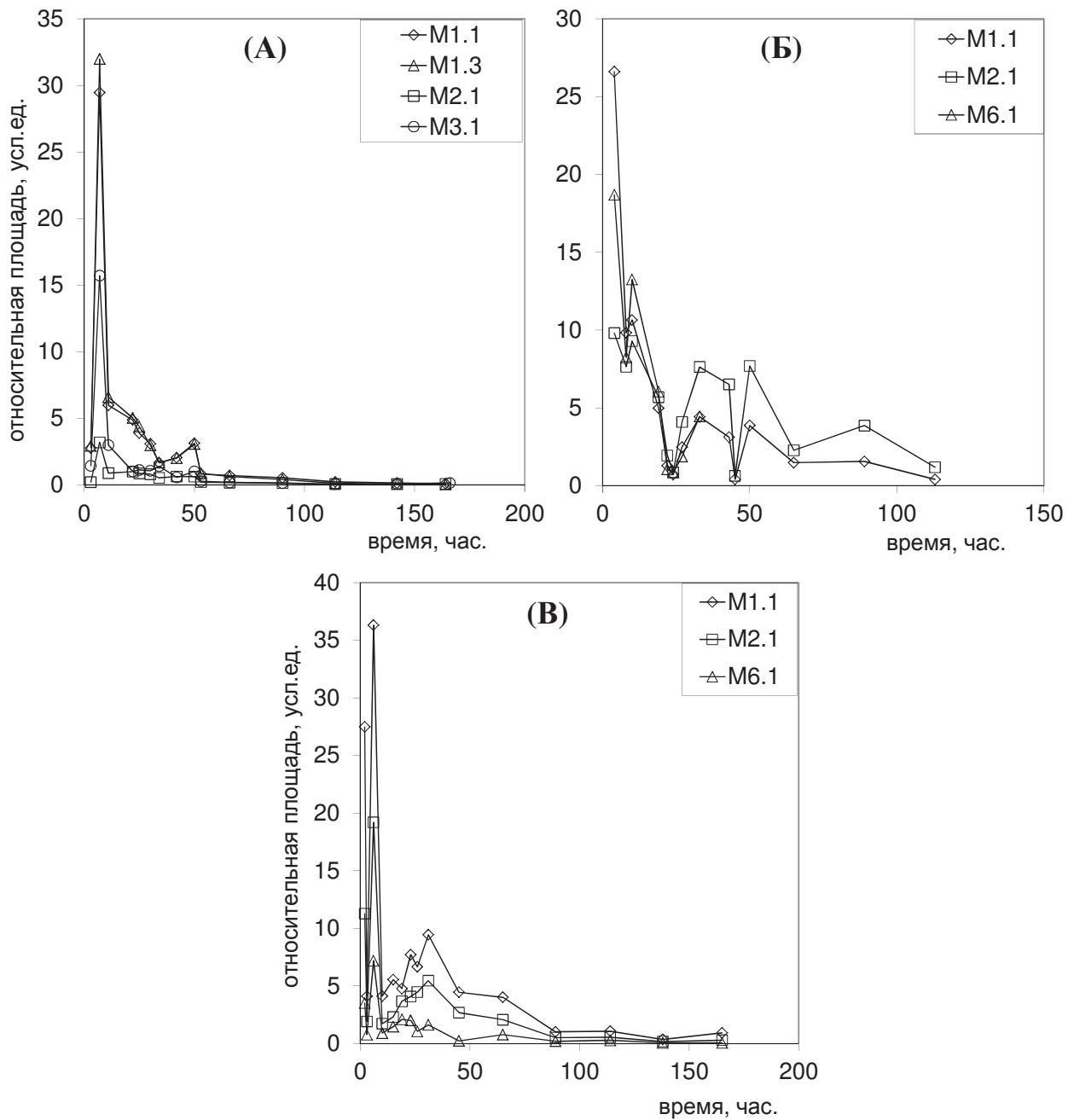


Рис. 5.25. Экскреция метаболитов АВ-001 с мочой, случаи *C1* и *C2* после перорального приема (А) и (Б), соответственно и случая *C3* после ингаляционного приема (В).

5.4. Выявление метаболитов АКВ-48 и АКВ-48F

В отличие от всех соединений, рассмотренных в предыдущих главах, АКВ-48 (APINACA) и АКВ-48F [219] являются производными не 3-ацилиндола, а индазола-3-карбоксамиды (Рисунок 5.26), что позволяет причислить их к принципиально новому классу распространяемых каннабимиметиков.

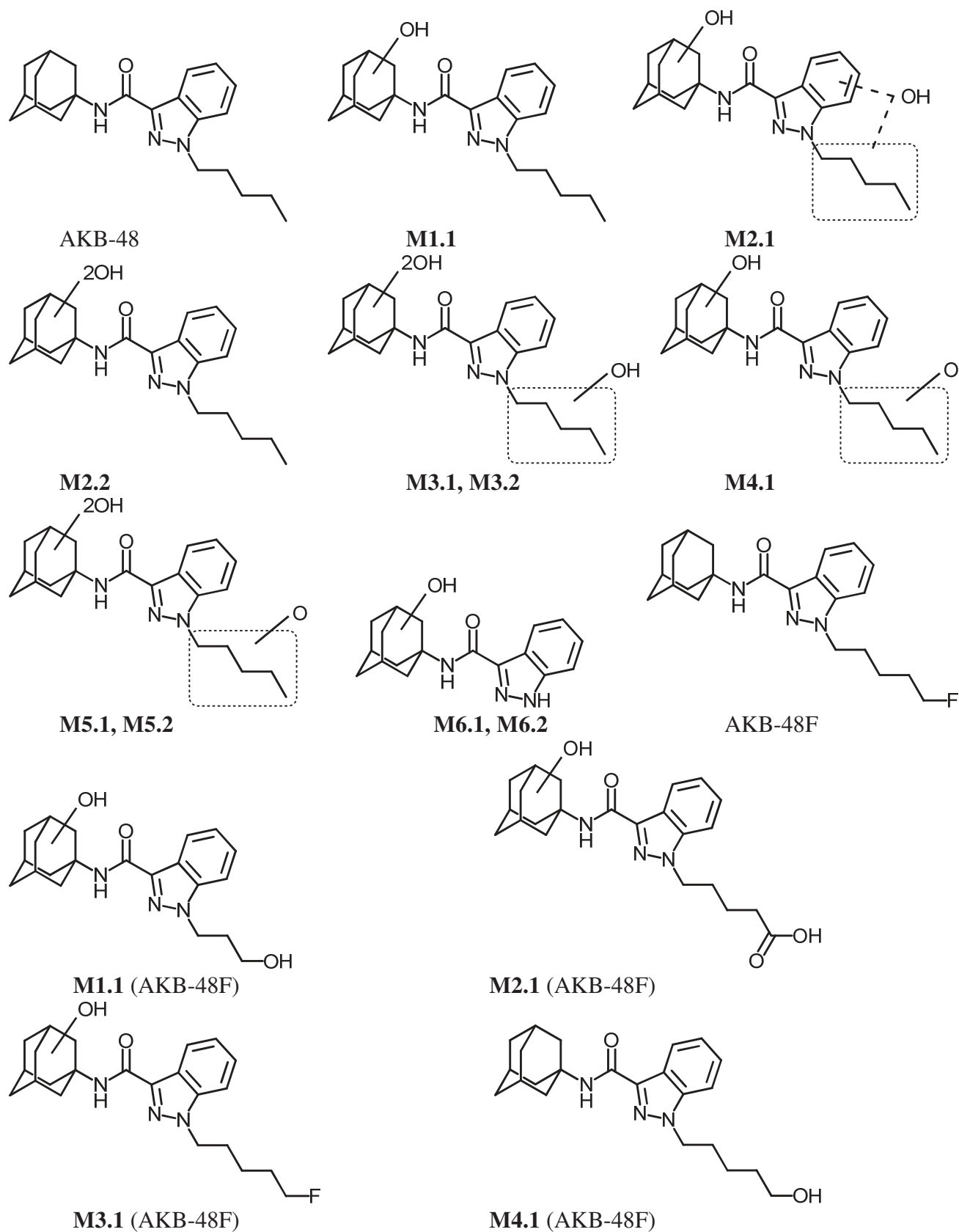


Рис. 5.26. Структуры АKB-48, АKB-48F и их метаболитов.

Авторство этих соединений, равно как и их аффинность к рецептору CB1 неизвестны, хотя их каннабимиметическая активность может считаться доказанной, благодаря

распространенности в ряде стран мира (включая Россию) и формируемым психогенным эффектам.

Работы по данной тематике не закончены, тем не менее, предлагаемые структуры метаболитов основаны на результатах, полученных методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС, включая регистрацию МСВР. Материалом для исследования послужили образцы мочи людей, куривших смеси с добавками АКВ-48 или АКВ-48F. Всего охарактеризовали 12 соединений, из них 2 – метаболиты АКВ-48F.

Для АКВ-48 основным мочевым метаболитом был найден продукт моногидроксилирования (M1.1, Рисунок 5.27), хотя выявлены также ди- и тригидроксилированные, продукты, метаболиты с карбонильной группой на боковой цепи и дезалкилированные гидроксилированные структуры.

Мочевой метаболический профиль АКВ-48F подобен AM-694: основным направлением метаболизма в данном случае, является окислительное дефторирование.

Доклады, сделанные по теме подраздела: [346, 350].

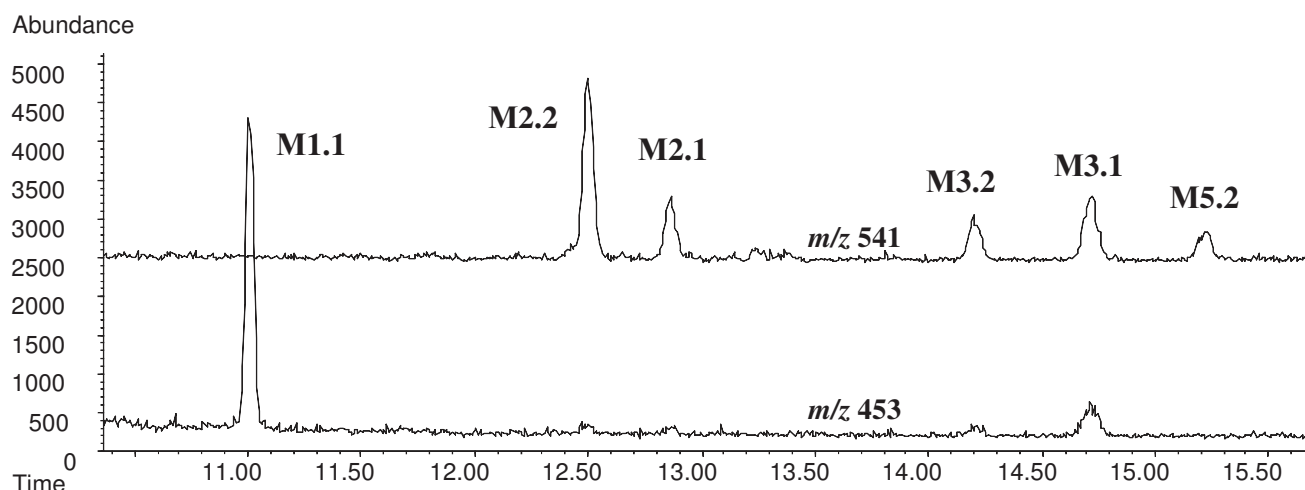


Рис. 5.27. ГХ-МС (ЭИ) хроматограмма образца мочи. Метаболиты АКВ-48.

5.5. Определение CP47,497(C8) в моче

CP47,497(C8) является одним из первых каннабимиметических соединений, найденных в курительных смесях [188, 189, 210, 352]. Синтезированный в 1979 г в лабораториях Pfizer Inc, CP47,497(C8) характеризуется высокой аффинностью к рецептору CB1 ($K_i=4.7$ нМ). Это значение было получено при использовании синтетической смеси энантиомеров. Являясь циклогексилфенольным производным, CP47,497(C8), Рисунок 5.28, имеет некоторое структурное сходство с ТГК. CP47,497(C8), экстрагированный из курительных смесей хроматографируется в виде двух сигналов (соответствующих диастереомерам [210]), причем

содержание *cis*-формы, как правило, значительно выше, чем *trans*-. Опубликовано исследование метаболизма CP47,497(C8) *in vitro* [353], тем не менее это соединение было найдено в образцах мочи и в неизменном состоянии методом ГХ-МС. 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, содержащие CP47,497(C8). Поиск метаболитов этого соединения не проводили. Было показано, что в образцах мочи CP47,497(C8) почти не конъюгирован, и 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% при $S_r, \% = 3\%$.

Опубликованные работы и доклады по теме подраздела: [281, 354].

5.6. Краткие методические замечания по главе

В Таблице 5.8 приведены общие аналитические условия для обнаружения метаболитов синтетических каннабимиметиков, рассмотренных в данной Главе. Для метода ГХ-МС указаны режимы элюирования при использовании слабополярных фаз и рекомендуемые способы дериватизации. Частные условия проведения каждой стадии анализа указаны в соответствующих подразделах и Приложении 1. Пробоподготовка включает ЖЖЭ основных растворов.

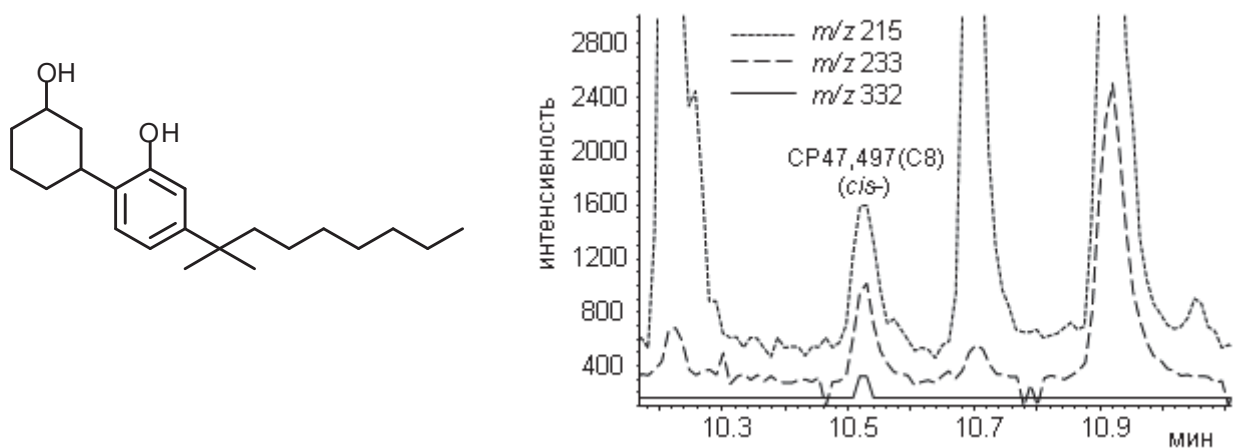


Рис. 5.28. Структура CP47,497(C8). Хроматограмма (ГХ-МС, EIC) неизменного CP47,497(C8) в моче человека.

Таблица 5.8. Аналитические условия для обнаружения метаболитов синтетических каннабимиметиков нафтоиндольной, фененилацетилиндольной и бензоиндольной групп, а также неметаболизированного CP47,497(C8).

Каннаби-миметик	Метод деконъюг.	Метод анализа (режим)	Дериватизация		Детектируемые соединения	
			Предпочтительная	Возможная	Основные	Дополнительные
UR-144	К	ГХ-МС (I, II)	TMS	-	M10.2-H₂O	M/A5-H₂O M/A6-H₂O
UR-144	Ф	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.2	M1.3
AB-001	Ф, К	ГХ-МС (I, III)	TMS	-	M1.1	M1.2, M2.1
AB-001	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M1.1	M1.2
AKB-48	Ф, К	ГХ-МС (III)	TMS	-	M1.1	M2.1
AKB-48	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M2.1	M3.1
AKB-48F	Ф, К	ГХ-МС (III)	TMS	-	M2.1	-
AKB-48F	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	M2.1	-
CP47,497 (C8)	Ф, К	ЖХ-МС/МС	-	-	исходное соединение	-

Примечание. Ф, К – ферментативный и кислотный методы деконъюгирования

Заключение

Все соединения, рассмотренные в данной главе (кроме CP47,497(C8)), не были обнаружены в моче в исходном состоянии из-за полного метаболизма.

Соединения, попадающие в организм курильщика, могут быть модифицированы в результате термолита и, следовательно, образовывать модифицированные метаболиты. В результате термолита тройной цикл UR-144 раскрывается с образованием непредельного алифатического остатка, причем как сам UR-144, так и продукт его термолита легко гидратируются, образуя единый продукт. Поскольку степень термолита UR-144 определяется его условиями, то в моче необходимо определять метаболиты по крайней мере, двух соединений: самого UR-144 и продукта термолита. Основными метаболитами этих соединений являются моногидроксилированные структуры, причем гидроксильные группы локализована на алифатических остатках. Ввиду легкой гидратируемости, действительные метаболиты UR-144 и его производных могут быть обнаружены в моче только после ферментативного деконъюгирования. Тем не менее, после кислотного деконъюгирования обнаруживали соответствующие артефакты, достаточно полно характеризующие исходное соединение.

Остальные соединения, рассмотренные в данной Главе, характеризуются достаточной химической и термической стабильностью, и для подготовки мочевых проб применимо кислотное деконъюгирование.

Основные метаболиты адамантоильного каннабимиметика AB-001 представляют собой ди- и тригидроксилированные структуры вследствие значительной гидрофобности исходного соединения. Эти формы наиболее удобны для обнаружения как методом ГХ-МС, так и ЖХ-

МС/МС. Дезалкилирование АВ-001 также является важным путем его метаболизма, хотя обнаружение дезалкилированных метаболитов не позволяет с достаточной уверенностью определить исходное соединение.

Метаболизм индазолкарбоксамидных производных (АКВ-48 и АКВ-48F) почти полностью подобен метаболизму большинства оксометилиндольных синтетических каннабимиметиков: при наличии незамещенной N-пентильной цепи происходит ее гидроксильное, а при наличии атома фтора на ее метильном конце – окислительное дефторирование (подобно АМ-694). Таким образом, в качестве возможных биомаркеров АКВ-48 наиболее удобны моногидроксильные метаболиты, а АКВ-48F – карбоксильный.

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 деградации дрогаверина, 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. Моногидроксилированные метаболиты JWH-018 были найдены также в сыворотке крови людей. При лабораторном исследовании биожидкостей для JWH-018 и JWH-073 предложен поиск моногидроксилированных метаболитов, а также артефактов пробоподготовки, образующиеся из дигидродиольных форм; для JWH-210 – ди- или тригидроксилированных 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 моногидроксилированных и карбоксилированных 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 метаболитическими формами для RCS-4 являются О-дезметилированные производные, для AM-694 – продукты окислительного дефторирования, для AM-2233 – N-дезметилирования. 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 индazoleных 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 СР47,497(С8), 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 (ГБУЗ «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», Кировское областное ГБУЗ «Кировский областной наркологический диспансер», ОБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» комитета здравоохранения Курской области, ГБУЗ Ямало-Ненецкого автономного округа «Новоуренгойский психоневрологический диспансер», ГБУЗ «Наркологический диспансер Псковской области»).

Список литературы

1. Bogusz M.J. Quality assurance aspects of identification with chromatographic – mass spectrometric methods // *Problems of Forensic Sciences*. 2009. V. 77. P. 7-28.
2. De Zeeuw R.A., Franke J.P. General unknown analysis. In: *Forensic Science. Hand book of analytical separations*, vol. 2. Ed. by M.J. Bogusz. Amsterdam, Netherland: Elsevier Science. 2000.
3. Guidance for industry, Mass spectrometry for confirmation of the identity of animal drug residue. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, May 1, 2003.
4. EU Commission, Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results // *Official Journal of the European Communities*. 2002. V. L 221. P. 8-34.
5. College of American Pathologists, Commission on Laboratory Accreditation, Laboratory Accreditation Program // *Chemistry and Toxicology Checklist*. 2006. P. 57-59.
6. Identification criteria for qualitative assays incorporating column chromatography and mass spectrometry, WADA Technical Document – TD2010IDCR. Accessed from: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf (September, 2012).
7. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Marketing Service, Science & Technology. Pesticide data program. January 1, 2007 Accessed from: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC506150> (October, 2013).
8. Lehotay S.J., Mastovska K., Amirav A., Fialkov A.B., Alon T., Martos P.A., de Kok A., Fernández-Alba A.R. Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques // *Trend Analyt. Chem.* 2008. V. 27. P. 1070-1090.
9. Milman B.L., Identification of chemical compounds. *Trend Analyt. Chem.* 2005. V. 24. P. 493-508.
10. De Zeeuw R.A. Substance identification: The weak link in analytical toxicology // *J. Chromatogr. B*. 2004. V. 811. P. 3-12.
11. Meyer M.R., Peters F.T., Maurer H.H. Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System for GC-MS Screening for Drugs, Poisons, and Metabolites in Urine // *Clinical Chemistry*. 2010. V. 56. P. 575-584.
12. Stein S.E. An Integrated Method for Spectrum Extraction and Compound Identification from GC/MS Data // National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA. 30 p

13. Stein S.E.; Scott D.R. Optimization and Testing of Mass Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification // *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* 1994. V. 5. P. 859-866.
14. Thevis M., Thomas A., Pop V., Schänzer W. Ultrahigh pressure liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1292. P. 38-50.
15. Meyer M.R., Maurer H.H. Current status of hyphenated mass spectrometry in studies of the metabolism of drugs of abuse, including doping agents // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 195-208.
16. Wissenbach D.K., Meyer M.R., Remane D., Philipp A.A., Weber A.A., Maurer H.H. Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MSⁿ screening concept // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 40. P. 3481-3489.
17. Meyer M.R., Maurer H.H. Current applications of high-resolution mass spectrometry in drug metabolism studies // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 403. P. 1221-1231.
18. Liang Y., Wang G., Xie L., Sheng L. Recent Development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Emerging Technologies for Metabolite Identification // *Curr. Drug Metab.* 2011. V. 12. P. 329-344.
19. A Textbook of Modern Toxicology; Ed. E. Hodgson. Hoboken, USA: John Wiley & Sons Inc., 2004. 557 p.
20. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия: учебник. М.: МЕДпресс-информ, 2009. 400 с.
21. Руководство по судебно-медицинской экспертизе отравлений. Под ред. Я.С. Смусина, Р.Б. Бережного, В.В. Томилина, П.П. Ширинского М.: Медицина, 1980. 421 с.
22. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов. Под ред. Н.И. Калетиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 1008 с.
23. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. Киев: Выща шк. 1989. 447 с.
24. Токсикологическая химия: учебник для вузов. Под ред. Плетневой Т.В. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 512 с.
25. Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design; Ed. D.A. Smith, H. van de Waterbeemd, D.K.Walker. Weinheim, Germany.: Wiley-VCH Verlag GmbH., 2001. 141 p.
26. Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics; Ed. C. Ioannides. Chrichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2001. 566 p.
27. Дэгли С., Никольсон Д. Метаболические пути; М.: Мир, 1973. 310 с.
28. Zhang Q., Ma P., Cole R.B., Wang G. Identification of in vitro metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB₂) by HPLC-MS/MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. P. 1345-1355.

29. Мелентьев А.Б. Скрининг лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором // Проблемы экспертизы в медицине. 2002. №4. С. 15-21.
30. Maurer H.H. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control [review] // Clin. Chem. Lab. Med. 2004. V. 42. P. 1310-1324.
31. Peters F. Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology // Clin. Biochem. 2011. V. 44. P. 54-65.
32. Савчук С.А., Григорьев А.М. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике. М.: ЛЕНАНД., 2013. 224 с.
33. Gerhards P., Bons U., Sawaski J., Szigan J., Wertman A. GC/MS in Clinical Chemistry. Weinheim, Germany.: WILEY-VCH Verlag GmbH., 1999. 241 p.
34. Hübschmann H.-J. Handbook of GC/MS. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH., 2001. 591 p.
35. Высокоэффективная газовая хроматография. Под ред. К. Хайвера. М.: Мир, 1993. 288 с.
36. Тесаржик К., Комарек К. Капиллярные колонки в газовой хроматографии. М.: Мир, 1987. 222 с.
37. Руденко Б.А. Высокоэффективные хроматографические процессы. Т. 1: Газовая хроматография. М.: Наука, 2003. 425 с.
38. Карасек Ф., Клемент Р. Введение в хромато-масс-спектрометрию. М.: Мир, 1993. 237 с.
39. Гиошон Ж., Гийемен К. Количественная газовая хроматография: в 2 ч. М.: Мир, 1991. 2 ч.
40. GC and GC/MS. Your Essential Resource for Columns & Supplies // Agilent Technologies Inc. 5991-1058EN. USA, 2014. Accessed from: http://www.chem.agilent.com/Library/catalogs/Public/5991-1058EN%20GC_Columns.pdf.
41. Babushok V.I., Linstrom P.J., Reed J.J., Zenkevich I.G., Brown R.L., Mallard W.G. Stein S.E. Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1157. P. 414-421.
42. Симонов Е.А, Найденова Л.Ф., Ворнаков С.А. Наркотические средства и психотропные вещества, контролируемые на территории Российской Федерации. М.: InterLab, 2003. 411 с.
43. Еремин С.К. Анализ наркотических средств. М.: Мысль, 1993. 259 с.
44. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. Наркотики: свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм. М.: Триада-Х, 2000. 102 с.
45. Е.С.Бушуев, Р.В.Бабаханян, В.Н.Куклин. Современные проблемы химико-токсикологического анализа токсических веществ СПб.: Изд-во НИИХ СПбГУ, 2003. 127 с.

46. Симонов Е.А, Изотов Б.Н., Фесенко А.В. Наркотики. Методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях. М.: Анахарсис, 2000. 130 с.
47. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Ed. by J.A Adamovics. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1997. 508 p.
48. Mills T. Roberson J.C. Instrumental Data for Drug Analysis. New York, USA: CRC Press, 1993.
49. Clarke`s Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Fourth Edition. Ed. by Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. London, UK: Pharmaceical Press, 2011. 2604 p.
50. Maurer H.H., Pflieger K., Weber A. Mass Spectral and GC Data Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites Edition 2011. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, STM Databases.
51. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program (Data Version: NIST 11, Software Version 2.0g). Website: <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>
52. Handbook of Derivatives for Chromatography. Second edition. Ed. Blau K., Halket J.M. John Wiley & Sons. Chichester, UK. 356 p.
53. Poole C.F. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography // J. Chromatogr. A. 2013. V. 1296. P. 2-14.
54. Король А.Н. Неподвижные фазы в газожидкостной хроматографии. Справочник. М.: Химия, 1985. 240с.
55. Руководство по газовой хроматографии: в 2 ч. Под ред. Э. Лейбница, Х.Г. Штрuppe. М.: Мир, 1988. 2 ч.
56. Abraham M.A., Poole C.F., Poole S.K. Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography // J. Chromatogr. A. 1999. V. 842. P. 79-114.
57. Castello G., D'Amato G. Fast evaluation of the polarity of gas chromatographic columns using the difference in apparent carbon number of linear alkanes and alcohols // J. Chromatogr. A. 1992. V. 623. P. 289-295.
58. Golovnya R.V., Polanuer B.M., Nesmeyanov A.N. Comparison of methods for the determination of the polarity and selectivity of stationary phases in gas chromatography from a thermodynamic point of view // J. Chromatogr. A. 1990. V. 517. P. 51-66.
59. Korol A.N. Dovbush T.I. Selectivity of paraffinic stationary phases for gas-liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1981. V. 209. P. 21-28.
60. Peng C.T., Yang Z.C., Ding, S.F. Prediction of retention indexes. II. Structure-retention index relationship on polar columns // J. Chromatogr. 1991. V. 586. P. 85-112.
61. Heldt U., Köser H.J.K. Different bases for the gas chromatographic retention index system // J. Chromatogr. A. 1980. V. 192. P. 107-116.

62. Castello G. Retention index systems: alternatives to the *n*-alkanes as calibration standards // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 842. P. 51-64.
63. Kowalska T., Heberger K., Gorgenyi M. Temperature dependence of Kovats indices in gas chromatography. Explanation of empirical constants by use of transition-state theory // *Acta Chromatographica*. 2003. V. 13. P. 60-68.
64. Zellner B.A., Bicchi C., Dugo P. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review // *Flavor Fragr. J.* 2003. V. 23. P. 297-314.
65. Богословский Ю.И., Анваер Б.И., Вигдергауз М.С. Хроматографические постоянные в газовой хроматографии. Углеводороды и кислородсодержащие соединения. М.: Издательство стандартов, 1978. 192 с.
66. Görgényi M., Fekete Z. A., Langenhove Van, H. Dewulf Jo. Temperature dependence of the Kováts retention index: Convex or concave curves // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1206. P. 178-185.
67. Kucha M., Tomková H. Rejholec V., Korhonen I.O.O. Gas-liquid chromatography and lipophilicity of esters of benzoic acids: Enthalpy-entropy compensation // *J. Chromatogr. A*. 1987. V. 398. P. 43-51.
68. Ranatunga R., Vitha M. F., Carr P.W. Mechanistic implications of the equality of compensation temperatures in chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 946. P. 47-49.
69. Li J., Carr P.W. Extra-thermodynamic relationships in chromatography enthalpy-entropy compensation in gas chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1994. V. 670. P. 105-116.
70. Vezzani S., Moretti P. Castello G. Classification and comparison of capillary columns by determination of the solution enthalpy of polar and non polar probes // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1101. P. 261-267.
71. Головня Р. В. Исследование компонентов запаха некоторых пищевых продуктов: дис. д-ра хим. наук. – М., 1973. – 343 с.
72. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудакова Л.В. Конвергенция удерживания гомологических рядов в газовой и жидкостной хроматографии // Тез. докл. всеросс. конф. "Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии". Самара, 2009. С. 32.
73. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудаков О.Б. Компенсационное поведение гомологических рядов в газовой и жидкостной хроматографии // Тез. докл. съезда аналитиков России "Аналитическая химия – новые методы и возможности". Москва (Клязьма), 2010. С. 87.
74. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудаков О.Б. Компенсация удерживания гомологических рядов в газовой и жидкостной хроматографии // Тез. докл. всеросс. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар, 2010. С. 180.
75. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудаков О.Б. Физический смысл и координаты областей компенсации удерживания гомологических рядов в газожидкостной хроматографии // Сб. мат.

V Всеросс. конф. "Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах. Фагран-2010". Воронеж, 2010. Т. 2. С. 700-703.

76. van Den Dool, Kratz H., Dec P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1963. V. 11. P. 463-471.

77. Novák J., Růžičková J. Generalization of the gas chromatographic retention index system // *J. Chromatogr.* 1974. V. 91. P. 79-88.

78. Tarján G., Nyiredy Sz., Györ M., Lombosi E.R., Lombosi T.S., Budahegyi M.V., Mészáros S.Y., Takács J.M. Thirtieth anniversary of the retention index according to Kováts in gas-liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1989. V. 472. P. 1-92.

79. Zenkevich I.G. Principle of structural analogy in the calculation of gas-chromatographic retention indexes from physicochemical properties of organic compounds // *Journal of Analytical Chemistry*. 1998. V. 53. P. 35-40.

80. Zenkevich I.G. Dependence of Chromatographic Retention Indices on the Dynamic Characteristics of Molecules // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 1999. V. 73. P. 797-801.

81. Zenkevich I.G., Marinichev A.N. Comparison of the topological and dynamic characteristics of molecules for calculating retention indices of organic compound // *Journal of Structural Chemistry*. 2001. V. 42. P. 747-754.

82. Зенкевич И.Г. Расчет газохроматографических индексов удерживания по физико-химическим константам органических соединений // *Журн. аналит. химии*. 1995. Т. 50. С. 1048-1056.

83. Зенкевич И.Г. Расчет газохроматографических индексов удерживания органических соединений по температурам кипения их структурных аналогов // *Журн. структ. химии*. 1999. Т. 40. С. 121-130.

84. Lombosi T.S., Lombosi E.R., Bernát I., Bernát Zs.Sz., Takács E.C., Takács J.M. General contribution to the theory of retention index systems in gas-liquid chromatography: I. Pre-calculation of retention indices of alkanes on the basis of their molecular structures and thermodynamics in gas-liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1976. V. 119. P. 307-319.

85. Зенкевич И.Г., Уколов А.И. Кодирование особенностей структуры органических соединений для оценки хроматографических индексов удерживания с использованием аддитивных схем // *Журн. структ. химии*. 2010. Т. 51. С. 671-681.

86. Acevedo-Martínez J., Zenkevich I.G., Carrasco-Velaz R. Use of a Simple Additive Scheme to Predict the GC Retention Indices of Aromatic Compounds with Different Structures // *Chromatographia*. 2010. V. 71. P. 881-889.

87. Bojti E., Mihók M., Borbély I., Bárkai J., M. Takács J. General contribution to the theory of retention index systems in gas-liquid chromatography : II. Additivity of gas chromatographic interactions expressed by retention indices // *J. Chromatogr. A.* 1976. V. 119. P. 321-325.
88. Quimby B.D., Blumberg L.M., Klee M. S., Wylie P. L. Precise Time-Scaling of Gas Chromatographic Methods Using Method Translation and Retention Time Locking // *Agilent Technologies Application.* 5967-5820E. USA, 1998. Accessed from: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5967-5820E.pdf>.
89. Chang I., Treese C. Enhanced Reliability of Forensic Drug Testing Using Retention Time Locking // *Agilent Technologies Application.* 5966-2494E. USA, 1998. Accessed from: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59662494%20.pdf>.
90. Wylie P.L., Quimby B.D. A Method Used to Screen for 567 Pesticides and Suspected Endocrine Disrupters // *Agilent Technologies Application.* 5967-5860E. USA, 1998. Accessed from: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59675860.pdf>.
91. Савчук С.А., Симонов Е.А., Сорокин В.И., Дорогокупец О.Б., Веденин А.Н. Применение метода фиксации времен удерживания при хромато-масс-спектрометрическом определении наркотических средств // *Журн. аналит. химии.* 2004. Т. 59. № 10. С. 1059.
92. Tarján G., Kiss Á., Kocsis G., Mészáros S., Takács J. M. General contribution to the theory of retention index systems in gas-liquid chromatography: III. Contribution to the polarity of gas chromatographic stationary phases expressed by retention indices // *J. Chromatogr. A.* 1976. V. 119. P. 327-332.
93. Szentirmay Z., Tarján G., Békési L., Gajári J., Takács J. M. General contribution to the theory of retention index systems in gas-liquid chromatography: IV. Pre-calculation of interaction factors on mixed stationary phases in gas-liquid chromatography by computer // *J. Chromatogr. A.* 1976. V. 119. P. 333-338.
94. Konoz E., Fatemi M. H., Faraji R. Prediction of Kovats Retention Indices of Some Aliphatic Aldehydes and Ketones on Some Stationary Phases at Different Temperatures Using Artificial Neural Network // *J. Chromatogr. Sci.* 2008. V. 46.P. 406-412.
95. Зенкевич И.Г., Ещенко А.Ю. Одновременная хроматографическая идентификация нескольких компонентов в смесях на основании корреляции их абсолютных или относительных времен удерживания в разных режимах // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63. С. 504-513.
96. Gonzalez F. R., Nardillo A. M. Retention index in temperature-programmed gas chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 842. P. 29-49.
97. Héberger K., Görgényi M., Kowalska T. Temperature dependence of Kovats indices in gas chromatography revisited. // *J Chromatogr A.* 2002. V. 973. P. 135-142.

98. Дженнингс В. Газовая хроматография на стеклянных капиллярных колонках. М.: Мир, 1980. 232 с.
99. Quimby B. Rapid Forensic Toxicology Screening Using an Agilent 7890A/NPD/5975C/DRS GC/MSD System // Agilent Technologies Application. 5989-6066EN. USA, 2007. Accessed from: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-6066EN.pdf>.
100. Григорьев А.М., Божко Е.С. Линейная оценка индексов удерживания компонентов на фазе НР-5 для обзорного анализа методом ГХ-МС. Практика использования системы AMDIS // Тез. докл. всероссийской. научно-практ. конф. «Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований». Москва. 2007.
101. Григорьев А.М., Божко Е.С. Практическое использование корреляции индексов Ковача на слабополярных фазах для обзорного анализа биологических образцов методом ГХ-МС // Тез. докл. всероссийского симпозиума «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия». Москва, Клязьма. 2008. С.19.
102. 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.
103. Григорьев А.М., Савчук С.А. Согласование параметров обзорных библиотек газохроматографического удерживания // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. С. 400-409.
104. Draber W., Fujita T. Rational Approaches to Structure, Activity, and Ecotoxicology of Agrochemicals. «CRC Press» 1992. 608 p.
105. Summary of Toxicity Studies on Bensultap. (Development Department, Plant Protection Research, Agro Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.) // J. Pesticide Sci. 1989. V. 14. № 4. P. 523-529.
106. Nishi K., Konishi K., Padan T.N. In: «Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators». Ed. by Zweig G. New York, USA: Academic Press. 1973. V. 7. P. 371-384.
107. Namera A., Watanabe T., Yashiki M., Kojima T., Urabe T. Simple and Sensitive Analysis of Nereistoxin and Its Metabolites in Human Serum Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry // J. Chromatogr. Sci. 1999. V. 37. № 3. P. 77-82.
108. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник: Т.1 / Сост. М.А. Клисенко, А.А. Калинина, К.Ф. Новикова и др. М.: Колос. 1992. 567 с.
109. Mitsudera H., Kamicado T., Uneme H., Kono Y. Synthesis and Biological Activity of 4-Alkylthio-1,2-dithiolanes and Related Compounds // Agric. Biol. Chem. 1990. V. 54. №7. P. 1719-1722.

110. Nagivara H., Numata M., Konishi K., Oka Y. Synthesis of Nereistoxin and Related Compounds // Chem. Pharm. Bull. 1965. V. 13. №3. P. 253-260.
111. Оаз С. Химия органических соединений серы. М.: «Химия». 1975. 512 с.
112. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2003. 493 с.
113. Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. Масс-спектрометрия органических соединений. М.: Химия. 1986. 312 с.
114. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига.: Зинатне. 1988. 390с.
115. Thiocarbamate pesticides. // International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization. Geneva. 1988.
116. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудакова Л.В. Определение нереистоксина, его производных и метаболитов хроматографическими методами в биообъектах // Тез. докл. VII Всеросс. конф. по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2009". Йошкар-Ола. 2009. С. 74-75.
117. Григорьев А.М., Недовизина Г.В., Пирожков И.В. Определение производных и метаболитов бенсультапа (банкола) хроматографическими методами // Судебно-медицинская экспертиза. 2009. С. 30-33.
118. 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.
119. Машковский М.Д. Лекарственные средства, 16 изд. М.: Новая волна. 2010. 1216 с.
120. Зиятдинова Г.К., Самигуллин А.И., Будников Г.К. Вольтамперометрическое определение папаверина и дротаверина // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 8. С. 858-861.
121. Issa Y.M., Ibrahim H., Abu-Shawish H.M. Carbon Paste Electrode for the Potentiometric Flow Injection Analysis of Drotaverine Hydrochloride in Serum and Urine // Microchim. Acta. 2005. V. 150. P. 47-54.
122. Abdellatef H.E., Ayad M.M., Soliman S.M., Youssef N.F. Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of paracetamol and drotaverine HCl in combination // Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. 2007. V. 66. № 4-5. P. 1147-1151.
123. Metwally F.H., Abdelkawy M., Naguib I.A. Determination of Nifuroxazide and Drotaverine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations by Three Independent Analytical Methods // J. AOAC Int. 2006. V. 89. № 1. P. 78-87.

124. Ayad M. M., Youssef N. F., Abdellatif H. E., Soliman S. M. A comparative study on various spectrometries with thin layer chromatography for simultaneous analysis of drotaverine and nifuroxazide in capsules // *Chem. Pharm. Bull.* 2006. V. 54. № 6. P. 807-813.
125. Vargay Z., Simon G., Winter M., Szuts T. Qualitative and quantitative determination of drotaverine metabolites in rat bile // *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 1980. V. 5. № 2. P. 69-74.
126. Mezei J., Kuttel S., Szentmiklosi P., Marton S, Racz I. A new method for high-performance liquid chromatographic determination of drotaverine in plasma // *J. Pharm. Sci.* 1984. V. 73. № 10. P. 1489-1491.
127. Bolaji O.O., Onyeji C.O., Ogunbamila F.O., Ogunbona F.A., Ogunlana E.O. High-performance liquid chromatographic method for the determination of drotaverine in human plasma and urine // *J. Chromatogr.* 1993. V. 622. № 1. P. 93-97.
128. Lalla J.K., Shah M.U., Jain M.B., Sharma A.H. Modified high-performance liquid chromatographic method for analysis of drotaverine in human plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993. V. 11. № 4-5. P. 385-388.
129. Girgis E.H. Ion-pair reversed-phase liquid chromatographic identification and quantitation of papaverine congeners // *J. Pharm. Sci.* 1993. V. 82. № 5. P. 503-505.
130. Чеховская О.В., Пыщев А.И. Аналитический контроль производства и качества лекарственных препаратов // *Мат. междунар. конф. по новым технологиям и приложениям современных физико-химических методов.* Ростов н/Дону. 2001. С. 117-119.
131. Халецкий А.М. Фармацевтическая химия. Л.: Медицина, 1966. 762 с.
132. Дротаверина гидрохлорид, субстанция. НД42-12678-02. Фармакопейный государственный комитет МЗ РФ, 2005.
133. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудакова Л.В. ГХ-МС в исследовании термолabileльных производных дротаверина // *Тез. докл. III всеросс. конф. с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (IV съезд ВМСО).* Москва. 2009. С. 51.
134. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудакова Л.В. Определение дротаверина, его производных и метаболитов: ГЖХ или ВЭЖХ? // *Тез. докл. всеросс. конф. «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии».* Самара. 2009. С. 95.
135. 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.
136. Skibinski R., Komsta L., Kosztyla I. Comparative validation of quetiapine Determination in tablets by NP-HPTLC and RP-HPTLC with densitometric and videodensitometric detection // *J. Plan. Chrom. - Modern TLC.* 2008. V. 21, P. 289-294.

137. Mandriolia R., Fanalib S., Ferrantia A., Raggi M.A. HPLC analysis of the novel antipsychotic drug quetiapine in human plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. V. 30. P. 969-977.
138. Belal F., Elbrashy A., Eid M., Nasr J.J. Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Quetiapine: Application to Tablets and Human Plasma // *J. Liq. Chrom. & Rel. Techn.* // 2008. V. 31. P. 1283-1298.
139. Davis P.C., Wonga J., Gefvert O. Analysis and pharmacokinetics of quetiapine and two metabolites in human plasma using reversed-phase HPLC with ultraviolet and electrochemical detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999. V. 20. P. 271-282.
140. Nirogi R., Bhyrapuneni G., Kandikere V., Mudigonda K., Ajjala D., Mukkanti K. Sensitive liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the quantification of Quetiapine in plasma // *Biomed. Chrom.* 2008. V. 22. P. 1043-1055.
141. Kun-yan Li, Ze-neng Cheng, Xin Li, Xue-lian Bai, Bi-kui Zhang, Feng Wang, Huan-de Li. Simultaneous determination of quetiapine and three metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry // *Acta Pharmacol. Sin.* 2004, V. 25. P. 110-111.
142. Bellomarino S.A., Brown A.J., Conlan X.A., Barnett N.W. Preliminary evaluation of monolithic column high-performance liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection for the determination of quetiapine in human body fluids // *Talanta.* 2009. V. 77. P. 1873-1876.
143. Atanasov V.N., Kanev K.P., Mitewa M.I. Detection and identification of atypical quetiapine metabolite in urine // *Central European Journal of Medicine.* 2008. V. 3. P. 327-331.
144. Pullen R.H., Palermo K.M., Curtis M.A. Determination of an antipsychotic agent (ICI 204,636) and its 7-hydroxy metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 1992. V. 573. P. 49-57.
145. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудакова Л.В. Масс-спектральные характеристики и индексы удерживания (ГЖХ) кветиапина, его производных и метаболитов // Тез. докл. III всеросс. конф. с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (IV съезд ВМСО). Москва. 2009. С. 91.
146. 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.
147. Tonn G.R., Mutlib A., Abbott F.S., Rurak D.W., Axelson J.E. Simultaneous analysis of diphenhydramine and a stable isotope analog, (²H₁₀)-diphenhydramine, using capillary gas

chromatography with mass selective detection in biological fluids from chronically instrumented pregnant ewes // *Biol. Mass Spectrom.* 1993. V. 22. P.633–642.

148. Baldacci A., Prost F., Thormann W. Identification of diphenhydramine metabolites in human urine by capillary electrophoresis-ion trap-mass spectrometry // *Electrophoresis.* 2004. V. 25, N. 10-11. P. 1607-1614.

149. Kumar S., Rurak Dan W., Riggs K.W. Simultaneous determination of diphenhydramine, its *N*-oxide metabolite and their deuterium-labeled analogues in ovine plasma and urine using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry // *J. Mass Spect.* 1999. V. 33. P. 1171-1181.

150. Gergov M., Robson J. N., Ojanpera I., Heinonen O.P., Vuori E. Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry // *Forensic Sci. Int.* 2001. V. 121. N. 1-2. P. 108-115.

151. Удалов А.В., Тарашук Е.Ю. Применение микроколоночной градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения димедрола в моче при комбинированных отравлениях // *Судебно-медицинская экспертиза.* 2006. № 2. С. 34.

152. Wasfi I.A., Abdel Hadi A.A., Elghazali M., Alkateeri N.A., Hussain M.M., Hamid A.M. Comparative Pharmacokinetics of Diphenhydramine in Camels and Horses after Intravenous Administration // *Vet. Res. Commun.* 2004. V. 27. N. 6. P. 463-473.

153. Melnick R. Toxicology and carcinogenesis studies of diphenhydramine hydrochloride in F344/N rats and B6C3F1 mice // National toxicology program, Publication No. 89-2810. -National Institutes of Health (U.S. Department of health and human services), September 1989. P. 176.

154. Григорьев А.М., Машкова И.В. Определение димедрола, его метаболитов и сопутствующих соединений методом ГХ-МС в моче // Сб. мат. всеросс. научно-практической конф. «Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований». Москва. 2007.

155. Григорьев. А.М., Машкова И.В, Рудакова Л.В, Рудаков О.Б. ГХ-МС И ВЭЖХ определение метаболитов димедрола в моче // Тез. докл. всеросс. симп. «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия». Москва, Клязьма. 2008. С. 90.

156. Григорьев А.М., Машкова И.В., Рудакова Л.В. Определение метаболитов димедрола методами ГХ-МС и ВЭЖХ в моче // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. № 1. С. 134-140.

157. Devane W.A., Dysarz III F.A., Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain // *Mol. Pharmacol.* 1988. V. 34. P. 605–613.

158. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor // *Science.* 1992. V. 258. P. 1946-1949.

159. Di Marzo V., Bifulco M., De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. P. 771-784.
160. Console-Bram L., Marcu J., Abood M.E. Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2012. V. 38. P. 4-15.
161. Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands // *Curr. Med. Chem.* 1999. V. 6. P. 635-664.
162. Pertwee R.G. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists / *Curr Med Chem.* 2010. Vol. 17. P.1360-1381.
163. *The Cannabinoid Receptors*; Ed. by P.H. Reggio. New York, USA: Humana Press. 2009. 396 p.
164. Martin B.R., Jefferson R., Winckler R., Wiley J.L., Huffman J.W., Crocker P.J., Saha B., Razdan R.K. Manipulation of the tetrahydrocannabinol side chain delineates agonists, partial agonists, and antagonists // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999. V. 290. P. 1065-1079.
165. Makriyannis A., Khanolkar A., Lu D. US Patent Application – Cannabinoids selective for the CB2 receptor. Patent No. US6166066A1, 2000.
166. Makriyannis A., Lu D., Khanolkar A. US Patent Application – Novel analgesic and immunomodulatory cannabinoids. Patent No. US2003120094A1, 2003.
167. Makriyannis A., Mexico Patent Application – Novel bicyclic cannabinoid agonists for the cannabinoid receptor. Patent No. MXPA02005104A, 2003.
168. Makriyannis A., Liu Q. US Patent Application – Heteroindanes a new class of potent cannabimimetic ligands. Patent No. US2004236101A1, 2004.
169. Makriyannis A., Lai X.-Z., Lu D. International Patent Application – Novel biphenyl and biphenyl-like cannabinoids. Patent No. WO2004017920A2, 2004.
170. Makriyannis A., H. Deng. US Patent Application – Novel cannabimimetic ligands. Patent No. US2004077649A1, 2004.
171. Makriyannis A., Khanolkar A. US Patent Application – Bicyclic cannabinoid agonists for the cannabinoid receptor. Patent No. US2005137173A1, 2005.
172. Makriyannis A., Lu D., Khanolkar A., Meng Z. US Patent Application – Novel analgesic and immunomodulatory cannabinoids. Patent No. US2005239874A1, 2005.
173. Makriyannis A., Lui Q., Thotapally R. US Patent Application – Novel pyrazole analogs acting on cannabinoid receptor. Patent No. US2006030563A1, 2006.
174. Makriyannis A., Nikas S.P., Khanolkar A. US Patent Application – Novel bicyclic and tricyclic cannabinoids. Patent No. US2006199957A1, 2006.
175. Makriyannis A., Khanolkar A. US Patent Application – Peripheral cannabinoid receptor (CB2) selective ligands. Patent No. US2006189610A1, 2006.

176. Makriyannis A., Lui Q., Thotapally R. US Patent Application – Pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. Patent No. US2006100208A1, 2006.
177. Makriyannis A., Khanolkar A., Goutopolus A. US Patent Application – Cannabimimetic lipid amines as useful medications. Patent No. US7161016B1, 2007.
178. Makriyannis A. Mexico Patent Application – Cannabimimetic lipid ligands. Patent No. MX2007004536A, 2007.
179. Makriyannis A., Lu D. US Patent Application – Keto cannabinoids with therapeutic indications. Patent No. US2007155701A1, 2007.
180. Makriyannis A., Nikas S.P., Khanolkar A., Thakur G.A., Lu D. US Patent Application – Novel bicyclic cannabinoids. Patent No. US2007135388A1, 2007.
181. Makriyannis A., H. Deng. US Patent Application – Receptor selective cannabimimetic aminoalkylindoles. Patent No. US2007243134A1, 2007.
182. Makriyannis A., Liu Q., Goutopolus A. US Patent Application – Retro-anandamides, high affinity and stability receptor ligands. Patent No. US7276613B1, 2007.
183. Makriyannis A., H. Deng. US Patent Application – Cannabimimetic indole derivatives. Patent No. US208009087A1, 2008.
184. Makriyannis A., Vemuri V.K. International Patent Application – CB1 receptor antagonists and uses thereof. Patent No. WO2008154015A1, 2008.
185. Makriyannis A., Vemuri V.K., Thotapally R., Olszewska T. International Patent Application – Novel hetero pyrrole analogs acting on cannabinoid receptors. Patent No. WO2010104488A1, 2010.
186. Mustata C., Torrens M., Pardo R., Pérez C. Psychonaut Web Mapping Group, Farré M. Spice drugs: cannabinoids as a new designer drugs // *Adicciones*. 2009. V.21. P. 181–186.
187. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Thematic paper - Understanding the 'Spice' phenomenon. Luxembourg, 2009. 37 p.
188. Auwärter V., Dresen S., Weinmann W., Müller M., Pütz M., Ferreirós N. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? // *J. Mass Spectrom.* 2009. V.44. P. 832–837.
189. Lindigkeit R., Boehme A., Eiserloh I., Lubbecke M., Wiggermann M., Ernst L., Beuerle T. Spice: A never ending story? // *Forensic Sci. Int.* 2009. V. 191. P. 58–63.
190. Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Goda Y. Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product // *Forensic Toxicol.* 2009. V. 27. P. 61–66.
191. Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Ogata J., Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products // *Forensic Sci. Int.* 2010. V. 198. P. 31–38.
192. Penn H. J., Langman L.J., Unold D., Shields J., Nichols J.H. Detection of synthetic cannabinoids in herbal incense products // *Clin. Biochem.* 2011. V. 44. P. 1163-1165.

193. Постановление Правительства РФ от 31 декабря 2009 г. № 1186 г. Москва. «О внесении изменений в некоторые постановления Правительства Российской Федерации по вопросам, связанным с оборотом наркотических средств».
194. Synthetic cannabinoids in herbal products. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Accessed from: http://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf (Jul, 2011).
195. European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction. EMCCDA-Europol 2012 Annual Report. Accessed from: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_190854_EN_TDAC12001ENC_.pdf.
196. Consideration of the major cannabinoid agonists. Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD), London (2009). Accessed from: <http://www.homeoffice.gov.uk/publications/drugs/acmd1/acmd-report-agonists?view=Binary> (Jul, 2010).
197. Zimmermann U.S., Winkelmann P.R., Pilhatsch M., Nees J.A., Spanagel R., Schulz K. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of 'Spice Gold' // Dtsch. Arztebl. Int. 2009. V. 106. P. 464-467.
198. Seely K.A., Lapoint J., Moran J.H., Fattore L. Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids // Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry. 2012. V. 39. P. 234-243.
199. Harris C.R., Brown A. Synthetic Cannabinoid Intoxication: A Case Series and Review // J. Emerg. Med. 2013. V. 44. P. 360-366.
200. Hermanns-Clausen M., Kneisel S., Szabo B., Auwärter V. Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings // Addiction. 2013. V. 108. P. 534-544.
201. Westphal F., Junge T., Sönnichsen F., Rösner P, Schäper J. Ein neuer Wirkstoff in SPICE-artigen Kräutermischungen: Charakterisierung von JWH-250, seinen Methyl- und Trimethylsilylderivaten // Toxichem Krimtech. 2010. V. 77. P. 8-22.
202. Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Suzuki J. Identification and quantitation of cannabimimetic compound JWH-250 as an adulterant in products obtained via the Internet // Forensic Toxicol. 2011. V. 29. P. 51-55.
203. Nakajima J., Takahashi M., Nonaka R., Seto T., Suzuki J., Yoshida M., Kanai C., Hamano T. Identification and quantitation of a benzoylindole (2-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone and a naphthoylindole 1-(5-fluoropentyl-1H-indol-3-yl)-(naphthalene-1-yl)methanone (AM-2201) found in illegal products obtained via the Internet and their cannabimimetic effects evaluated by in vitro [35S]GTP γ S binding assays // Forensic Toxicol. 2011. V. 29. P. 132-141.

204. Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Kanai C., Suzuki J., Yoshida M., Hamano T. Identification and quantitation of two benzoylindoles AM-694 and (4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone, and three cannabimimetic naphthoylindoles JWH-210, JWH-122, and JWH-019 as adulterants in illegal products obtained via the Internet // *Forensic Toxicol.* 2011. V. 29. P. 95-110.
205. Uchiyama N., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products // *Forensic Toxicol.* 2011. V. 29. P. 25-37.
206. Kneisel S., Westphal F., Rösner P., Brecht V., Ewald A., Klein B., Pütz M., Thiemt S., Auwärter V. Cannabinoidmimetika: Massenspektren und IR-ATR-Spektren neuer Verbindungen aus den Jahren 2009/2010 // *Toxichem Krimtech.* 2011. V. 78. P. 23-35.
207. Ernst L., Schiebel H.-M., Theuring C., Lindigkeit R., Beuerle T. Identification and characterization of JWH-122 used as new ingredient in "Spice-like" herbal incenses // *Forensic Sci. Int.* 2011. V. 208. P. 31-35.
208. Bononi M., Belgi P., Tateo F. Analytical data for identification of the Cannabimimetic Phenylacetylindole JWH-203 // *J. Anal. Toxicol.* 2011. V. 35. P. 360-363.
209. Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Identification of a novel cannabimimetic phenylacetylindole, cannabipiperidiethanone, as a designer drug in a herbal product and its affinity for cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2011. V. 59. P. 1203-1205.
210. Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Shoda T., Fukuhara K., Goda Y. Isomeric analysis of synthetic cannabinoids detected as designer drugs // *Yakugaku Zasshi (Japan).* 2011. V. 131. P. 1141-1147.
211. Kavanagh P., Spiers P., O'Brien J., McNamara S., Angelov D., Mullan D., Talbot B., Ryder S. Head Shop 'Legal Highs' Active Constituents Identification Chart (July-August 2010, '714'-'823') Accessed from: <http://www.drugsandalcohol.ie/13972/>.
212. Westphal F., Sönnichsen F.D., Thiemt S. Identification of 1-butyl-3-(1-(4-methyl)naphthoyl)indole in a herbal mixture // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 215. P. 8-13.
213. Ernst L., Krüger K., Lindigkeit R., Schiebel H.M., Beuerle T. Synthetic cannabinoids in "spice-like" herbal blends: First appearance of JWH-307 and recurrence of JWH-018 on the German market // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 222. P. 216-222.
214. Jankovics P., Váradi A., Tölgyesi L., Lohner S., Németh-Palotás J., Balla J. Detection and identification of the new potential synthetic cannabinoids 1-pentyl-3-(2-iodobenzoyl)indole and 1-pentyl-3-(1-adamantoyl)indole in seized bulk powders in Hungary // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 214. P. 27-32.

215. Kneisel S., Bisel P., Brecht V., Broecker S., Muller M., Auwarter V. Identification of the cannabimimetic AM-1220 and its azepane isomer (N-methylazepan-3-yl)-3-(1-naphthoyl)indole in a research chemical and several herbal mixtures // *Forensic Toxicol.* 2012. V. 30. P. 126-134.
216. Kneisel S., Westphal F., Bisel P., Brecht V., Broecker S., Auwärter V. Identification and structural characterization of the synthetic cannabinoid 3-(1-adamantoyl)-1-pentylindole as an additive in 'herbal incense' // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. P. 195-200.
217. Moosmann B., Kneisel S., Girreser U., Brecht V., Westphal F., Auwärter V. Separation and structural characterization of the synthetic cannabinoids JWH-412 and 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(4-methylnaphthalen-1-yl)methanone using GC-MS, NMR analysis and a flash chromatography system // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 220. P. 17-22.
218. Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Yoshida M., Kanai C., Suzuki J., Hamano T. Identification and quantitation of two new naphthoylindole drugs-of-abuse, (1-(5-hydroxypentyl)-1H-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone (AM-2202) and (1-(4-pentenyl)-1H-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone, with other synthetic cannabinoids in unregulated "herbal" products circulated in the Tokyo area // *Forensic Toxicol.* 2012. V. 30. P. 33-44.
219. Uchiyama N., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Identification of two new-type synthetic cannabinoids, N-(1-adamantyl)-1-pentyl-1H-indole-3-carboxamide (APICA) and N-(1-adamantyl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (APINACA), and detection of five synthetic cannabinoids, AM-1220, AM-2233, AM-1241, CB-13 (CRA-13), and AM-1248, as designer drugs in illegal products // *Forensic Toxicol.* 2012. V. 30. P. 114-125.
220. Valoti E., Casagni E., Dell'acqua L., Pallavicini M., Roda G., Rusconi C., Straniero V., Gambaro V. Identification of 1-butyl-3-(1-(4-methyl)naphthoyl)indole detected for the first time in "herbal high" products on the Italian market // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 223. P. e42-e46.
221. Мелкозеров В.П., Неверо А.С., Торицин А.В., Шевчук Т.А., Шевырин В.А. Идентификация и аналитические характеристики двух новых синтетических каннабиноидов – производных индазола // *Судебная экспертиза.* 2012. № 1. С. 107-120.
222. Шевырин В.А., Мелкозеров В.П., Моржерин Ю. Ю. Идентификация и аналитические характеристики двух новых синтетических каннабиноидов – производных индазола // *Бутлеровские чтения.* 2012. Т. 30. С. 93-98.
223. Choi H., Heo S., Kim E., Hwang B.Y., Lee C., Lee J. Identification of (1-pentylindol-3-yl)-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanone and its 5-pentyl fluorinated analog in herbal incense seized for drug trafficking // *Forensic Toxicol.* 2013. V. 31. P. 86-92.
224. Denooz R., Vanheugen J.-C., Frederich M., De Tullio P., Charlier C. Identification and structural elucidation of four cannabimimetic compounds (RCS-4, AM-2201, JWH-203 and JWH-210) in seized products // *J. Anal. Toxicol.* 2013. V. 37. P. 56-63.

225. Gregori A., Damiano F., Bonavia M., Mileo V., Varani F., Monfreda M. Identification of two cannabimimetic compounds WIN48098 and AM679 in illegal products // *Sci. Justice*. 2013. V. 53. P. 286-292.
226. Langer N., Lindigkeit R., Schiebel H.M., Ernst L., Beuerle T. Identification and quantification of synthetic cannabinoids in 'spice-like' herbal mixtures: A snapshot of the German situation in the autumn of 2012 // *Drug Test. Anal.* 2013. DOI: 10.1002/dta.1499.
227. Park Y., Lee C., Lee H., Pyo J., Jo J., Lee J., Choi H., Kim S., Hong R.S., Park Y., Hwang B.Y., Choe S., Jung J.H. Identification of a new synthetic cannabinoid in a herbal mixture: 1-butyl-3-(2-methoxybenzoyl)indole // *Forensic Toxicol.* 2013. V. 31. P. 187-196.
228. Shanks K.G., Behonick G.S., Dahn T., Terrell A. Identification of Novel Third-Generation Synthetic Cannabinoids in Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2013 DOI: 10.1093/jat/bkt062.
229. Shevyrin V., Melkozerov V., Nevero A., Eltsov O., Morzherin Y., Shafran Y. Identification and analytical properties of new synthetic cannabimimetics bearing 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarbonyl moiety // *Forensic Sci. Int.* 2013. V. 226. P. 62-73.
230. Shevyrin V., Melkozerov V., Nevero A., Eltsov O., Shafran Y. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid // *Forensic Sci. Int.* 2013. V. 232. P. 1-10.
231. Takahashi K., Uchiyama N., Fukiwake T., Hasegawa T., Saijou M., Motoki Y., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Identification and quantitation of a cannabimimetic indole JWH-213 as a designer drug in an herbal product // *Forensic Toxicol.* 2013. V. 31. P. 145-150.
232. Uchiyama N., Matsuda S., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Two new-type cannabimimetic quinolinyl carboxylates, QUPIC and QUCHIC, two new cannabimimetic carboxamide derivatives, ADB-FUBINACA and ADBICA, and five synthetic cannabinoids detected with a thiophene derivative α -PVT and an opioid receptor agonist AH-7921 identified in illegal products // *Forensic Toxicol.* 2013. V. 31. P. 223-240.
233. Uchiyama N., Matsuda S., Wakana D., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. New cannabimimetic indazole derivatives, N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal product // *Forensic Toxicol.* 2013. V. 31. P. 93-100.
234. Uchiyama N., Matsuda S., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Identification of two new-type designer drugs, piperazine derivative MT-45 (I-C6) and synthetic peptide Noopept (GVS-111), with synthetic cannabinoid A-834735, cathinone derivative 4-methoxy- α -PVP, and

- phenethylamine derivative 4-methylbuphedrine from illegal // *Forensic Toxicol.* 2013. DOI: 10.1007/s11419-013-0194-5.
235. Uemura N., Fukaya H., Kanai C., Yoshida M., Nakajima J., Takahashi M., Suzuki J., Moriyasu T., Nakae D. Identification of a synthetic cannabinoid A-836339 as a novel compound found in a product // *Forensic Toxicol.* 2013. DOI: 10.1007/s11419-013-0201-x.
236. Zuba D., Geppert B., Sekuła K., Zaba C. [1-(Tetrahydropyran-4-ylmethyl)-1H-indol-3-yl]-(2,2,3,3-cyclopropyl)methanone: A new synthetic cannabinoid identified on the drug market // *Forensic Toxicol.* 2013. V. 31. P. 281-291.
237. Uchiyama N., Shimokawa Y., Matsuda S., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Two new synthetic cannabinoids, AM-2201 benzimidazole analog (FUBIMINA) and (4-methylpiperazin-1-yl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (MEPIRAPIM), and three phenethylamine derivatives, 25H-NBOMe 3,4,5-trimethoxybenzyl analog, 25B-NBOMe, and 2C-N-NBOMe, identified in illegal products // *Forensic Toxicol.* 2013. DOI: 10.1007/s11419-013-0217-2.
238. Dresen S., Ferreirós N., Pütz M., Westphal F., Zimmermann R., Auwärter V. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds // *J. Mass Spectrom.* 2010. V. 45. P. 1186-1194.
239. Hudson S., Ramsey J., King L., Timbers S., Maynard S., Dargan P.I., Wood D.M. Use of high-resolution accurate mass spectrometry to detect reported and previously unreported cannabinomimetics in "herbal high" products // *J. Anal. Toxicol.* 2010. V. 34. P. 252-260.
240. Hudson S., Ramsey J. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids // *Drug Test. Anal.* 2011. V. 3. P. 466-478.
241. Dargan P.I., Hudson S., Ramsey J., Wood D.M. The impact of changes in UK classification of the synthetic cannabinoid receptor agonists in 'Spice' // *Int. J. Drug Policy.* 2011. V. 22. P. 274-277.
242. Couch R.A., Madhavaram H. Phenazepam and cannabinomimetics sold as herbal highs in New Zealand // *Drug Test. Anal.* 2012. V. 4. P. 409-414.
243. Logan B.K., Reinhold L.E., Xu A., Diamond F.X. Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends in the United States // *J. Forensic Sci.* 2012. V. 57. P. 1168-1180.
244. Grabenauer M., Krol W.L., Wiley J.L., Thomas B.F. Analysis of synthetic cannabinoids using high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering: implications for nontargeted screening of designer drugs // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 5574-5581.
245. Sekuła K., Zuba D., Stanaszek R. Identification of naphthoylindoles acting on cannabinoid receptors based on their fragmentation patterns under ESI-QTOFMS // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. P. 632-643.

246. Uchiyama N., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. URB-754: A new class of designer drug and 12 synthetic cannabinoids detected in illegal products // *Forensic Sci. Int.* 2013. V. 227. P. 21-32
247. Ibáñez M., Bijlsma L., van Nuijs A.L., Sancho J.V., Haro G., Covaci A., Hernández F. Quadrupole-time-of-flight mass spectrometry screening for synthetic cannabinoids in herbal blends // *J. Mass Spectrom.* 2013. V. 48. P. 685-694.
248. Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Ogata J., Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products // *Forensic Sci. Int.* 2010. V. 198. P. 31-38.
249. Zuba D., Byrska B., Maciow M. Comparison of "herbal highs" composition // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. P. 119-126.
250. Wende M., Schaper J. Qualitative and quantitative analysis of synthetic cannabinoids in smoking mixtures of the "Spice" type using LC-MS/MS // *Toxichem Krimtech.* 2011. V. 78. P. 297-301.
251. Ginsburg B.C., McMahon L.R., Sanchez J.J., Javors M.A. Purity of synthetic cannabinoids sold online for recreational use // *J. Anal. Toxicol.* 2012. V. 36. P. 66-68.
252. Dunham S.J.B., Hooker P.D., Hyde R.M. Identification, extraction and quantification of the synthetic cannabinoid JWH-018 from commercially available herbal marijuana alternatives // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 223. P. 241-244.
253. Merola G., Aturki Z., D'Orazio G., Gottardo R., Macchia T., Tagliaro F., Fanali S. Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. V. 71. P. 45-53.
254. Simolka K., Lindigkeit R., Schiebel H.M., Papke U., Ernst L., Beuerle T. Analysis of synthetic cannabinoids in "spice-like" herbal highs: snapshot of the German market in summer 2011 // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 404. P. 157-171.
255. Shanks K.G., Dahn T., Behonick G., Terrell A. Analysis of first and second generation legal highs for synthetic cannabinoids and synthetic stimulants by ultra-performance liquid chromatography and time of flight mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2012. V. 36. P. 360-371.
256. Cox A.O., Daw R.C., Mason M.D., Grabenauer M., Pande P.G., Davis K.H., Wiley J.L., Stout P.R., Thomas B.F., Huffman J.W. Use of SPME-HS-GC-MS for the analysis of herbal products containing synthetic cannabinoids // *J. Anal. Toxicol.* 2012. V. 36. P. 293-302.
257. Moosmann B., Kneisel S., Wohlfarth A., Brecht V., Auwärter V. A fast and inexpensive procedure for the isolation of synthetic cannabinoids from 'Spice' products using a flash chromatography system // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 405. P. 3929-3935.
258. Choi H., Heo S., Choe S., Yang W., Park Y., Kim E., Chung H., Lee J. Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC-MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 3937-3944.

259. Thomas B.F., Pollard G.T., Grabenauer M. Analytical surveillance of emerging drugs of abuse and drug formulations // *Life Sci.* 2013. V. 92. P. 512-519.
260. Gottardo R., Chiarini A., Dal Prà I., Seri C., Rimondo C., Serpelloni G., Armato U., Tagliaro F. Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. P. 141-146.
261. Higuchi M., Saito K. Rapid screening for synthetic cannabinoids and cathinones using direct analysis in real time (DART)-TOF-MS // *Bunseki Kagaku (Japan)*. 2012. V. 61. P. 705-711.
262. Musah R.A., Domin M.A., Cody R.B., Lesiak A.D., John Dane A., Shepard J.R. Direct analysis in real time mass spectrometry with collision-induced dissociation for structural analysis of synthetic cannabinoids // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012. V. 26. P. 2335-2342.
263. Musah R.A., Domin M.A., Walling M.A., Shepard J.R. Rapid identification of synthetic cannabinoids in herbal samples via direct analysis in real time mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012. V. 26. P. 1109-1114.
264. Lesiak A.D., Musah R.A., Domin M.A., Shepard J.R.E. DART-MS as a Preliminary Screening Method for “Herbal Incense”: Chemical Analysis of Synthetic Cannabinoids // *J. Forensic Sci.* 2013. DOI: 10.1111/1556-4029.12354.
265. Kraemer T., Meyer M., Wissenbach D., Rust K., Bregel D., Hopf M., Maurer H., Wilske J. Distinctive features and symptoms of deficiency of drivers with blood samples positive for JWH-018, the pharmacologically active ingredient of different misused incenses (“Spice”), in suspected DUID cases // *Toxichem Krimtech.* 2009. V. 76. P. 91.
266. Teske J., Weller J.-P., Fieguth A., Rothämel T., Schulz Y., Tröger H.D. Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. P. 2659-2663.
267. Dresen S., Kneisel S., Weinmann W., Zimmermann R., Auwärter V. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples // *J. Mass Spectrom.* 2011. V. 46. P. 163-171.
268. Kacinko S.L., Xu A., Homan J.W., McMullin M.M., Warrington D.M., Logan B.K. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of JWH-018, JWH-073, JWH-019, and JWH-250 in human whole blood // *J. Anal. Toxicol.* 2011. V. 35. P. 386-393.
269. Ammann J., McLaren J.M., Gerostamoulos D., Beyer J. Detection and quantification of new designer drugs in human blood: Part 1 - Synthetic cannabinoids // *J. Anal. Toxicol.* 2012. V. 36. P. 372-380.

270. Kneisel S., Auwärter V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. P. 825-835.
271. Kneisel S., Teske J., Auwärter V. Analysis of synthetic cannabinoids in abstinence control: long drug detection windows in serum and implications for practitioners // *Drug Test. Anal.* 2013. DOI: 10.1002/dta.1445.
272. Shanks K.G., Dahn T., Terrell A.R. Detection of JWH-018 and JWH-073 by UPLC-MS-MS in postmortem whole blood casework // *J. Anal. Toxicol.* 2012. V. 36. P. 145-152.
273. Coulter C., Garnier M., Moore C. Synthetic cannabinoids in oral fluid // *J. Anal. Toxicol.* 2011. V. 35. P. 424-430.
274. Kneisel S., Auwärter V., Kempf J. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Drug Test. Anal.* 2013. V. 5. P. 657-669.
275. Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignanò E., Romolo F.S., Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, "spice" and stimulants in oral fluid // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1258. P. 37-42.
276. Kneisel S., Speck M., Moosmann B., Corneillie T.M., Butlin N.G., Auwärter V. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. DOI: 10.1007/s00216-013-6887-0.
277. Hutter M., Kneisel S., Auwärter V., Neukamm M.A. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 903. P. 95-101.
278. Salomone A., Gerace E., D'Urso F., Di Corcia D., Vincenti M. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples // *J. Mass. Spectrom.* 2012. V. 47. P. 604-610.
279. Poklis J.L., Amira D., Wisea L.E., Wiebelhaus J.M., Haggerty B.J., Poklis A. Detection and disposition of JWH-018 and JWH-073 in mice after exposure to "Magic Gold" smoke // *Forensic Sci. Int.* 2012. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.02.003.
280. Kraemer T., Meyer M., Wissenbach D., Rust K., Bregel D., Hopf M., Maurer H., Wilske J. Studies on the metabolism of JWH-18, the pharmacologically active ingredient of different misused incenses // *Toxichem Krimtech.* 2009. V. 76. P. 90.

281. Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Джурко Ю.А. Аналитические характеристики и определение активных компонентов курительных смесей (JWH-018, JWH-073, JWH-175 и CP 47, 497) в биологических объектах // Тез. докл. Съезда аналитиков России "Аналитическая химия – новые методы и возможности". Москва (Клязьма). 2010. С. 256-257.
282. 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.
283. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Идентификация синтетических примесей, сопутствующих психоактивным каннабимиметикам JWH-018 и JWH-073 в курительных смесях методом газовой хромато-масс-спектрометрии // Сб. материалов XIII Междунар. конф. "Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов" ("ИОНИТЫ-2011"). Воронеж. 2011. С. 417-419.
284. Изотов Б.Н., Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Носырев А.Е., Джурко Ю.А., Забиrowa 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.
285. Atwood B.K., Huffman J., Straiker A., Mackie K. JWH018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB1 receptor agonist // *Br. J. Pharmacol.* 2010. V. 160. P. 585-593.
286. Wiley J.L., Compton D.R., Dong Dai, Lainton J.A.H., Phillips M., Huffman J.W., Martin B.R. Structure-activity relationships of indole- and pyrrole-derived cannabinoids // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998. V. 285. P. 995-1004.
287. Kraemer T., Rust K.Y., Meyer M.R., Wissenbach D.K., Bregel D., Hopf M., Maurer H.H., Wilske J. Studies on the metabolism of JWH-018 and of a homologue of CP 47,497, pharmacologically active ingredients of different misused incense ("Spice") using GC-MS and LCMSn techniques // *Ann. Toxicol. Anal.* 2009. V. 21(S1). P. 21-22.
288. Kraemer T., Meyer M., Wissenbach D., Rust K., Bregel D., Hopf M., Maurer H., Wilske J. Studies on the metabolism of JWH-18, the pharmacologically active ingredient of different misused incenses // *Toxichem Krimtech.* 2009. V. 76. P. 90.
289. Wintermeyer A., Möller I., Thevis M., Jübner M., Beike J., Rothschild M.A., Bender K. In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018 // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. P. 2141-2153.

290. Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine // *Forensic Sci. Int.* 2010. V. 200. P. 141-147.
291. Beuck S., Möller I., Thomas A., Klose A., Schlörer N., Schänzer W., Thevis M. Structure characterisation of urinary metabolites of the cannabimimetic JWH-018 using chemically synthesised reference material for the support of LC-MS/MS-based drug testing // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. P. 493-505.
292. Chimalakonda K.C., Moran C.L., Kennedy P.D., Endres G.W., Uzieblo A., Dobrowolski P.J., Fifer E.K., Lapoint J., Nelson L.S., Hoffman R.S., James L.P., Radomska-Pandya A., Moran J.H. Solid-Phase Extraction and Quantitative Measurement of Omega and Omega-1 Metabolites of JWH-018 and JWH-073 in Human Urine // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 6381-6388.
293. Brents L.K., Reichard E.E., Zimmerman S.M., Moran J.H., Fantegrossi W.E., Prather P.L. Phase I hydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-018 retain in vitro and in vivo cannabinoid 1 receptor affinity and activity // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e21917.
294. Möller I., Wintermeyer A., Bender K., Jübner M., Thomas A., Krug O., Schänzer W., Thevis M. Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls // *Drug Test. Anal.* 2011. V. 3. P. 609-620.
295. ElSohly M.A., Gul W., ElSohly K.M., Murphy T.P., Madgula V.L., Khan S.I. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine specimens for K2 (JWH-018) metabolites // *J. Anal. Toxicol.* 2011. V. 35. P. 487-495.
296. Moran C.L., Le V.-H., Chimalakonda K.C., Smedley A.L., Lackey F.D., Owen S.N., Kennedy P.D., Endres G.W., Ciske F.L., Kramer J.B., Kornilov A.M., Bratton L.D., Dobrowolski P.J., Wessinger W.D., Fantegrossi W.E., Prather P.L., James L.P., Radomska-Pandya A., Moran J.H. Quantitative Measurement of JWH-018 and JWH-073 Metabolites Excreted in Human Urine // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 4228-4236.
297. Москалева Н.Н., Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Джурко Ю.А., Ершов М.Б., Веденин А.Н., Изотов Б.Н. Идентификация и определение метаболитов активных компонентов курительных смесей (JWH-018, JWH-073 и CP 47, 497 C8) в моче и сыворотке крови. 2. Идентификация метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС (QTOF) // Тез. докл. всерос. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар. 2010. С. 144.
298. 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.

299. de Jager A.D., Warner J.V., Henman M., Ferguson W., Hall A. LC–MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine – An Australian perspective // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 897. P. 22-31.
300. Heltsley R., Shelby M.K., Crouch D.J., Black D.L., Robert T.A., Marshall L., Bender C.L., Depriest A.Z., Colello M.A. Prevalence of synthetic cannabinoids in U.S. Athletes: initial findings // *J. Anal. Toxicol.* 2012. V. 36. P. 588-593.
301. Yanes E.G., Lovett D.P. High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 909. P. 42-50.
302. Wohlfarth A., Scheidweiler K.B., Chen X., Liu H.F., Huestis M.A. Qualitative Confirmation of 9 Synthetic Cannabinoids and 20 Metabolites in Human Urine Using LC-MS/MS and Library Search // *Anal. Chem.* 2013. DOI: 10.1021/ac3037365.
303. Reid M.J., Derry L., Thomas K.V. Analysis of new classes of recreational drugs in sewage: Synthetic cannabinoids and amphetamine-like substances // *Drug Test. Anal.* 2013. DOI: 10.1002/dta.1461.
304. Chimalakonda K.C., Seely K.A., Bratton S.M., Brents L.K., Moran C.L., Endres G.W., James L.P., Hollenberg P.F., Prather P.L., Radomska-Pandya A., Moran J.H. Cytochrome P450-mediated Oxidative Metabolism of Abused Synthetic Cannabinoids Found in "K2/Spice": Identification of Novel Cannabinoid Receptor Ligands // *Drug Metab. Dispos.* 2012. V. 40. P. 2174-2184.
305. Chimalakonda K.C., Bratton S.M., Vi-Huyen Le, Kan Hui Yiew, Dineva A., Moran C.L., James L.P., Moran J.H., Radomska-Pandya A. Conjugation of Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073, Metabolites by Human UDP-Glucuronosyltransferases // *Drug Metab. Dispos.* 2011. V. 39. P. 1967-1976.
306. Seely K.A., Brents L.K., Radomska-Pandya A., Endres G.W., Keyes G.S., Moran J.H., Prather P.L. A Major Glucuronidated Metabolite of JWH-018 Is a Neutral Antagonist at CB1 Receptors // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. V. 25. P. 825-827.
307. Савчук С.А., Григорьев А.М. Метаболизм и установление маркеров приема синтетических каннабиноидов JWH-018, JWH-073, JWH-250 и CP-47,497 C8 хромато-масс-спектрометрическими методами // II Междунар. науч.-практ. конф. по аналитическим методам в токсикологии, судебно-медицинской экспертизе и наркологии «Аналитическая токсикология 2010». Москва. 2010.
308. Григорьев А.М., Савчук С.А., Мельник А.А., Джурко Ю.А., Ершов М.Б., Никитина Н.М., Носырев А.Е., Веденин А.Н., Изотов Б.Н. Идентификация и определение метаболитов активных компонентов курительных смесей (JWH-018, JWH-073 и CP 47, 497 C8) в моче и сыворотке крови. 1. Обработка проб и анализ методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС // Тез. докл. всерос. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар. 2010. С. 143.

309. Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Забирова И.Г., Суркова Л.А., Листвина В.П., Самойлик Л.В., Рожанец В.В. Идентификация и определение метаболитов активных компонентов курительных смесей (JWH-018, JWH-073 и CP 47, 497 C8) в моче и сыворотке крови. 3. Выявление метаболитов JWH-018 в моче крыс // Тез. докл. всерос. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар. 2010. С. 145.
310. Григорьев А.М., Веденин А.Н., Савчук С.А., Мельник А.А., Ершов М.Б., Джурко Ю.А., Симонов А.Б., Носырев А.Е., Изотов Б.Н., Рожанец В.В. Установление маркеров приема и характеристики основных метаболитов «синтетических каннабиноидов» JWH-018, JWH-073, JWH-250 и CP-47,497 C8 хромато-масс-спектрометрическими методами // Сб. материалов межрегиональной науч.-практ. конф. «Современные вопросы судебно-медицинской науки и практики». Екатеринбург. 2010. С. 229-239.
311. Григорьев А.М., Савчук С.А., Джурко Ю.А., Мельник А.А., Симонов А.Б., Рожанец В.В. Обнаружение метаболитов синтетических каннабимиметиков в биологических объектах // Сб. материалов межрегиональной науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы судебно-химических и химико-токсикологических исследований». Екатеринбург. 2011. С. 42-49.
312. Wiley J.L., Compton D.R., Dong Dai, Lainton J.A.H., Phillips M., Huffman J.W., Martin B.R. Structure-Activity Relationships of Indole- and Pyrrole-Derived Cannabinoids // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998. V. 285. P. 995-1004.
313. Aung M.M., Griffin G., Huffman J.W., Ming-Jung Wu, Keel C., Yang B., Showalter V.M., Abood M.E., Martin B.R. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB1 and CB2 receptor binding // Drug Alcohol Depend. 2000. V. 60. P. 133-140.
314. Atwood B.K., Huffman J., Straiker A., Mackie K. CP47,497-C8 and JWH073, commonly found in 'Spice' herbal blends, are potent and efficacious CB(1) cannabinoid receptor agonists // Eur. J. Pharmacol. 2011. V. 659. P. 139-145.
315. Rajasekaran M., Brents L.K., Franks L.N., Moran J.H., Prather P.L. Human metabolites of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 bind with high affinity and act as potent agonists at cannabinoid type-2 receptors // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2013. V. 269. P. 100-108.
316. Brents L.K., Gallus-Zawada A., Radomska-Pandya A., Vasiljevik T., Prisinzano T.E., Fantegrossi W.E., Moran J.H., Prather P.L. Monohydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-073 retain intermediate to high cannabinoid 1 receptor (CB1R) affinity and exhibit neutral antagonist to partial agonist activity // Biochem. Pharmacol. 2012. V. 83. P. 952-961.
317. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей («Spice») как маркеров употребления методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче и сыворотке крови. 1. JWH-073 // Сб. мат. III

Всерос. симпозиум "Разделение в аналитической химии и радиохимии": Краснодар. 2011. С. 238.

318. 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. № 6. С. 839-849.

319. Huffman J.W., et al. Structure–activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB2 receptor agonists // Bioorg. Med. Chem. 2005. V. 13. P. 89-112.

320. Hutter M., Broecker S., Kneisel S., Auwärter V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques // J. Mass. Spectrom. 2012. V. 47. P. 54-65.

321. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей («Spice») как маркеров употребления методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче и сыворотке крови. 2. JWH-210 // Сб. материалов III всерос. симпозиума "Разделение в аналитической химии и радиохимии". Краснодар. 2011. С. 239.

322. Huffman J.W., Szklennik P.V., Almond A., Bushell K., Selley D.E., He H., Cassidy M.P., Wiley J.L., Martin B.R. 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 4110-4113.

323. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Рожанец В.В. Идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей («Spice») как маркеров употребления методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче и сыворотке крови. 3. JWH-250 // Сб. материалов III всерос. симпозиума "Разделение в аналитической химии и радиохимии". Краснодар. 2011. С. 240.

324. Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Рожанец В.В. Идентификация метаболитов активного компонента курительных смесей JWH-250 методом хромато-масс-спектрометрии в моче // Тез. докл. XII Междунар. конф. "Физико-химические основы ионообменных процессов" ("ИОНИТЫ-2010"). Воронеж. 2010.

325. 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.

326. 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.
327. 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.
328. Григорьев А.М., Мельник А.А., Изотов Б.Н., Савчук С.А., Носырев А.Е., Симонов А.Б., Kavanagh P., Рожанец В.В. Детектирование метаболитов новых каннабимиметических индолов в биологических объектах // III Междунар. науч.-практ. конф. «Аналитическая токсикология, перспективы и современные тенденции развития». Москва. 2011.
329. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей («Spice») как маркеров употребления методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче и сыворотке крови. 4. JWH-251 // III Всерос. симпозиум "Разделение в аналитической химии и радиохимии": сб. материалов. Краснодар. 2011. С. 241.
330. Kim U., Jin M.J., Lee J., Han S.B., In M.K., Yoo H.H. Tentative identification of phase I metabolites of HU-210, a classical synthetic cannabinoid, by LC-MS/MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. V. 64. P. 26-34.
331. 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.
332. 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.
333. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Обнаружение и идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей ('Spice') в моче методами хромато-масс-спектрометрии. 2. AM-2233 // Тез. докл. второго съезда аналитиков России. Москва. 2013. С. 34.
334. Frost J.M., Dart M.J., Tietje K.R., Garrison T.R., Grayson G.K., Daza A.V., El-Kouhen O.F., Yao B.B., Hsieh G.C., Pai M., Zhu C.Z., Chandran P., Meyer M.D. Indol-3-ylcycloalkyl ketones: effects of N1 substituted indole side chain variations on CB(2) cannabinoid receptor activity // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. P. 295-315.
335. Malan T.P., Ibrahim M.M., Lai J., Vanderah T.W., Makriyannis A., Porreca F. CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003. V. 3. P 62-67.
336. Hammond B. New and emerging psychoactive substances – The global perspective. UNODC (United Nation Office on Drugs and Crime). Accessed from:

- http://www.unodc.org/documents/eastasiaandpacific//2012/07/smart-workshop/06_New_and_emerging_pschoactive_substances_The_global_perspective.pdf (September, 2012).
337. Falconer W.E., Hunter T.F., Trotman-Dickenson A.F. The thermal isomerization of cyclopropane // *J. Chem. Soc.* 1961. P. 609-611.
338. Frey H.M. The Gas Phase Pyrolyses of Some Small Ring Hydrocarbons // *Adv. Phys. Org. Chem.* 1966. V. 4. P. 147-193.
339. Bradley J.N., Frend M.A. Single-Pulse Shock Tube Studies of Hydrocarbon Pyrolysis. Part 1. – Pyrolysis of Cyclopropane // *Trans. Faraday Soc.* 1971. V. 67. P. 72-79.
340. Wong H.N.C., Moon-Yuen Hon, Chun-Wan Tse, Yu-Chi Yip, Tanko J., Hudlicky T. Use of Cyclopropanes and Their Derivatives in Organic Synthesis // *Chem. Rev.* 1989. V. 89. P. 165-198.
341. R.R. Baker. Temperature distribution inside a burning cigarette // *Nature.* 1974. V. 247 P. 405-406.
342. 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. 147 p. (публикация канд. диссертации).
343. Cheminat A., Brouillard R. PMR investigation of 3-O-(β -d-glucosyl)malvidin structural transformations in aqueous solutions // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 44-57.
344. Григорьев А.М., Kavanagh P., Савчук С.А., Михура И.В., Формановский А.А. Идентификация сопутствующих соединений и продуктов пиролиза синтетического каннабимиметика UR-144 // Тез. докл. Второго съезда аналитиков России. Москва. 2013. С. 32.
345. 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. P. 683–692.
346. Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids // *Drug Test Anal.* 2012. V. 4. P. 745-753.
347. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Обнаружение и идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей ('Spice') в моче методами хромато-масс-спектрометрии. 1. UR-144, АКВ-48, РВ-22 и РВ-22F // Тез. докл. Второго съезда аналитиков России. Москва. 2013. С. 33.
348. 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.
349. Григорьев А.М., Мельник А.А., Kavanagh P., Савчук С.А. Обнаружение и идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей ('Spice') в моче методами

хромато-масс-спектрометрии. 3. АВ-001 // Тез. докл. Второго съезда аналитиков России. Москва. 2013. С. 35.

350. 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.

351. Григорьев А.М., Савчук С.А., Симонов А.Б., Kavanagh P. Идентификация метаболитов и других маркеров приема новых синтетических каннабимиметиков в моче // 1-я международная научно-практическая конференция «Современная химико-токсикологическая экспертиза» (АСТЕ'2013). 2013.

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

353. Jin M.J., Lee J., In M.K., Yoo H.H. Characterization of in vitro metabolites of CP 47,497, a synthetic cannabinoid, in human liver microsomes by LC-MS/MS // J. Forensic Sci. 2013. V. 58. P. 195-199.

354. 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 // Сорбционно-хроматографические процессы. 2012. № 12. С. 97-104.

Приложение

Аппаратура

1. Газовая хроматография (ГХ).

ГХ(I). Газовый хроматограф 6890 (Agilent Technologies) с пламенно-ионизационным и термоионным детекторами, соединенными с делителем потока элюата. Давление в делителе составляло 2.5 psi (азот).

Газ-носитель азот, пробу (0.2 мкл) вводили автоматическим пробоотборником 7683В.

Температура инжектора - 270°C

Температура обоих детекторов - 330°C

Питание ПИД: водород (30 мл/мин), воздух (400 мл/мин), поддувочный газ (азот, 25 мл/мин).

Питание ТИД: водород (5 мл/мин), воздух (400 мл/мин), поддувочный газ (азот, 25 мл/мин).

ГХ(II). Газовый хроматограф Varian 3900 (Varian Inc.).

Газ-носитель азот, объем вводимой пробы 1 мкл.

Температура инжектора - 270°C

Температура ПИД: 300°C

Питание ПИД: водород (30 мл/мин), воздух (300 мл/мин), поддувочный газ (азот, 25 мл/мин).

2. Газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХ-МС).

ГХ-МС(I). Газовый хроматограф 6890 (Agilent Technologies) соединенный с квадрупольным масс-спектрометром 5973.

ГХ-МС(II). Газовый хроматограф 6850 (Agilent Technologies) соединенный с квадрупольным масс-спектрометром 5973.

ГХ-МС(III) Газовый хроматограф 6890 (Agilent Technologies) соединенный с квадрупольным масс-спектрометром 5975.

ГХ-МС (IV) Газовый хроматограф 7890 (Agilent Technologies) соединенный с гибридным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром 7200.

Газ-носитель гелий, скорость потока 1 мл/мин (0.8 мл/мин для колонки EVDX-5ms).

Пробу (0.2 мкл) вводили автоматическим пробоотборником 7683В без сброса (если в тексте не указано иное).

Температура инжектора - 270°C.

Масс-спектрометры были настроены на режим электронной ионизации (70 эВ), температуры устройства ввода в масс-спектрометр, ионного источника и квадрупольного масс-фильтра составляли 230 и 150°C соответственно.

Первые 3 стадии температурных программ были одинаковы: 50°C (0.5 мин), 99°C/мин (100°C, 1 мин). Остальные стадии определялись видом колонки и режимом:

Колонка	Режим I	Режим II	Режим III
HP-5ms EVDX-5ms VF-5ms	35°C/мин (300°C), 15 мин.	15°C/мин (280°C), 25 мин.	60°C/мин (320°C), 10 мин.
DB-17ms	20°C/мин (300°C), 15 мин.	9°C/мин (280°C), 25 мин.	40°C/мин (320°C), 10 мин.

3. *Высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДМД).*

ВЭЖХ-ДМД. Модульная ВЭЖХ система 1200 с бинарным насосом G1312A, термостатом колонок G1316B, дегазатором G1379B и диодно-матричным детектором G1315B(Agilent Technologies).

Колонки: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 мм, 5 мкм) или Zorbax SB-C18 (4.6 × 150 мм, 5 мкм) с форколками (4.6 × 12.5 мм), заполненными соответствующими сорбентом, термостатированы при 25°C, скорость потока элюента 1 мл/мин.

4. *Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС)*

ЖХ-МС/МС. Модульная система 1200 с микропоточковым бинарным насосом и тандемным трехквадрупольным масс-спектрометром 6460 (Agilent Technologies).

Колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 мм × 150 мм, 3.5 мкм, Agilent), термостатирована при 40°C.

Скорость потока элюента 0.25 мл/мин.

Объем вводимой пробы 5-10 мкл.

Масс-спектры регистрировали в режиме положительной электрораспылительной ионизации; осушающий газ азот, 300°C (7 л/мин). Напряжения на капилляре, наконечнике и фрагменторе составляли 3500, 500 и 80 В, соответственно; энергия столкновений 20 В.

5. *ЯМР-спектрометрия.*

Спектры регистрировали на спектрометре Bruker AVANCE DRX600 при 600.13 МГц (¹H) и 150.92 МГц (¹³C) в CDCl₃. Отнесения сигналов выполняли методами DEPT, H/C-NMQC и регистрацией спектров ¹³C без спиновой H/C-развязки.

6. ИК-спектрометрия.

Спектры (область 4000-400 см^{-1}) регистрировали на спектрометре FTS Scimitar 2000 (Digilab) в таблетках KBr. В случае работы с соединениями, очищенными методом ВЭЖХ, применяли следующую методику: выделенную фракцию разбавляли водой в 3 раза и экстрагировали в хлороформ. После полного упаривания растворителя в струе воздуха при температуре не выше 45°C сухой остаток растворяли в 100-200 мкл хлороформа и наносили на порошок KBr, после чего упаривали без нагревания при перемешивании и готовили таблетку.

7. УФ-спектроскопия.

Спектры (область 200-900 нм) регистрировали на спектрофотометре 8453 (Agilent Technologies) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см.

Основные методы обработки проб мочи

Кислотная экстракция. К 3 мл мочи добавляли соляную кислоту (конц.) до pH 1.5-2 и экстрагировали таким же объемом хлороформа. После центрифугирования органическую фазу отделяли и упаривали досуха при температуре не выше 45°C. Сухой остаток растворяли в соответствующем растворителе (300 мкл) или дериватизировали.

Основная экстракция. К 3 мл мочи добавляли водный раствор аммиака до pH 9-10 и экстрагировали таким же объемом хлороформа. После центрифугирования органическую фазу отделяли и упаривали досуха при температуре не выше 45°C. Сухой остаток растворяли в соответствующем растворителе (300 мкл) или дериватизировали.

Кислотное деконъюгирование (гидролиз). К 2.5 мл мочи добавляли 0.25 мл соляной кислоты (конц.) и нагревали в течение 60 мин при температуре 90–95°C. Затем охлаждали и подстраивали pH образцов водным раствором аммиака (конц.) до 9-10. Смесь экстрагировали хлороформом (3 мл), центрифугировали и отделенную органическую фазу упаривали досуха в токе азота при температуре не выше 45°C. Сухой остаток растворяли в 100 мкл элюента (для ЖХ-МС/МС), в 50 мкл этилацетата или дериватизировали (для ГХ-МС).

Ферментативное деконъюгирование. К 2.5 мл мочи добавляли 50 мкл β -глюкуронидазы (тип НР-2, из *Helix Pomatia*, Sigma-Aldrich) и 1 мл фосфатного буфера (0.8 М, pH 5.5). Смесь инкубировали при 37°C в течение 24 ч, после чего подстраивали pH :

- добавками 1 мл карбонатного буфера (3М, pH 10) или водным раствором аммиака до pH 9-10 (основная экстракция);

- добавками соляной кислоты до pH 1.5-2 (кислотная экстракция).

Смесь экстрагировали хлороформом дважды (3 мл), центрифугировали, объединенные экстракты упаривали и далее обрабатывали так же, как и при кислотном деконъюгировании.

Дериватизация

Для дериватизации использовали 50 мкл раствора, полученного на предыдущей стадии.

Триметилсилилирование (ТМС) проводили в 50 мкл смеси этилацетата и *N,O*-бис(триметилсилил)трифторацетамида, содержащего 1% триметилхлорсилана (BSTFA, Acros Organics), 1:1 об. при 60°C в течение 30 мин.

Ацетилирование (АС) проводили в 100 мкл смеси уксусного ангидрида и пиридина (1:1 об.) при 70°C в течение 30 мин. Смесь упаривали досуха в токе азота при температуре не выше 45°C или в вакуумном испарителе (Concentrator 5301, Eppendorf AG) и сухой остаток растворяли в этилацетате (50 мкл).

Трифторацетилирование (ТФА) проводили в 100 мкл смеси трифторуксусного ангидрида и этилацетата (1:1 об.) при 50°C в течение 30 мин. Смесь упаривали досуха в токе азота при температуре не выше 45°C и сухой остаток растворяли в этилацетате (50 мкл).

Метилирование (Ме) проводили в смеси сухого диметилсульфоксида (100 мкл) и раствора гидроксида тетраметиламмония в метаноле (5 мкл) при непрерывном перемешивании в течение 2 мин, после чего добавляли 20 мкл метилиодида и снова перемешивали 10 мин. Затем добавляли водный раствор аммиака (0.1 М, 2 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 мл). Отделенную органическую фазу промывали 2 мл раствора аммиака такой же концентрации и упаривали досуха. Остаток растворяли в 50 мкл этилацетата или силилировали.