

УДК 340.67

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЗМА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИНОИДА THJ-2201 В МОЧЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Д.Ю. Апушкин, Т.Л. Малкова

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Минздрава России, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2
E-mail: apushkinjob@gmail.com

В предложенной статье затронуты вопросы изучения метаболизма новых синтетических каннабиноидов; в работе представлены данные о синтетическом каннабиноиде 3-(Нафталин-1-илоксометил)-1-(5-фторпентил)-1H-индазол (THJ-2201), а также продуктах его метаболизма в организме лабораторных крыс стока линии Wistar, а именно, приведены масс-спектры и хроматограммы нативного вещества (THJ-2201), полученные с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективной детекцией (ВЭЖХ-МС) и газовой хроматографии с масс-селективной детекцией (ГХ-МС). В работе представлена комплексная методика качественного определения каннабимиметика THJ-2201 и методика получения модели метаболического профиля для исследуемого вещества, которая может быть полезной для задач качественного определения и обнаружения новых психоактивных веществ в биологических объектах для целей судебно-химического анализа. **Целью** настоящей работы являлась разработка методики определения исследуемого вещества (THJ-2201) и его метаболитов в моче лабораторных животных, а также исследование особенностей метаболизма синтетических каннабиноидов в целом. **Материалы и методы.** Для проведения эксперимента было использовано следующее оборудование: жидкостной хроматограф фирмы "Shimadzu LCMS-8050" в комплексе с масс-селективным детектором. Тип детектора – тройной квадруполь с двойным источником ионизации (химическая ионизация при атмосферном давлении и электроспрей). Разделение веществ происходило в хроматографической колонке (материал – нержавеющая сталь, характеристики – 150 * 3,0 мм, Luna 3iC18(2), 100Å). Сорбент – обращённо-фазный. Исследования проведены на газовом хроматографе "Agilent 7890A" с масс-спектрометром Agilent 5975C и колонкой 103 неполярной HP-5ms 28 м × 0,25 мм. Животные – половозрелые самцы белых лабораторных крыс стока линии Wistar, возраст 4–6 месяцев, масса 190–230 грамм. **Результаты и обсуждение.** В результате проведённых исследований была разработана комплексная методика определения синтетического каннабимиметика THJ-2201 и его метаболитов в моче лабораторных животных, получены хроматограммы и масс-спектры метаболического профиля животных с помощью методов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС, а также установлена значительная схожесть метаболических профилей исследуемого вещества у человека и животных. **Заключение.** Были сделаны выводы о пригодности предложенной комплексной методики анализа при данных условиях оснащённости лаборатории и о значительной степени межвидовой схожести метаболических профилей человека и лабораторной крысы для веществ, химически близких с исследуемым.

Ключевые слова: 3-(Нафталин-1-илоксометил)-1-(5-фторпентил)-1H-индазол, THJ-2201, лабораторные животные, метаболиты, синтетические каннабиноиды, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС

Для цитирования:

Апушкин Д.Ю., Малкова Т.Л.
ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЗМА
И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИНОИДА THJ-2201
В МОЧЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.
Фармация и фармакология. 2017;5(4):318-330.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-4-318-330

© Апушкин Д.Ю., Малкова Т.Л., 2017.

For citation:

Apushkin D. Yu., Malkova T.L.
CHARACTERISTICS OF METABOLISM AND WORKING
OUT THE METHODS OF DETERMINATION
OF SYNTHETIC CANNABINOID THJ-2201
IN THE URINE OF LABORATORY ANIMALS.
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(4):318-330.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-4-318-330

CHARACTERISTICS OF METABOLISM AND WORKING OUT THE METHODS OF DETERMINATION OF SYNTHETIC CANNABINOID THJ-2201 IN THE URINE OF LABORATORY ANIMALS

D.Yu. Apushkin, T.L. Malkova

Perm State Pharmaceutical Academy,
2, Polevaya St., Perm, Russia, 614990
E-mail: perm@pfa.ru

*The proposed article touches upon the study of metabolism of new synthetic cannabinoids. In the work the data on synthetic cannabinoid 3-(Naftalin-1-yloxomethyl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indazole (THJ-2201), as well as the products of its metabolism in the laboratory rats of the Wistar line are given, i. e. Mass spectra and chromatograms of the native substance (THJ-2201) obtained by high-performance liquid chromatography with mass-selective detection (HPLC-MS) and gas chromatography with mass-selective detection (GC-MS) are given. The paper presents a complex technique for qualitative determination of cannabimimetics THJ-2201 and methods for obtaining a metabolic profile model for the test substance that can be useful for the tasks of qualitative detection and detection of new psychoactive substances in biological objects for the purposes of forensic analysis. **The aim** of this work was to develop methods for determination of the test substance (THJ-2201) and its metabolites in the urine of laboratory animals, as well as the study of the metabolic characteristics of synthetic cannabinoids on the whole. **Materials and methods.** The following equipment was used for the experiment: a liquid chromatograph from the firm "Shimadzu LCMC-8050" in combination with a mass-selective detector. The detector type is a triple quadrupole with a double ionization source (chemical ionization at atmospheric pressure and electrospray). The separation of the substances occurred in a chromatographic column (the material is stainless steel, the characteristics are: 150 * 3.0 mm, Luna 3uC18 (2), 100A). The Sorbent is reversed-phase. The investigations were carried out on Agilent 7890A gas chromatograph with Agilent 5975C mass spectrometer and a 103 polar HP-5ms column of 28 m × 0.25 mm. The animals were mature male white laboratory rats of the Wistar line, aged 4–6 months, weighing 190-230 grams. **Results and discussion.** As a result of the studies, a comprehensive methodology for determining the synthetic cannabimimetics of THJ-2201 and its metabolites in the urine of laboratory animals was developed, chromatograms and mass spectra of the metabolic profile of animals were obtained by HPLC-MS and GC-MS methods, and the similarity of the metabolic profiles of the studied substances in humans and animals was determined. **Conclusion.** The conclusions were made about the suitability of the proposed complex analysis methodology under the given laboratory conditions and the significant degree of interspecific similarity of human metabolic profiles and laboratory rats' for substances chemically close to the studied.*

Keywords: 3-(Naphthalen-1-yloxomethyl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indazole, THJ-2201, laboratory animals, metabolites, synthetic cannabinoids, HPLC-MS, GC-MS

Введение. Одной из самых острых проблем, с которыми столкнулось человечество за последние два десятилетия, является проблема нелегального синтеза и оборота новых психоактивных веществ. По всему миру растет число веществ, которые используются в рекреационных целях. К сожалению, Россия не стала исключением, на ее территории распространение получили десятки новых веществ, используемых в целях одурманивания. В каждом государстве по-своему борются с этой проблемой, что связано с особенностями законодательства в сфере ограничения оборота наркотических средств. Безусловно, в нашей стране борьба с незаконным оборотом одурманивающих веществ активно ведётся, однако зачастую проходит довольно большой отрезок времени от момента обнаружения нового синтетического вещества до его запрета к синтезу, производству и т.д. через включение в Списки контролируемых веществ.

Группа ученых в Пермской государственной фармацевтической академии уже более 7 лет проводит исследования новых психоактивных веществ, опираясь на действующее в стране законодатель-

ство [1, 2]. В России ограничение оборота новых психоактивных веществ возможно через отнесение к «аналогам наркотических средств и психотропных веществ», определение которых приведено в Федеральном законе № 3-ФЗ от 08.01.1998 г. Эта группа включает в себя: аналоги наркотических средств и психотропных веществ, запрещенные для оборота в Российской Федерации, вещества синтетического или естественного происхождения, не включенные в Перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации, химическая структура и свойства которых сходны с химической структурой и со свойствами наркотических средств и психотропных веществ, психоактивное действие которых они воспроизводят.

Накопленный опыт позволил нам сформировать «Методические рекомендации по исследованию новых психоактивных веществ и процедуре отнесения их к аналогам наркотических средств и психотропных веществ». Результаты исследований неоднократно докладывались на конференциях и форумах,

находили поддержку представителей правоохранительных органов и экспертных служб.

Данные рекомендации разработаны для объектов исследования, представляющих собой вещественные доказательства (субстанции, растительные смеси, пластичные массы и др.), вероятно содержащие аналоги наркотических средств или психотропных веществ. Разработанный алгоритм исследования включает химическую и фармакологическую части. В Методических рекомендациях подробно описано, почему используется такой подход. Однако, объектами экспертного исследования, проводимого с целью обнаружения новых психоактивных веществ, могут быть не только вещественные доказательства небиологического характера, но и биологические жидкости, что наиболее востребовано при проведении медицинского освидетельствования живых лиц, употребляющих одурманивающие вещества.

Чтобы установить факт употребления запрещённых веществ, а впоследствии и определить конкретную структуру исследуемого психоактивного вещества, применяются хроматографические методы анализа биологических объектов, в том числе ВЭЖХ-МС (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием), и ГХ-МС (газовая хроматография с масс-селективным детектированием) [3]. Одним из «самых ярких» представителей данного класса психотропных веществ является 3-(Нафталин-1-илоксометил)-1-(5-фторпентил)-1H-индазол, известное под тривиальным названием THJ-2201 или AM(N)-2201. «Прародителем» исследуемого вещества можно считать другое психоактивное вещество, известное под названием JWH-018 (IUPAC: (1-пентил-3-(1-нафтоил) индол)), отличие между ними заключается в замене индольного ядра на индольное [4]. Структурная формула исследуемого вещества представлена на рисунке 1.

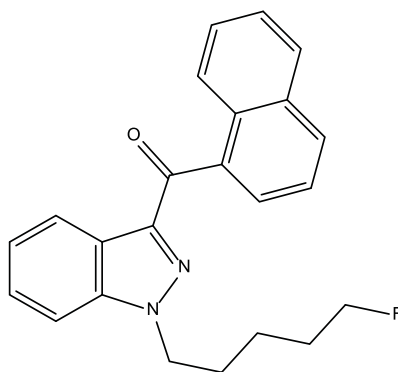


Рисунок 1 – Структурная формула 3-(нафталин-1-илоксометил)-1-(5-фторпентил)-1H-индазола (THJ-2201)

По своим фармакологическим свойствам данное вещество является полным агонистом центральных CB1 и периферических CB2 рецепторов [5]. После приёма вещества наблюдаются следующие эффекты: выраженная седация, потеря контроля мелкой и крупной моторики гладких мышц, трудности с ориентацией в пространстве, снижение артериального давления, тошнота, нарушения психики и другие [6].

Целью данного исследования является разработка методики определения исследуемого вещества THJ-2201 и его метаболитов в моче лабораторных животных; выявление набора характерных метаболитов указывает на факт употребления запрещённого вещества; кроме того, изучение метаболизма новых синтетических каннабимиметиков в целом также является целью данной работы.

Для относительно быстрого выполнения качественного анализа метаболических профилей, вновь синтезированных психоактивных веществ можно использовать метаболические камеры для лабораторных животных [7].

В предложенном исследовании на рассмотрение представлены некоторые методические рекомендации для применения методов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС

для качественного определения метаболитов нового синтетического каннабимиметика THJ-2201 в биологической жидкости (моче) лабораторных крыс.

Материалы и методы. Исследуемое вещество.

Образец вещества предоставлен правоохранительными органами Министерства Внутренних Дел Российской Федерации на базу Регионального Исследовательского Центра «Фарматест» для установления химической структуры, определения степени химической близости к веществам, поименованным в Списке I наркотических средств и психотропных веществ, а также установления аналогичности уже запрещённым веществам.

Лабораторные животные. Эксперименты были проведены на белых половозрелых самцах лабораторных крыс стока линии Wistar в возрасте 4–6 месяцев и массой 180–250 грамм. Животные содержались на территории вивария ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России в отдельной комнате, при температуре воздуха 22±2 °С и влажности воздуха 55–65%. Диета – стандартная для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92) согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96).

Схема эксперимента. Для получения контрольной и постэкспозиционной биожидкости у одного и того же животного, что необходимо для сопоставления результатов, при планировании эксперимента использовалась следующая схема рассадки крыс. Животное помещалось в метаболическую камеру фирмы «Open Science» на 24 часа, с неограниченным доступом к воде и полном отсутствии пищи, для сбора контрольной мочи. После этого животное помещалось в «домашнюю» клетку для приёма пищи на 5–6 часов. Далее животному внутривенно [8] вводили исследуемое вещество в 0,9% растворе натрия хлорида в дозе 10 мг/кг (доза установлена экспериментальным путём при проведении дополнительных исследований на базе РИЦ «Фарматест» в рамках проведения экспертизы объекта, включавшего исследуемое вещество). После приёма вещества животное вновь помещалось в метаболическую камеру на 24 часа для сбора постэкспериментальной биожидкости, в которой и проводился поиск ТНЖ-2201 и его метаболитов согласно методикам, описанным ниже.

Оборудование для проведения эксперимента

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для проведения эксперимента было использовано следующее оборудование: жидкостной хроматограф фирмы “Shimadzu LCMC-8050” в комплексе с масс-селективным детектором. Тип детектора – тройной квадруполь с двойным источником ионизации (химическая ионизация при атмосферном давлении и электроспрей). Разделение веществ происходило в хроматографической колонке (материал – нержавеющая сталь, характеристики – 150 * 3,0 мм, Luna 3uC18(2), 100A). Сорбент – обращённо-фазный.

Газовая хроматография (ГХ). Газовый хроматограф “Agilent 7890A” с масс-спектрометром Agilent 5975C, колонка 103 неполярная HP-5ms 28 м * 0,25 мм. В качестве газа носителя используется гелий, который подаётся со скоростью 1,2 мл/мин, режим работы – split/splitless, деление потока – 1:10, задержка включения – после ввода пробы 1 минута. Температура интерфейса 280°C, температура инжектора 250°C, программируемая температура колонки – 70(1)-30-250-3-280-10-300. Режим работы детектора – селективный ионный мониторинг; интервал – 9–13 минут; напряжение на умножителе выше величины автоматической настройки на 200 В.

Подготовка объектов для исследования

Приготовление стандартного раствора. Для подбора условий и времени выхода вещества на экспериментальном оборудовании был приготовлен стандартный раствор вещества ТНЖ-2201 в ацетонитриле в концентрации 1 нг/мл. Далее 0,5 мл полученного раствора помещалось в хроматографическую виалку. 5 мкл раствора вводили в инжектор хроматографа.

Пробоподготовка для ВЭЖХ-МС. В пробирку с закрывающейся крышкой вместимостью 10 мл вносили 3 мл анализируемой мочи, добавляли 0,5 мл 5М раствора NaOH и выдерживали 2 минуты при 50°C. В чистую сухую пробирку объёмом 10 мл вносили 3 мл гидролизата мочи. Гидролизат подкисляли до pH 2–3 добавлением 250–350 мкл концентрированной соляной кислоты. В пробирку вносили 3 мл смеси изоктан-этилацетат (7:1). Помещали пробирку на 10 минут на орбитальный шейкер. Центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин. Отделяли органический слой, переносили в стеклянную пробирку для упаривания и упаривали в токе горячего воздуха. К экстракту добавляли 500 мкл ацетонитрила, встряхивали на вибромиксере 2–3 сек и анализировали.

Условия хроматографирования для ВЭЖХ-МС. Nebulizing Gas Flow – 3 L/min, Heating Gas Flow – 10 L/min, Interface Temperature – 300°C, DL Temperature – 25°C, Heat Block Temperature – 400°C, Drying Gas Flow – 10 L/min [9].

Регистрацию и обработку хроматографической информации осуществляли с помощью программного обеспечения LCsolution (ver. 1.25) [10].

Пробоподготовка и дериватизация для ГХ-МС. Во флакон помещали 2 мл мочи, прибавляли 150 мкл 50% раствора NaOH и перемешивали. Флакон плотно закупоривали и помещали в термоблок на 10 минут при 60°C. После охлаждения флакон вскрывали, добавляли стандарт гексенала 100 мкл 0,2 мг/мл, прибавляли 6Н раствор HCl до pH 2–3 и экстрагировали смесью н-гексан-этилацетат (7:1) порцией 5 мл. Верхний слой отделяли, выпаривали до сухого остатка в токе тёплого воздуха (40°C). К сухому остатку прибавляли 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 2 мг карбоната калия, герметично закрывали и нагревали при 60°C в течении 60 минут в термоблоке. Флакон охлаждали. Раствор переносили в чистый флакон и выпаривали в токе азота. Сухой остаток дериватизированного образца растворяли в 100 мкл этилацетата и 1–2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра [11].

Регистрацию и обработку хроматографической информации осуществляли с помощью программного обеспечения AMDIS GC/MS Analysis (ver. 2.66) [12].

Результаты. В результате проделанной работы, были получены следующие данные, подтверждающие гипотезу о схожести метаболических профилей после приёма вещества ТНЖ-2201 у человека и животного.

Анализ стандартного образца проводился с помощью метода MRM-переходов. Product ion – 361.40, Precursor – 233.30, Collision energy – 15. Хроматограмма стандартного раствора представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 – Стандартный раствор THJ-2201. MRM-анализ

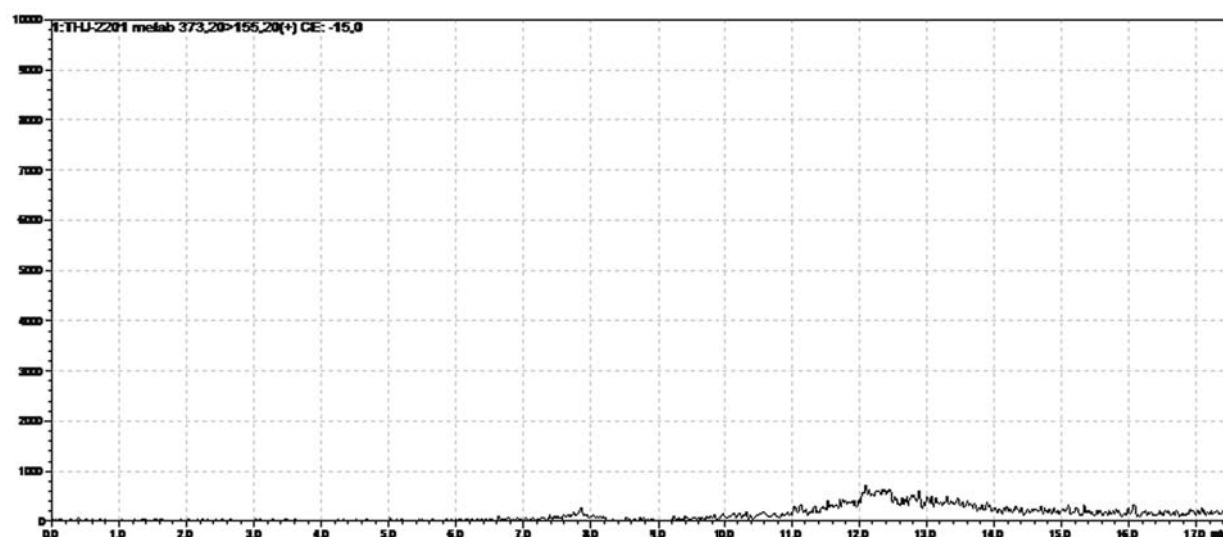


Рисунок 3 – Образец биологической жидкости лабораторного животного до приёма THJ-2201.
Метод MRM-переходов

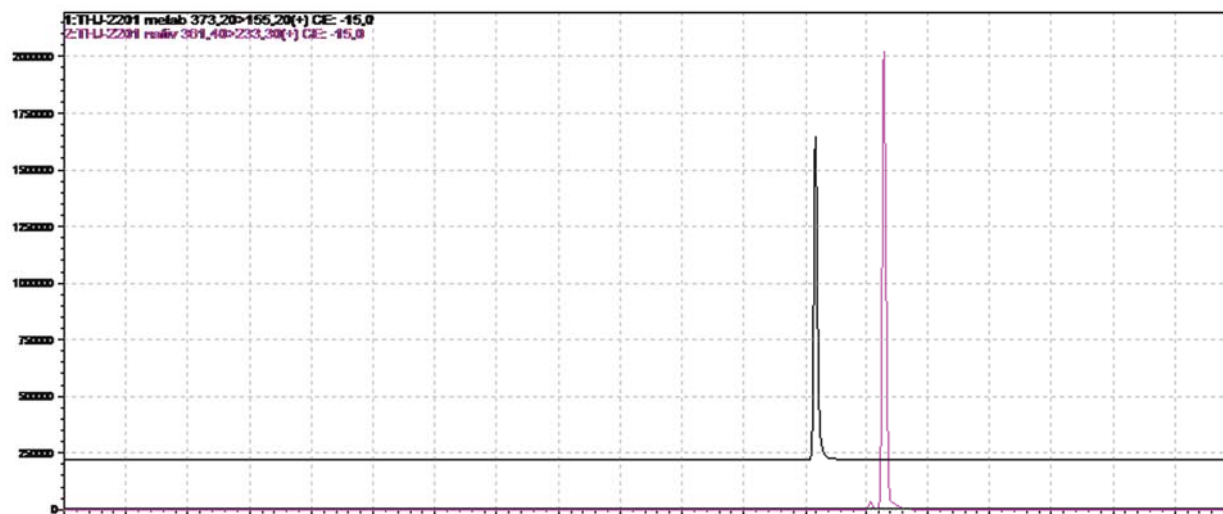


Рисунок 4 – Образец биологической жидкости лабораторного животного после приёма THJ-2201.
Метод MRM-переходов

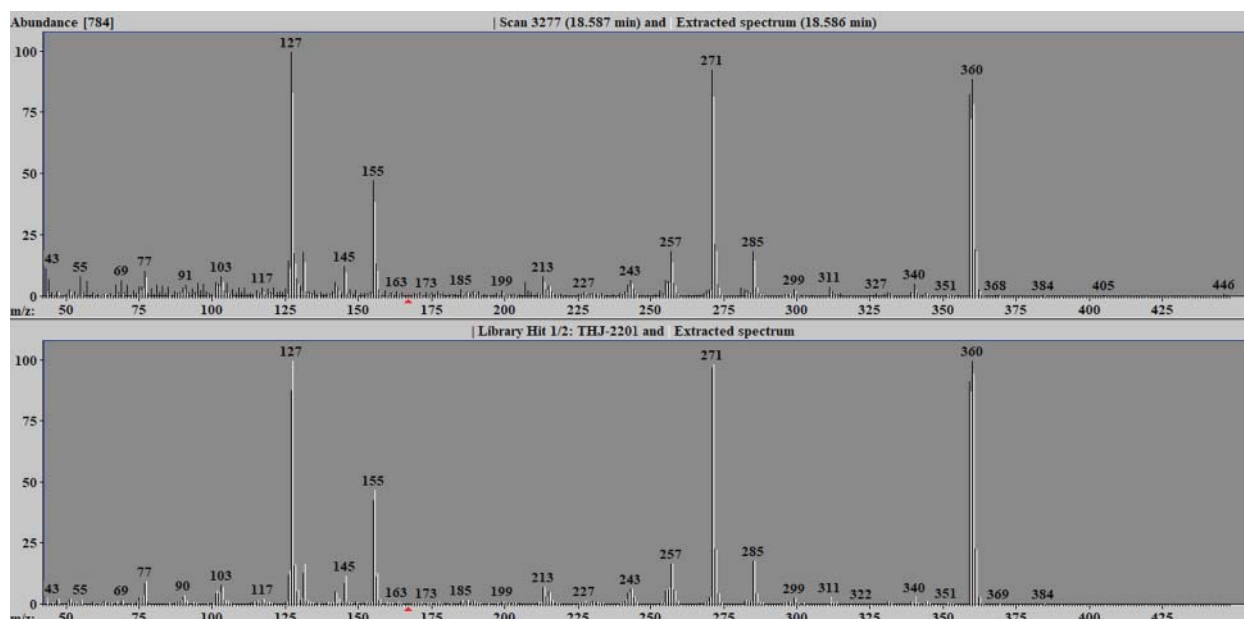


Рисунок 5 – Масс-спектр пика, характерного для нативного вещества THJ-2201.
 Сверху – экспериментальный (лабораторное животное), снизу – библиотечный (человек)

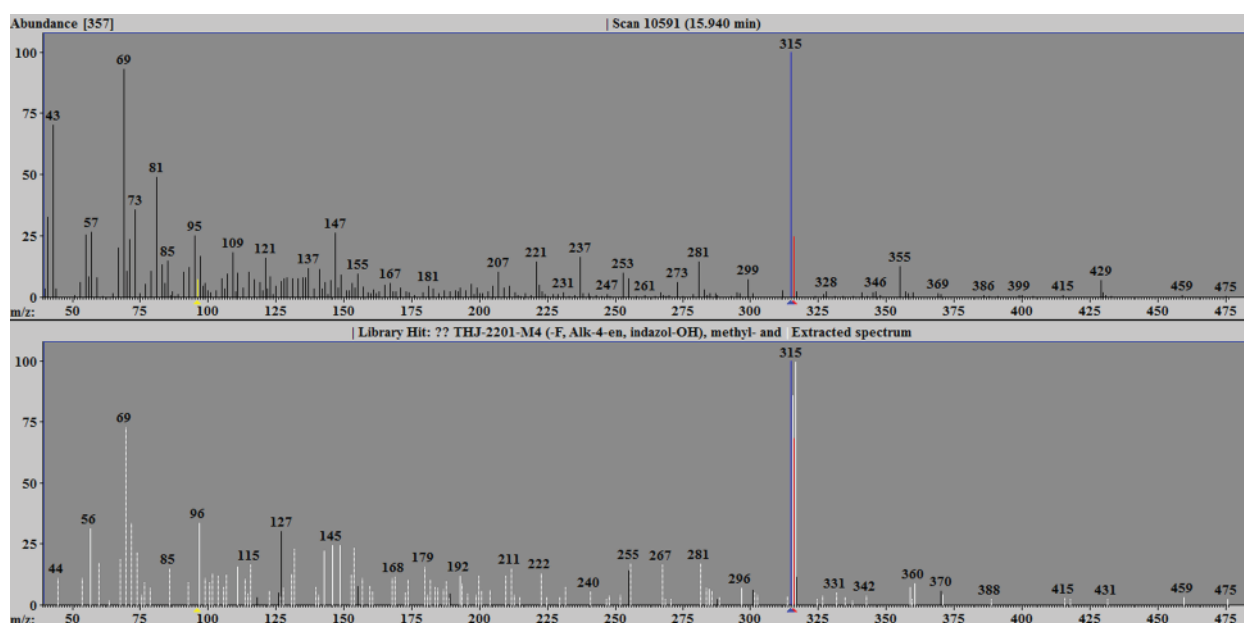


Рисунок 6 – Масс-спектр пика, характерного для метаболита вещества THJ-2201.
 Сверху – экспериментальный (лабораторное животное), снизу – библиотечный (человек)

Исследование биологической жидкости лабораторных животных.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. При исследовании биожидкости животного использовали метод сравнения с собственным контролем, а именно: мочу собирали дважды – до и после введения вещества (рис. 4 и рис. 3, соответственно). Для анализа использовался метод MRM-переходов. Для нативного вещества характерны следующие параметры: Product ion – 361.40, Precursor – 233.30, Collision Energy – 15.0. Для метаболита характерны следующие параметры: Product ion – 373.20, Precursor – 155.20, Collision Energy – 15.0. Из полученных данных следует, что в «контроль-

ной моче» для данного MRM-перехода, совпадений при хроматографировании найдено не было (максимальная интенсивность пиков – 720 ед.), тогда как на хроматограмме биожидкости, собранной после приёма вещества, отчётливо виден пик нативного вещества, а также пик искомого метаболита, соответствующих каждый своему MRM – переходу (максимальная интенсивность – 1 425 000 ед.). Хроматограммы исследуемых образцов биологической жидкости лабораторных животных до и после приёма вещества THJ-2201 представлены на рисунках 3 и 4 соответственно.

Газовая хроматография. В моче лабораторного животного, после приёма вещества, обнаружены ха-

рактерные пики для нативного вещества и одного из метаболитов вещества THJ-2201 с масс-спектрами, совпадающими с масс-спектрами человеческих образцов, взятых из баз данных программного комплекса AMDIS GC/MS Analysis (ver. 2.66.). Масс-спектры исследованного образца для нативного соединения и его метаболита представлены в сравнении с «человеческими» результатами на рисунках 5 и 6 соответственно.

Обсуждение. Из полученных данных, можно сделать следующие выводы:

ВЭЖХ-МС

- время выхода вещества в стандартном образце (при заданном MRM-переходе) соответствует времени выхода нативного вещества в экспериментальном образце, что свидетельствует о том, что с высокой долей вероятности – это одно и то же вещество;
- при сравнении хроматограмм контрольной мочи и постэкспериментальной, можно сделать вывод, что никаких эндогенных веществ, соответствующих предложенным MRM-переходам, не обнаружено;
- на хроматограмме постэкспериментальной мочи отчетливо видны пики нативного вещества THJ-2201 и его метаболита, соответствующие предложенным MRM-переходам.

ГХ-МС

- качественных отличий между ионными составами

метаболитов нового синтетического каннабиноида THJ-2201 у человека и лабораторной крысы не выявлено;

- установлено существенное сходство между ионами с максимальной интенсивностью в разных метаболических профилях;
- параметры детектирования метаболитов зависят от частных условий хроматографирования.

Заключение. Учитывая полученные результаты эксперимента, можно сделать вывод о пригодности предложенной комплексной методики анализа при данных условиях оснащённости лаборатории (наличие лабораторных животных, разновидность хроматографического оборудования).

Также, с учётом ранее выполненных исследований [13, 14] можно сделать вывод о значительной степени межвидовой схожести метаболических профилей человека и лабораторной крысы для веществ, химически сходных с исследуемым.

С точки зрения авторов, исследование является перспективным, так как при внедрении в экспертную практику может существенно сократить время внесения нового психоактивного вещества в перечень запрещённых (Список I НС и ПВ), позволяя получать модель метаболизма исследуемого вещества без субъекта отравления, лишь на основе биожидкостей лабораторных животных.

Introduction. One of the most acute problems faced by mankind in the past two decades is the problem of illegal synthesis and trafficking of new psychoactive substances. Around the world, the number of substances used for recreational purposes is growing. Unfortunately, Russia has not become an exception, scores of new substances used for the purpose of stupefying have been distributed on its territory. Each government struggles with this problem in its own way, which is connected with the peculiarities of the legislation in the sphere of restriction of narcotic drugs turnover. Of course, in our country, the fight against the illegal trafficking of intoxicating substances is actively conducted, but it often takes a fairly long time to pass since the discovery of a new synthetic substance to the prohibition against its synthesis, production, etc. through the inclusion into the Lists of the substances being controlled.

A group of scientists at Perm State Pharmaceutical Academy has been conducting research on new psychoactive substances for over 7 years, relying on the current legislation in the country [1, 2]. In Russia, the restriction of the turnover of new psychoactive substances is possible through reference to “analogues of narcotic drugs and psychotropic substances”, the definition of which is given in Federal Law No. 3-FZ of 08.01.1998. This group comprises the analogues of narcotic drugs and psychotropic substances prohibited against trafficking in the Russian Federation, substances of synthetic or natural origin not included in the List of narcotic drugs, psychotropic substances and their precursors subject to control in the Russian Federation, the chemical structure and properties of which are similar to the chemical structure and prop-

erties of narcotic drugs and psychotropic substances and the psychoactive effect which they produce.

The accumulated experience enabled us to formulate “Methodological recommendations for the study of new psychoactive substances and the procedure for classifying them as analogues of narcotic drugs and psychotropic substances.” The results of the research were repeatedly reported at the conferences and forums more than once, being supported by representatives of law enforcement agencies and expert services.

These recommendations were worked out for the research objects constituting material evidence (substances, plant mixtures, plastic masses, etc.), probably containing analogues of narcotic drugs or psychotropic substances. The developed algorithm of research includes chemical and pharmacological parts. The “Methodological Recommendations” describe in detail why this approach is used. However, the objects of expert research conducted for the purpose of discovering new psychoactive substances can be not only constituting material evidence of non-biological nature, but also biological fluids, which are most in demand when conducting medical examination of living people who use intoxicants.

To identify the fact of using prohibited substances and, subsequently, to determine the specific structure of the psychoactive substance being studied, chromatographic methods for the analysis of biological objects, including HPLC-MS (high-performance liquid chromatography with mass-selective detection), and GC-MS (gas chromatography with mass-selective detection) are used [3].

One of the “brightest” representatives of this class of psychotropic substances is 3-(Naphthalene-1-yloxomethyl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indazole, known under the trivial name of THJ-2201 or AM(N)-2201. Another psychoactive substance known as JWH-018 (IUPAC:

(1-pentyl-3-(1-naphthoyl) indole) can be considered the “progenitor” of the test substance. The difference between them is in substituting the indole nucleus for the indole one [4]. The structural formula of the test substance is shown in Figure 1.

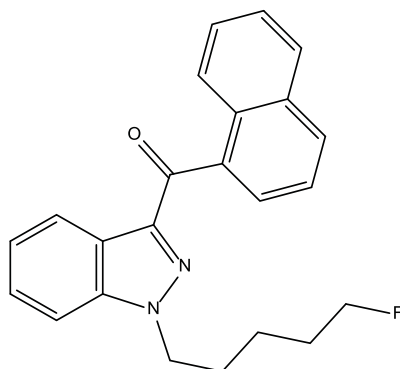


Figure 1 – Structural formula 3-(naphthalene-1-yloxomethyl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indazole (THJ-2201)

According to its pharmacological properties this substance is a complete agonist of central CB1 and peripheral CB2 receptors [5]. After taking the substance, the following effects are observed: evident sedation, loss of control of fine and gross motor skills of smooth muscles, difficulty in orientation in space, lowering decrease of arterial blood pressure, nausea, mental disturbance and others [6].

The aim of this study is to work out a procedure for the determination of the test substance THJ-2201 and its metabolites in the urine of laboratory animals; the detection of a set of characteristic metabolites indicating the use of a prohibited substance. Besides, the study of metabolism of new synthetic cannabimimetics in general is also the goal of this work. For a relatively rapid performance of qualitative analysis of metabolic profiles and resynthesized psychoactive substances, metabolic chambers for laboratory animals can be used [7].

In the proposed study, some methodological recommendations for the application of HPLC-MS and GC-MS methods for the qualitative determination of metabolites of the new synthetic cannabimimetic THJ-2201 in the biological fluid (urine) of laboratory rats are presented for consideration.

Materials and methods. The test substance. A sample of the substance was provided by the law enforcement agencies of the Ministry of Internal Affairs of the Russian Federation to the base of the Regional Research Center “Pharmatest” for establishing the chemical structure, determining the degree of chemical affinity with the substances listed in Schedule I of narcotic drugs and psychotropic substances, and establishing the analogy with the already prohibited substances.

Laboratory animals. The experiments were carried out on white mature males of laboratory rats in the Wistar line aged 4–6 months and weighing 180–250 grams. The animals were kept in the vivarium of the Perm State Pharmaceutical Academy in a separate room, at the air temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and the air humidity of 55–65%. The diet was standard for laboratory animals (GOST R

50258-92) according to the rules of laboratory practice for preclinical research in the Russian Federation (GOST 3 51000.3-96 and 51000.4-96).

The scheme of the experiment. To obtain a control and post provocative bio-fluid in the same animal, which is necessary for comparing the results, the following scheme of placing rats was used while-planning the experiment.

Each animal was placed into a metabolic chamber of the “Open Science” firm for 24 hours, with unlimited access to water and abrosia for urine collection and liquid urine control. After that, the animal was placed into a “home” cage for 5–6 hours for food intake.

Then the animal was injected intraperitoneally [8] with the test substance (0.9% solution of sodium chloride at a dose of 10 mg / kg (the dose was established experimentally while carrying out additional studies on the basis of the “Pharmatest” as a part of expert evaluation of the object including the test substance). After taking the substance, the animal was again placed into the metabolic chamber for 24 hours to collect the post-experimental bio-liquid, in which the search for THJ-2201 and its metabolites was carried out according to the procedures described below.

Equipment for the experiment.

High performance liquid chromatography (HPLC). To carry out the experiment the following equipment was used: a liquid chromatograph from the firm “Shimadzu LCMC-8050” in combination with a mass-selective detector. The detector type is a triple quadrupole with a double ionization source (chemical ionization at the atmospheric pressure and electrospray). The separation of the substances occurred in a chromatographic column (the material is stainless steel, the characteristics are: 150 * 3.0 mm, Luna 3uC18 (2), 100A). The sorbent is reversed-phase.

Gas chromatography (GC). Gas chromatograph “Agilent 7890A” with Agilent 5975C mass spectrometer, column 103 nonpolar HP-5ms 28 m * 0.25 mm was used. Helium was used as the carrier gas, which was supplied

at the rate of 1.2 ml / min, the operation mode was split / splitless, the flux division was 1:10, the on-delay was 1 minute after the sample insertion. The interface temperature was 280°C, the injector temperature was 250°C, the programmable column temperature was 70 (1) -30-250-3-280-10-300. The detector operation mode was selective ion monitoring; the interval was 9-13 minutes; the voltage on the multiplier was 200 V higher than the auto tuning value.

Preparation of objects for research.

Preparation of a standard solution. To determine the conditions and time of release of the substance on the experimental equipment, a standard solution of THJ-2201 in acetonitrile at the concentration of 1 ng / ml was prepared. Further, 0.5 ml of the resulting solution was placed into a chromatographic vial. 5 µl of the solution was injected into the chromatograph injector.

Sample preparation for HPLC-MS. 3 ml of the urine being analyzed was placed into a 10 ml vial with a screw cap, 0.5 ml of a 5 M solution of NaOH was added and held for 2 minutes at 50°C. 3 ml of urine hydrolyzate was placed into a clean, dry tube of 10 ml volume. The hydrolyzate was acidified up to pH 2-3 by adding 250–350 µl of concentrated hydrochloric acid.

3 ml of isooctane-ethyl acetate (7: 1) was placed into the test tube. Then the test tube was placed on the orbital shaker for 10 minutes, centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm. The organic layer was separated, transferred to the glass evaporation tube and evaporated in the stream of hot air. 500 µl of acetonitrile was added to the extract, shaken on the vibromixer for 2-3 seconds and then analyzed.

Chromatography conditions for HPLC-MS. Nebulizing Gas Flow was 3 L/min, Heating Gas Flow was 10 L/min, Interface Temperature was 300°C, DL Temperature was 25°C, Heat Block Temperature was 400°C, Drying Gas Flow was 10 L/min [9]. Registration and processing of chromatographic information was carried out using LC solution software (ver 1.25) [10].

Sample preparation and derivatization for GC-MS. 2 ml of urine was placed into the vial, 150 µl of 50% NaOH solution was added and mixed. The bottle was tightly sealed and placed into the fuser for 10 minutes at 60°C. After cooling the vial was opened, a hexenal standard of 100 µl 0.2 mg / ml was added, a 6N HCl solution was added to pH 2–3 and extracted by the mixture of n-hexane-ethyl acetate (7 : 1) in a 5 ml portion. The top layer was separated, evaporated to a dry residue in the warm air current (40°C). 500 µl of anhydrous acetone, 40 µl of methyl iodide and 2 mg of potassium carbonate were added to the dry residue, sealed and heated at 60°C. for 60 minutes in a fuser. The bottle was cooled. The solution was transferred to a clean vial and evaporated in a stream of nitrogen. The dry residue of the derivatized sample was dissolved in 100 µl of ethyl acetate and 1–2 µl was injected into the chromatograph-mass spectrometer injector [11].

Registration and processing of chromatographic information was carried out using the AMDIS GC / MS Analysis software (ver.2.66) [12].

Results. As a result of the work done, the following data were obtained confirming the hypothesis of the similarity of metabolic profiles after administration of THJ-2201 in humans and animals.

The analysis of the standard sample was carried out using the MRM-transitions method: product ion was 361.40, precursor was 233.30, collision energy was 15. The chromatogram of the standard solution is shown in Figure 2.

Study of the biological fluid of laboratory animals.

High performance liquid chromatography. In the study of the biofluidity of the animal, a comparison method with its own control was used, i. e. the urine was collected twice – before and after the administration of the substance (Figure 4 and Figure 3, respectively). The MRM-transitions method was used for the analysis. The native substance was characterized by the following parameters: product ion is 361.40, precursor is 233.30, collision energy is 15.0. The following parameters are typical of the metabolite: product ion is 373.20, precursor is 155.20, collision energy is 15.0.

From the data obtained it follows that in the “control urine” for this MRM transition no coincidences in chromatography were found out (the maximum intensity of the peaks was 720 units), whereas on the chromatogram of the biofluid collected after taking the substance, the peak of the native substance was clearly visible, as well as the peak of the desired metabolite, corresponding to each of its MRM-transitions (the maximum intensity was 1,425,000 units). Chromatograms of the test samples of the biological fluid of laboratory animals before and after taking THJ-2201 are shown in Figures 3 and 4, respectively.

Gas chromatography. In the urine of a laboratory animal, after receiving the substance, characteristic peaks for the native substance and one of the metabolites of the THJ-2201 substance with mass spectra coinciding with the mass spectra of human samples taken from the database of the AMDIS GC / MS Analysis software package (ver. 2.66.). The mass spectra of the sample for the native compound and its metabolite are presented in comparison with the “human” results in Figures 5 and 6, respectively.

Discussion. We can draw the following conclusions from the data obtained:

HPLC-MS

- The time of release of the substance in the standard sample (for a given MRM transition) corresponds to the time of release of the native substance in the experimental sample, which indicates with high probability that it is the same substance;
- when comparing the chromatograms of the control urine and post-experimental urine, it can be concluded that no endogenous substances corresponding to the proposed MRM transitions were detected;

ГХ-МС

- on the chromatogram of the postexperimental urine, the peaks of the native substance THJ-2201 and its metabolite are clearly visible, corresponding to the proposed MRM transitions.



Figure 2 – Standard solution THJ-2201. MRM analysis

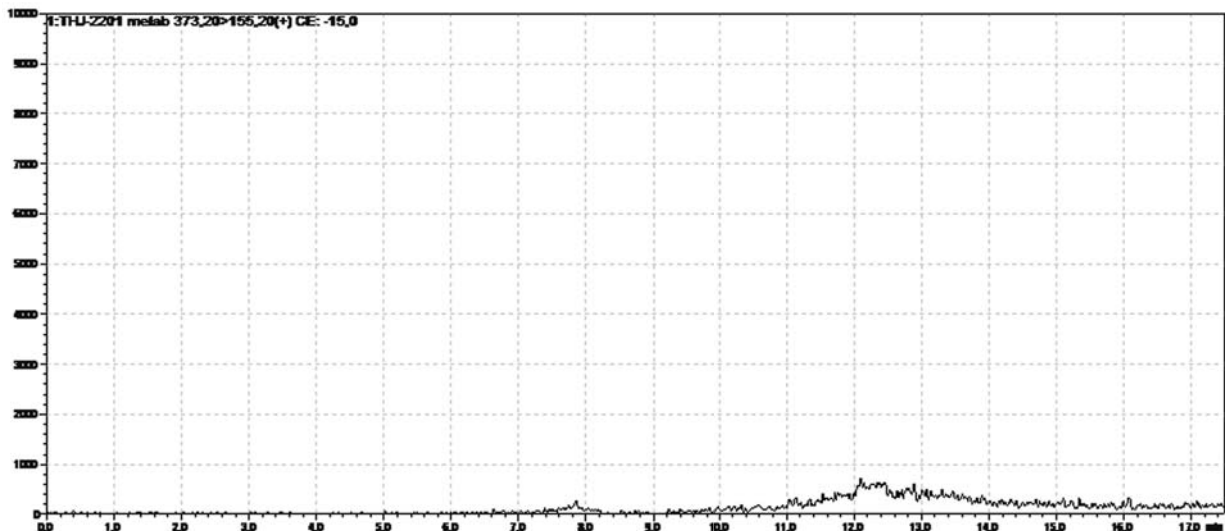


Figure 3 – A sample of the biological fluid of a laboratory animal before taking THJ-2201.
MRM Transition Method

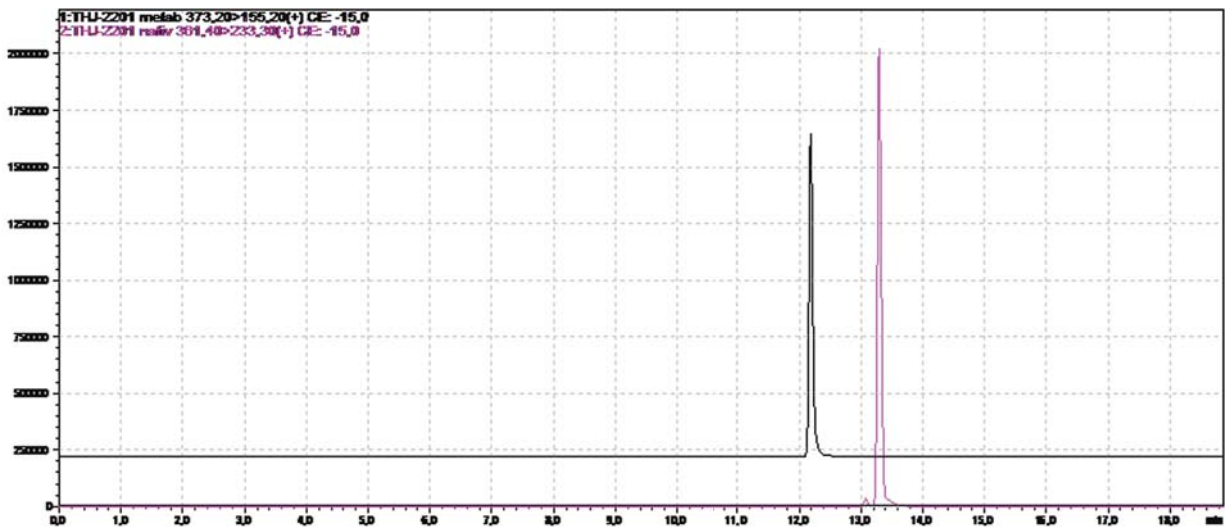


Figure 4 – A sample of the biological fluid of a laboratory animal after taking THJ-2201.
MRM Transition Method

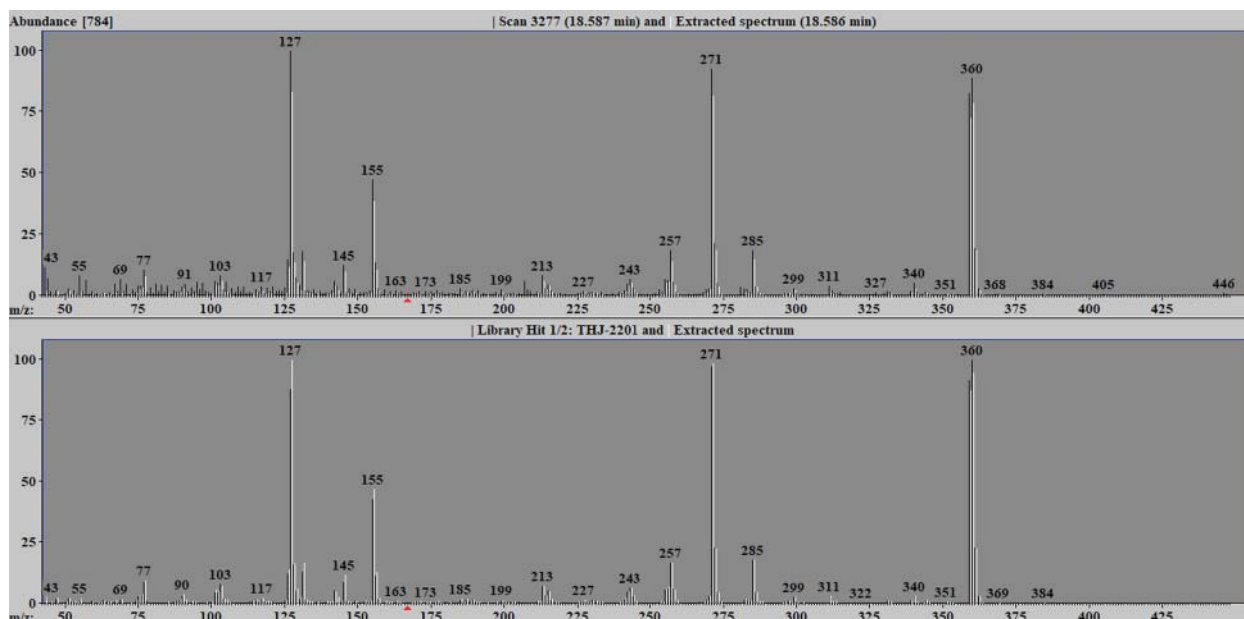


Figure 5 – Mass spectrum of the peak, characteristic for the native substance THJ-2201.
Above – experimental (laboratory animal), below – library (man)

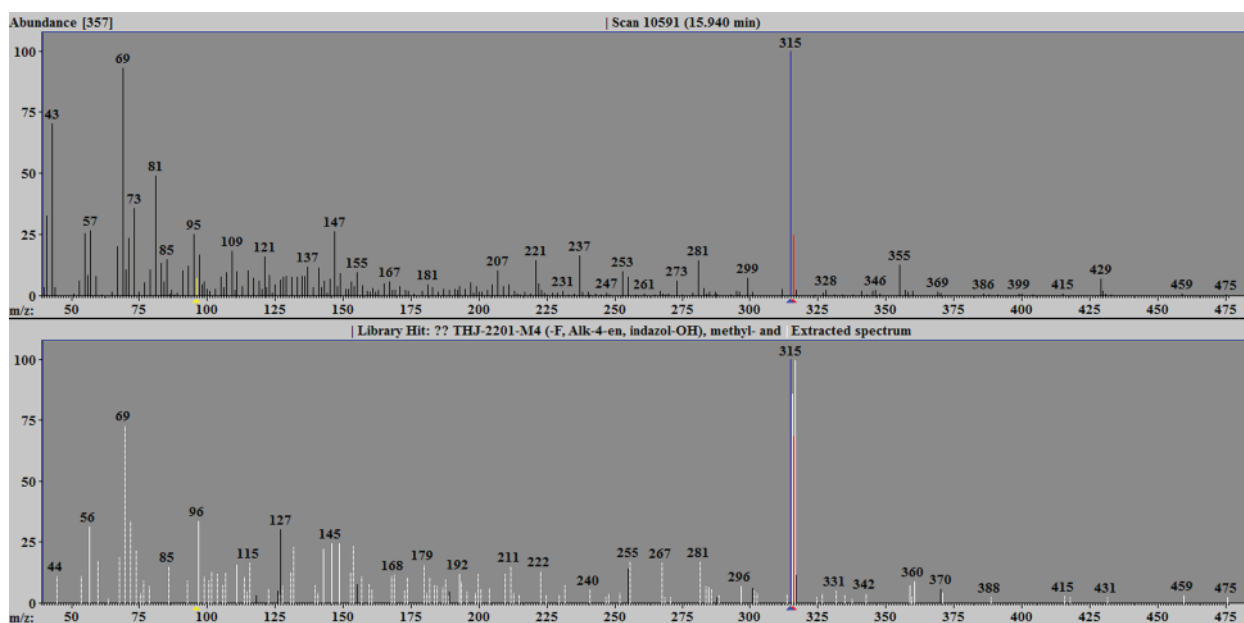


Figure 6 – Mass spectrum of the peak, characteristic for the metabolite of substance THJ-2201. Above – experimental (laboratory animal), below – library (man)

GC-MS

- no qualitative differences between the ionic compositions of the metabolites of the new synthetic cannabinoid THJ-2201 in humans and in laboratory rats have been revealed;
- substantial similarity between ions with maximum intensity in different metabolic profiles was established;
- metabolite detection parameters depend on particular chromatographic conditions.

Conclusion. Taking into account the obtained results of the experiment, we can conclude that the proposed complex analysis methodology is suitable under the given laboratory conditions (presence of laboratory animals, a variety of chromatographic equipment).

Taking into account the previous studies [13, 14], we can also conclude that there is a significant degree of interspecies similarity in human metabolic profiles and laboratory rats' for substances chemically similar to the studied.

From the point of view of the authors, the study is promising, as it can significantly reduce the time of introducing a new psychoactive substance into the list of prohibited substances (List I of the National Assembly and the Law), making it possible to obtain a model of metabolism of the test substance without a poisoning subject, only on the basis of bio-fluids of laboratory animals.

Библиографический список

1. Федеральный закон от 8 января 1998 г. № 3-ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах».
2. Постановление Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации».
3. Темердашев А.З., Киселёва Н.В., Колычев И.А., Кальницкий А.Г. ГХ-МС И ВЭЖХ-МС - ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ПРИРОДНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ – ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКИЛ-3-ИНДОЛИЛКЕТОНОВ, α-АМИНОАРИЛКЕТОНОВ, П-АМИНОБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ, КАННАБИНОИДОВ И ТРОПАНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ // *Аналитика и контроль*. 2012. №3. С. 240–247.
4. Васильев А.Б., Соснов Д.А., Булыгина И.Е. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИНОИДА (НАФТАЛИН-1-ИЛ)(1-ПЕНТИЛ-1Н-ИНДАЗОЛ-3-ИЛ) МЕТАНОН THJ-2201 // *Наркология*. 2014. №5 (149). С. 79–82.
5. Cornelius H., Schoeder C.T., Pillaiyar T., Burkhard M., Müller C.E. PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF SYNTHETIC CANNABINOIDS IDENTIFIED AS CONSTITUENTS OF SPICE // *Forensic Toxicology*. 2016. 34 (2). P. 329–343. DOI: 10.1007/s11419-016-0320-2
6. THJ-2201 // psychonautwiki.org URL: <https://psychonautwiki.org/wiki/THJ-2201>.
7. METABOLIC CAGE // <http://www.openscience.ru> URL: <http://www.openscience.ru/index.php?page=other&item=018>
8. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 751 с.
9. Информационное письмо «Обнаружение синтетических каннабимиметиков, наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» // Министерство Здравоохранения Российской Федерации, Национальный научный центр наркологии. 2014 г.
10. LCsolution Software // www.ssi.shimadzu.com URL: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=lcsolution>.
11. Катаев С.С., Мелентьев А.Б., Дворская О.Н. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ КАННАБИМИМИТИКА РВ-22 В МОЧЕ // *Бутлеровские сообщения*. 2013. Vol. 36. No. 10. P. 29–36.
12. AMDIS // chemdata.nist.gov URL: <http://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>.
13. Алушкин Д.Ю., Андреев А.И., Малкова Т.Л. Характеристика метаболизма и разработка методики определения синтетического каннабиноида рв-22 в моче лабораторных животных // *Достижения и проблемы современной науки*. СПб.: Научный журнал «Globus». 2016. С. 102–107.
14. Алушкин Д.Ю., Малкова Т.Л. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЗМА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИНОИДА АВ-PINACA В МОЧЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ // *Здоровье и образование в 21 веке*. 2016. Vol. 18. No. 10. С. 113–124.

References

1. Federalnyj zakon ot 8 yanvarya 1998 g N3-FZ [Federal Law of January 8, 1998 N 3-FZ]. “O narkoticheskikh sredstvakh i psihotropnykh veshchestvakh” [“On Narcotic Drugs and Psychotropic Substances”]. (In Russ.)
2. Postanovlenie Pravitelstva RF ot 30 iyunya 1998 g N 681 [Resolution of the Government of the Russian Federation of June 30, 1998 N 681] “Ob utverzhdenii perechnya narkoticheskikh sredstv psihotropnykh veshchestv i ih prekursorov podlezhashchih kontrolyu v Rossijskoj Federacii” [“On the approval of the list of narcotic drugs, psychotropic substances and their precursors subject to control in the Russian Federation”]. (In Russ.)
3. Temerdashev A.Z., Kiseleva N.V., Kolychev I.A., Kalnitsky A.G. GH-MS I VEZHKH-MS - OPREDELENIE NEKOTORYH NARKOTICHESKIH SREDSTV PRIRODNOGO I SINTETICHESKOGO PROISKHOZHDENIYA - PROIZVODNYH N-ALKIL-3-INDOLILKETONOV -AMINOARILKETONOV P-AMINOBENZOJNYH KISLOT KANNABINOIDOV I TROPANOVYH ALKALOIDOV [GC-MS AND HPLC-MS - DETERMINATION OF SOME DRUGS OF NATURAL AND SYNTHETIC ORIGIN - DERIVATIVES OF N-ALKYL-3-INDOLYLKETONS, α-AMINOARYLCRETHONES, P-AMINOBENZOIC ACIDS, CANNABINOIDS AND TROPANIC ALKALOIDS]. *Analitika i kontrol* [Analytics and Control]. 2012. N 3. P. 240–247. (In Russ.)
4. Vasiliev AB, Sosnov DA, Bulygina I.E. IDENTIFIKACIYA I OSNOVNYE HARAKTERISTIKI NOVOGO SINTETICHESKOGO KANNABINOIDA NAFTALIN-1-IL 1-PENTIL-1H-INDAZOL-3-IL METANON THJ-2201 [IDENTIFICATION AND MAIN CHARACTERISTICS OF NEW SYNTHETIC CANNABINOID (NAPHTHALIN-1-IL) (1-PENTIL-1H-INDAZOL-3-IL) METHANON THJ-2201]. *Nakrologiya* [Nakropologiya]. 2014. No. 5 (149). P. 79–82. (In Russ.)
5. Cornelius H., Schoeder C.T., Pillaiyar T., Burkhard M., Müller C.E. PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF SYNTHETIC CANNABINOIDS IDENTIFIED AS CONSTITUENTS OF SPICE. *Forensic Toxicology*. 2016. 34 (2). P. 329-343. DOI: 10.1007 / s11419-016-0320-2.
6. THJ-2201. psychonautwiki.org URL: <https://psychonautwiki.org/wiki/THJ-2201>.
7. METABOLIC CAGE. <http://www.openscience.ru> URL: <http://www.openscience.ru/index.php?page=other&item=018>

8. Mironov A.N. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [A guide to conducting preclinical studies of medicines]. Moskva: Grif i K [Moscow: Grif and To], 2012. 751 p. (In Russ.)
9. Informacionnoe pismo "Obnaruzhenie sinteticheskikh kannabimimetikov narkoticheskikh psihoaktivnykh veshchestv i ih metabolitov v moche volosah i nogtyah metodami zhidkostnoj hromatografii s mass-spektrometricheskim dektirovaniem" [Information letter "Detection of synthetic cannabimimetics, narcotic, psychoactive substances and their metabolites in urine, hair and nails by liquid chromatography with mass spectrometric detection"]. Ministerstvo Zdravoohraneniya Rossijskoj Federacii Nacionalnyj nauchnyj centr narkologii [Ministry of Health of the Russian Federation, National Scientific Center of Narcology]. 2014. (In Russ.)
10. LCsolution Software. www.ssi.shimadzu.com URL: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=lcsolution>.
11. Kataev S.S., Melentiev A.B., Dvorskaya O.N. IDENTIFIKACIYA METABOLITOV KANNABIMIMETIKA PB-22 V MOCHE [IDENTIFICATION OF METABOLITES OF PB-22 CANNABYMETHYME IN URINE]. *Butlerovskie soobshcheniya* [Butlerov Communications]. 2013. Vol. 36. No. 10. P. 29–36. (In Russ.)
12. AMDI. chemdata.nist.gov URL: <http://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>.
13. Apushkin D.Yu., Andreev A.I., Malkova T.L. Harakteristika metabolizma i razrabotka metodiki opredeleniya sinteticheskogo kannabinoida pb-22 v moche laboratornykh zhivotnykh [Characteristics of metabolism and development of a technique for the determination of synthetic cannabinoid pb-22 in urine of laboratory animals]. *Dostizheniya i problemy sovremennoj nauki* [Achievements and problems of modern science]. SPb Nauchnyj zhurnal Globus [SPb.: Scientific journal "Globus"]. 2016. P. 102–107. (In Russ.)
14. Apushkin D.Yu., Malkova T.L. Harakteristika metabolizma i razrabotka metodiki opredeleniya sinteticheskogo kannabinoida ab-pinaca v moche laboratornykh zhivotnykh [Characteristics of metabolism and working out the method of determining ab-pinaca synthetic cannabinoid in uroline of laboratory animals]. *Zdorove i obrazovanie v 21 veke* [Health and Education in the 21st Century]. 2016. Vol. 18. No. 10. P. 113–124. (In Russ.)

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Апушкин Данила Юрьевич – младший научный сотрудник научного отдела, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка методик определения новых психоактивных веществ в биологических жидкостях, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, хемоинформатика, молекулярное моделирование. E-mail: apushkinjob@gmail.com

Малкова Тамара Леонидовна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и совершенствование методик определения лекарственных средств, в том числе имеющих токсикологическое значение, исследование новых психоактивных веществ, обеспечение качества аналитических исследований. E-mail: kaftox@mail.ru

Authors:

Apushkin Danila Yurievich – junior research assistant of the scientific department, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: working out the methods for determining new psychoactive substances in biological fluids, high-performance liquid chromatography, gas chromatography, chemoinformatics, molecular modeling. E-mail: apushkinjob@gmail.com

Malkova Tamara Leonidovna – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Head of the Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: working out the methods for the determination of medicinal products, including those of toxicological significance, the study of new psychoactive substances, and the assurance of the quality of analytical studies. E-mail: kaftox@mail.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2017

Принята к печати: 10.08.2017

Received: 29.06.2017

Accepted for publication: 10.08.2017
