

Módszerfejlesztés Szintetikus Kannabinoidok Kimutatására Vizeletből

Method Development for Determination of Some New Synthetic Cannabinoid Drugs from Urine

Sija Éva^{1*}, Berkecz Róbert², Janáky Tamás², Kereszty Éva¹, Varga Tibor¹, Institóris László¹

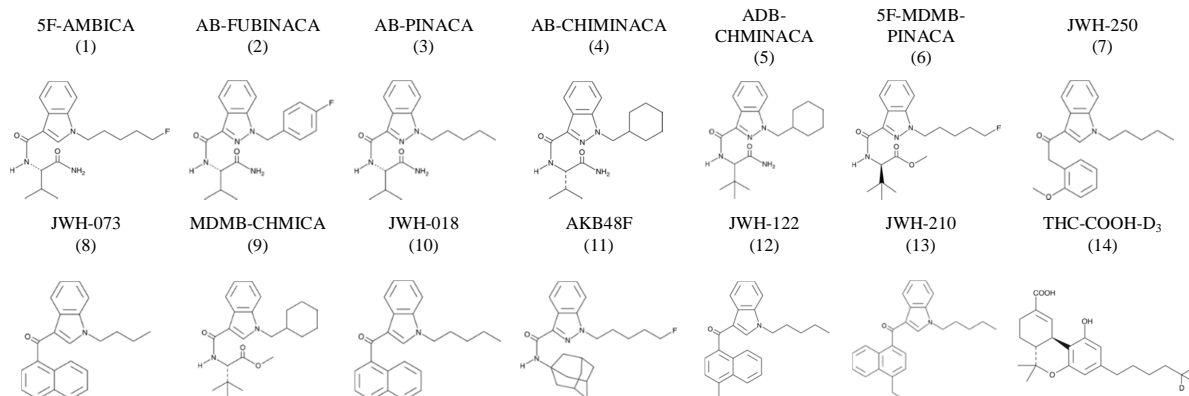
¹Igazságügyi Orvostani Intézet, Szegedi Tudományegyetem, H-6724 Szeged, Kossuth Lajos sgt. 40, Hungary

²Orvosi Vegytani Intézet, Szegedi Tudományegyetem, H-6720 Szeged, Dóm tér 8, Hungary
e-mail: sija.eva@med.u-szeged.hu

Abstract

The continuously increasing number of synthetic cannabinoids requires continuous method development for their determination in biological fluids.

The aim of this work was to develop a reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of 13 synthetic cannabinoids (5F-AMBICA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, AB-CHMINACA, ADB-CHMINACA, 5F-MDMB-PINACA, JWH-250, JWH-073, MDMB-CHMICA, JWH-078, AKB-48F, JWH-122, JWH-210) in human urine samples.



For sample preparation two types of beta-glucuronidases were tried for glucuronide hydrolysis as it was unknown whether the substances are present in free or glucuronide form. The optimal enzyme concentration was 500 U/mL of *Helix Pomatia*. *E. Coli* glucuronidase or *Helix Pomatia* when it was applied in higher concentration resulted in a lower area under curve (AUC) for more substances related to the samples without enzymatic treatment.

Bevezetés

A kannabisz sokak számára egyet jelent a „füvezéssel”. Azonban tudatmódosító szerként való felhasználásán kívül a gyógyászatban is nagy jelentőségű. Az 1990-es évek elején számos tudományos kutatás folyt, melyek eredményeként felfedezték a szervezet belső kannabinoid

rendszerét. A receptorok két fajtája közül a CB1 receptor többnyire a központi idegrendszerben helyezkedik el – ehhez köthető a kannabisz hatóanyagának, a tetrahidrokannabinolnak (THC) pszichoaktív hatása is –, a CB2 receptorok pedig inkább az immunrendszer sejtjein találhatóak. Ezek alapvető életfolyamatokat szabályoznak, rendellenességük gyulladáshoz és autoimmun zavarokhoz vezet [1]. Ezekhez a kannabinoid receptorokhoz kötődni képes hatóanyagokat nevezünk kannabinoidoknak. Az elmúlt 25 évben nagyszámú (több ezer) szintetikus kannabinoidot állítottak elő, a cél elsősorban pszichoaktív hatás nélküli, a CB2 receptorhoz szelektíven kötő hatóanyagok kifejlesztése volt. Az irodalomban számtalan példát olvashatunk szintetikus kannabinoidok előállításáról, állatkísérletek eredményeiről valamint a CB1 és CB2 receptorokhoz való kölcsönhatásokról [2]. Az előállított szintetikus kannabinoidok azonban sokszor jóval nagyobb pszichoaktív hatással rendelkeznek, mint maga a THC [3]. Mindez a feketepiac melegágyává vált, és nap mint nap kerülnek a drogpiacon az illegális laboratóriumok újabb és újabb termékei. A szintetikus kannabinoidokat különböző oldószerben oldják majd főként növényi törmelék felületére impregnálják. „Filléres” áruk miatt rendkívül népszerűek a tinédzserek körében. Sokszor csak néhány hónapig vannak jelen a feketepiacon, törvényi szabályozásuk után eltűnnek. Emiatt anyagcseréjükéről és kiválasztásukról nagyon keveset, olykor semmit nem tudunk. Ezek a szerek a szervezetbe kerülve már ng/ml-es koncentráció alatt is hatásosak. Egyes esetekben azt feltételezik, a metabolit lehet felelős a pszichoaktív hatásért. Kromatográfiai vizsgálatokhoz analitikai tisztaságú standardok beszerzése a nagy számuk, a gyorsan és kiszámíthatatlanul változó piac miatt rendkívül nehézkes. Sokszor a hatóságok által lefoglalt és azonosított standardok használatára kell támaszkodunk. Ezen okok miatt szintetikus kannabinoidok biológiai mintákból való kimutatása igazi kihívás.

Munkánk célja olyan módszer kifejlesztése volt, amely alkalmas a szintetikus kannabinoidok biológiai mintákból LC-MS/MS-sel történő kimutatására. Mivel a vegyületek egy része glükuronid formában választódik ki a vizeletbe, a minták béta-glükuronidáz enzimmel való kezelése elkerülhetetlen. Ezért megvizsgáltuk, hogy a béta-glükuronidáz típusa és mennyisége hogyan befolyásolja a mérési eredményeket. A minta-előkészítés során más laboratóriumokból származó, általuk már lemért, illetve spike-olt negatív vizeletmintákhoz különböző mennyiségű *E. Coli*-ből és *Helix Pomatia*-ból (HP) származó béta-glükuronidázt adtunk, a mérési eredményeket enzimmel nem kezelt, spike-olt mintákkal hasonlítottuk össze.

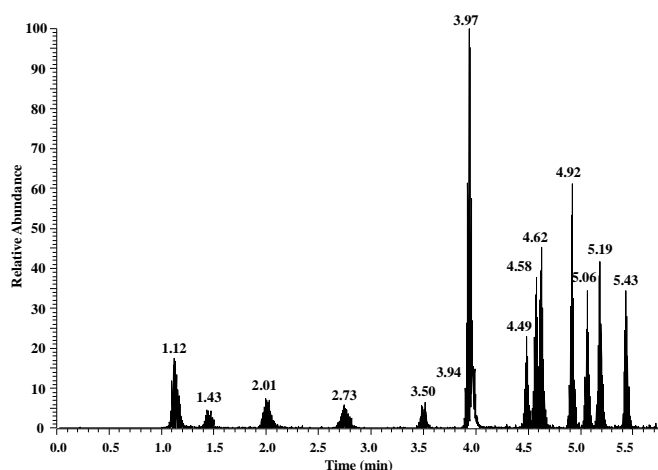
Kísérleti körülmények

A mintaelőkészítés során 1 ml vizeletmintához 10 µl belső standardot (10 µg/ml THC-COOH-D₃-oldat), béta-glükuronidázt (*Helix Pomatia* esetében 400 µl 0,1 mólos ecetsav/nátrium-acetát-pufferben, pH=5,0; *E. Coli* esetében 0,075 M-os, pH=6,8 foszforsav/nátrium-hidrogén-foszfát-pufferben) adtunk, és a mintákat 25 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk. A mintákhoz ezt követően 1,5 ml acetonnitrit és 400 mg ammónium-szulfátot adtunk majd. 1 perces vortexelés és centrifugálás (2500 rpm, 5 perc) után a felső fázisból 1,1 ml-t bepárló csőben nitrogén árammal (50 °C, 15 perc) szárazra pároltunk. A maradékot 100 µl ACN:H₂O elegyben oldottuk és LC-MS/MS-sel (Agilent 1100 HPLC rendszer, Thermo Finnigan TSQ 700 MS, Phenomenex Kinetex C18-as oszlop 100 x 2,1 mm átmérő, 2,6 mikrométer szemcseméret, gradiens elúció: 0,1 % hangyasav-víz és 0,1 % hangyasav-ACN elegye) analizáltuk.

Eredmények és értékelésük

Az 1. ábrán egy spike-olt negatív vizelet tipikus kromatogramja látható. A vegyületek

azonosítása a standard vegyületek retenciós idejével, atömegspektrumában megjelenő jellegzetes ionokkal, valamint azok arányának összehasonlításával történik. A vegyületek retenciós idejét és MRM átmeneteit a 1. táblázatban foglaltuk össze. Mennyiségi meghatározásuk előzetesen felvett kalibrációs görbék segítségével történt.

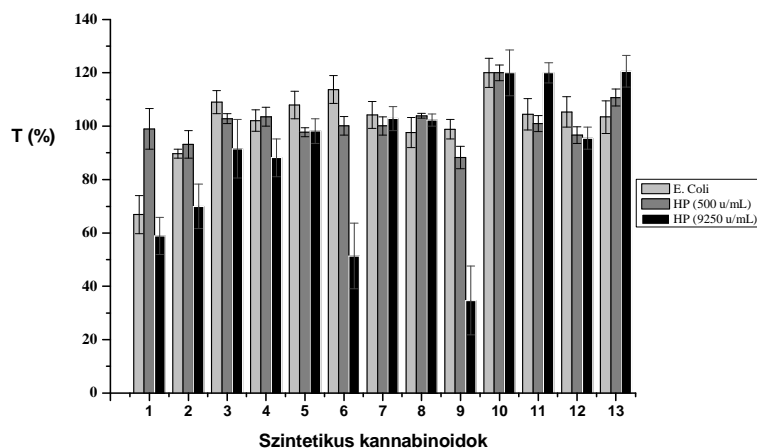


1. Ábra HP-val kezelt, spike-olt vizelet minta TIC kromatogramja

1. Táblázat: A vizsgált szintetikus kannabinoidok legfontosabb kromatográfiás paramétereit (*belső standard)

	Komponens	MRM-átmenetek	RT (perc)		Komponens	MRM-átmenetek	RT (perc)
1	5F-AMBICA	348.0; 232.0; 144.0	1.12	8	JWH-073	328.0; 155.0; 127.0	4.58
2	AB-FUBINACA	369.0; 253.0; 109.0	1.43	9	MDMB-CHMICA	385.0; 240.0; 144.0	4.62
3	AB-PINACA	331.0; 215.0; 286.0	2.01	10	JWH-018	342.0; 155.0; 214.0	4.92
4	AB-CHMINACA	357.0; 241.0; 312.0	2.73	11	AKB48F	384.0; 135.0; 93.0	5.06
5	ADB-CHMINACA	371.0; 241.0; 326.0	3.5	12	JWH-122	356.0; 169.0; 141.0	5.19
6	5F-MDMB-PINACA	378.0; 233.0; 318.0	3.94	13	JWH-210	370.0; 183.0; 214.0	5.43
7	JWH-250	336.0; 121.0; 91.0	4.49	14	THC-COOH D ₃ *	348.0; 330.0; 302.0	3.97

Célunk az volt, hogy a már meglévő eljárást hatékonyabbá tegyük, és megállapítsuk hogyan hat a különböző enzimes kezelés a szintetikus kannabinoidok kimutatására.



2. Ábra Enzimkezelés hatása szintetikus kannabinoidok görbe alatti területére

A 2. ábrán a különböző enzimikus kezelésnek kitett minták kromatogramja alapján nyert görbék csúcs alatti területeinek változását mutatjuk be. Referenciaként (100%) az enzimet nem tartalmazó acetát-puffer-oldattal kezelt vizeletminták szolgáltak. Ha összehasonlítjuk, hogyan változik a kapott kromatogramokon az egyes anyagok görbe alatti területe különböző enzimikus kezelés hatására spike-olt vizeletekben, láthatjuk, hogy a nagyobb koncentrációban alkalmazott HP béta-glükuronidáz enzim hatására több esetben is szignifikánsan csökkent a görbe alatti terület a kontroll mintákhoz képest. MDMB-CHMICA, 5F-MDMB-PINACA és 5F-AMBICA esetében a visszanyerés 60%-nál kevesebb volt. Ennek a jelenségnek több oka is lehet. Elképzelhető, hogy a nagy enzimkoncentráció az inkubálási idő alatt a molekulák degradációját okozta. A másik ok lehet, hogy az enzimfehérjék felületére a drogmolekulák adszorbeálódtak, mely szintén okozhatta a visszanyerés hatékonyságának csökkenését. Ehhez fontos megjegyeznünk, hogy a törzsoldatként használt HP enzim-koncentrátum nem homogén oldat, hanem inkább szuszpenzióhoz hasonlítható. Az 500 U/ml-es koncentrációban alkalmazott enzimikus kezelés E. Coli, és HP-ból nyert béta-glükuronidáz enzim esetében sem csökkentette jelentős mértékben a görbe alatti területeket. A legtöbb esetben az enzimikus kezelés nélküli visszanyerésekhez hasonló eredményeket kaptunk. (Ez alól az 5F-AMBICA jelent kivételt E. Coli enzimikus kezelés hatására, ahol a csúcs alatti terület ~ 60 %-ra csökkent).

Vizsgálataink során lehetőségünk nyílt arra, hogy más laboratóriumból származó, pozitív vizeletmintákkal is dolgozzunk. A pozitív minták vizsgálatakor E.Coli béta-glükuronidáz enzimikus mintaelőkészítést alkalmaztunk. A mérési eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. Táblázat: Pozitív vizeletminták E. Coli enzimikus kezelés során nyert görbe alatti területének %-os aránya

Anyagok	Csúcssterület %
5F-AMBICA	52.9
ADB-CHMINACA	167
MDMB-CHMICA	89.9

A számolt csúcssterület 5F-AMBICA és MDMB-CHMICA esetében hasonló volt a spike-olt mintáknál kapott eredményekhez. ADB-CHMINACA esetében azonban a csúcssterületre az enzimmel nem kezelt mintákhoz hasonlítva jóval nagyobb értéket kaptunk. Az kísérlet eredményeiből arra következtetünk, hogy az 5F-AMBICA és MDMB-CHMICA nem glükuronid

formában, hanem az ADB-CHMINACA glükuronidált formában jelent meg a vizeletben, melynek kimutatását az enzim jelenléte segítette.

Konklúzió

Eredményeink szerint a glükuronidot képező származékok legmagasabb koncentrációit az 500 U/ml Helix Pomatia enzimmel végzett kezelést követően mértük. Ennél nagyobb koncentrációknál, vagy E. Coli enzim alkalmazásakor egyes esetekben a kimutatás hatékonysága csökkent.

A módszert jelenleg 16 származék meghatározása (5F-AMBICA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, AB-CHMINACA, ADB-CHMINACA, MDMB-CHMICA, 5F-MDMB-PINACA, 5F-AMB, ADB-PINACA, AKB-48F, PB-22, JWH-250, JWH-073, JWH-018, JWH-122 és JWH-210) alkalmazzuk; a más laboratóriumokból származó pozitív minták ismételt mérése jól igazolja a módszer megfelelőségét.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők szeretnék kifejezni köszönetüket Vannai Mariannak (Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézet, SOTE), Dobos Adriennek és Hídvégi Elődnek (ISZKI OITI) módszerfejlesztésben való nélkülözhetetlen segítségükért.

Irodalomjegyzék

- [1] A.C. Howlett, Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68–69 (2002) 619.
- [2] J.W. Huffman, G. Zengin, M. Wu, J. Lu, G. Hynd, K. Bushell, A.L.S. Thompson, S. Bushell, C. Tartal, D.P. Hurst, P.H. Reggio, D.E. Selley, M.P. Cassidy, J.L. Wiley, B.R. Martin, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13 (2005) 89.
- [3] M.S. Castaneto, D.A. Gorelick, N.A. Desrosiers, R.L. Hartman, S. Pirard, M.A. Huestis, Drug and Alcohol Dependence, 144 (2014) 12.