

ANALYSIS OF NEW SYNTHETIC CANNABINOID IN HUMAN URINE BY LC-MS/MS

Tímea Körmöczy^a, Éva Sija^b, Róbert Berkecz^a

^a *Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Szeged, Dóm tér 8, H-6720, Szeged, Hungary*

^b *Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, University of Szeged, Kossuth L. Bld. 40, H-6724, Szeged, Hungary*
e-mail: kormoczi.timea@med.u-szeged.hu

Abstract

Synthetic cannabinoids (SCs) are a group of novel psychoactive substances, which bind to cannabinoid receptors (CB1 and CB2). One of the largest groups of SCs are smoking mixtures, which are intended as legal replacements of cannabis and distributed on the illicit drug market. In 2016, 11 new SCs were reported by the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). The most commonly used techniques for quantitation of SCs in urine are high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In this study we analysed in 2016-2017 released 6 new SCs such as 5F-MN18, AMB-CHMINACA, AMB-FUBINACA, APP-CHMINACA, CUMYL-4CN-BINACA and THJ-2201. The LC-MS/MS system was optimised and the mass of identified parent ions, daughter ions and related retention time were determined. Matrix effect, extraction recovery and process efficiency were evaluated by the method proposed by Matuszewski et al.

Bevezetés

Szintetikus kannabinoidok képezik az új pszichoaktív szerek legnagyobb csoportját. 2015-ben az Európai Unióban 98 új szert jelentettek be, melyből 24 szintetikus kannabinoid volt. 2016-ban a regisztrált új szintetikus kannabinoidok száma 11-re csökkent. A szintetikus kannabinoidok olyan szerek, melyek ugyanazon agyi receptorokra hatnak, mint a természetes kannabiszban található fő hatóanyag a delta-9-tetrahidrokannabinol (THC). A Kábítószer és Kábítószerfüggőség Európai Megfigyelőközpontja (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA*) által kiadott jelentés szerint, 2016-ban 45 súlyos következményekkel járó fogyasztás volt, melyek közül 18 halálos kimenetelű mérgezés [1-2]. A szintetikus kannabinoidok kockázata egyrészt abban rejlik, hogy jobban kötődnek a kannabinoid receptorokhoz (CB1, CB2), ezáltal sokkal aktívabbak, mint a kannabiszban található fitokannabinoidok, másrészt a pontos fiziológiai hatásuk nem ismert [3].

A törvényi szabályozások következtében a kábítószer piaca gyorsan változik, ezért minél előbb fontos az új anyag azonosítása és detektálásuk optimalizálása. Munkánk során a 2016 év végén illetve 2017 elején megjelent új szintetikus kannabinoidok vizelet mintákból történő analizálásával foglalkoztunk, melyet a gyakorlatban legtöbbször alkalmazott LC-MS/MS módszerrel végeztünk.

Anyagok és módszerek

Vegyszerek és standardok

A vizsgálatokban szereplő szintetikus kannabinoidok standard mintáit a Nemzeti Szakértői és Kutató Központ biztosította, melynek tisztasága 90% feletti. A belső standardként használt

deuterált delta-9-tetrahidrokannabinol (THC-COOH-D₃) oldat a Cerilliant-tól (Merk, Darmstadt, Németország) került megrendelésre. Az enzimes kezeléshez éticsigából (*Helix Pomatia*) kivont β -glükuronidáz enzimet (Merk, Darmstadt, Németország) használtunk. A minta előkészítéshez és a mérésekhez LC-MS tisztaságú vizet, acetonitrilt (VWR, Radnor, USA), hangyasavat (Termo Fisher Scientific, Waltham, USA), vízmentes nátrium acetátot (Reanal, Budapest, Magyarország), ecetsavat (Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország), biokémiai felhasználásra alkalmas szilárd ammónium-szulfátot és LC tisztaságú etanolt (Merck, Darmstadt, Németország) használtunk. A vizsgálatokhoz negatív mintaként saját vizelettel dolgoztunk.

Vizelet minták folyadék-folyadék extrakciója

2 mL vizelet mintához 20 μ L belső standardot (10 μ g/mL), 40 μ L szintetikus kannabinoidok standard keverékét és 400 μ L β -glükuronidáz enzimet tartalmazó acetát puffert (pH 5) adtunk, melyet 1 éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltunk. Az inkubációt követően 3 mL acetonitrilt adtunk és ammónium-szulfáttal vízmentesítettük az oldatot. Ezt követően a mintát 60 másodpercig intenzíven rázattuk (Multi-Tube Pulse Vortexer, Glas Col, Terre Haute, USA), majd 8 percig centrifugáltuk (2500 rpm, MLW K-26 D, Németország). Centrifugálást követően 2,2 mL felső fázist 50°C-on 25 perc alatt bepároltunk. A bepárolt mintákat kúpos inzertbe 200 μ L 50:50 acetonitril-víz elegyében visszaoldottuk [4]. A mérések során 20 μ L-t injektáltunk.

Az új vegyületekre készítettünk egy kalibrációs sort, mely a következő koncentrációkat tartalmazta: 0,2; 0,5; 1; 1,6; 2; 5 és 10 ng/mL.

LC-MS/MS

Az analízishez Agilent 1100 HPLC rendszert (Waldbronn, Németország) használtunk, mely egy elektronporlasztásos ionforrású (ESI) hármass kvadrupól rendszerű tömegspektrométerrel (Finnigan TSQ 7000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) volt összekapcsolva. A kromatográfiás elválasztás egy fordított fázisú Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 μ m, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) kromatográfiás oszlopon és egy C18 (4 x 2 mm, Phenomenex, Torrance, USA) előtét oszlopon történt. Az oszlop 50°C-os hőmérsékletét egy oszlop termosztát biztosítja. A mozgó fázis A (0,1% hangyasav vízben) és B (0,1% hangyasav acetonitrilben) eluensből állt. A 11 perces analízis idő során gradiens elúciót alkalmaztunk (**1. Táblázat**). A rendszer továbbá tartalmazott az ionforrás elszennyeződésének elkerülése érdekében egy külső mikro 10 utas váltószelepet, mely a folyadékkromatográfiás rendszer és a tömegspektrométer közé volt beépítve. A váltószelep 1-5,8 percig engedi be az eluátumot, ezen felül egy segédpumpa biztosítja a tömegspektrométer fémkapillárisának öblítését. A kapilláris- és szeleptosást segédpumpa végzi 90:10 acetonitril-víz eleggyel, míg a túmosás 80:20 acetonitril-víz eleggyel történt.

A tömegspektrometriás mérés pozitív ionizációs módban és MRM módszerrel történt. Az analízis ESI forrással, 15 cm x 190 μ m x 75 μ m fűtött kapillárisal (230°C), porlasztó (50 psi) és segédgázzal (30 psi) történt. Ütközési gázként nitrogént használtunk 2,0 mTorr nyomáson. Detektor feszültség: 1900V. A méréshez Xcalibur 1.3 programmal és Tune-nal történt, míg az adatok kiértékeléséhez Thermo Xcalibur 2.2 programmal dolgoztunk, az alábbi paraméterekkel: simítás: 1, alapvonal: 40, terület zaj: 5, csúcs zaj: 5, minimum csúcsmagasság: 3 jel/zaj.

1. Táblázat Gradiens program

Idő (perc)	%B	Áramlási sebesség (mL/perc)
0,00	50	0,4
4,00	100	0,4
6,00	100	0,4
6,10	100	0,7
6,90	100	0,7
7,00	50	0,7
9,50	50	0,7
9,51	50	0,4
10,0	50	0,4

Tömegspektrometriás mérés optimalizálása és a retenció idő meghatározása

A tömegspektrometriás mérés optimalizálása során a 2016 év végén illetve 2017 elején megjelent 6 szintetikus kannabinoid fragmentációját vizsgáltuk. A legújabb szintetikus kannabinoidok: **5F-MN18**, **AMB-CHMINACA**, **AMB-FUBINACA**, **APP-CHMINACA**, **CUMYL-4CN-BINACA** és **THJ-2201**. A mérés során 10 ng/mL koncentrációjú standard mintából 1 µL-t injektáltunk kromatográfiás oszlop nélkül. Az mérés során azonosítottuk az egyszerűen töltött $[M+H]^+$ szülőiont, majd megvizsgáltuk a fragmentációját. A legintenzívebb fragmensiont célionnak (*quantifier ion*) választottuk, amelyet a mennyiségi meghatározás során veszünk figyelembe. A későbbi azonosításhoz egy ennél kisebb intenzitású kísérőiont (*qualifier ion*) választottunk ki. Az azonosítást követően 10 és 50 eV közötti ütközési energia mellett megnéztük a csúcsterületek alakulását, és amelyik ütközési energia mellett legintenzívebb volt az adott fragmension, azt rendeltük hozzá az MRM mérés során. A retenció idő meghatározásához 2 ng/mL koncentrációjú standard oldat 20 µL-t injektáltuk a kromatográfiás oszlopra.

Visszanyerés, mátrixhatás és teljes folyamathatékonyág

A vizsgálatokat Matuszewski [5] és Yanes [6] által kidolgozott módszer alapján végeztük. A visszanyerés vizsgálat célja, hogy kiderítsük az általunk használt mintaelőkészítési módszerrel hány százalékát tudjuk detekálni az adott szintetikus kannabinoidoknak vizelet mintából. A mátrixhatás vizsgálat megmutatja, hogy az analizálandó komponens környezete (mátrixa), hogyan befolyásolja a vizsgált anyagok ionizálhatóságát. A folyamathatékonyág vizsgálat a visszanyerés és mátrixhatás eredményeit együttesen foglalja össze.

A méréshez 3 mintasorozatot készítettünk. Mindegyik sorozat 4 mintát tartalmazott, melyet háromszor mértünk meg. Amíg az A sorozatnál a szintetikus kannabinoidokat tartalmazó oldatot és a belső standardot a vizelet mintához adtuk hozzá az extrakció elején addig a B sorozatnál a standardokat az extrakciót követően, míg C sorozatnál nem használtunk vizeletet és extrakciós módszert, csak a tiszta oldatokkal dolgoztunk. Az eredményeket a következők szerint számoltuk ki:

$$\text{Visszanyerés (\%)} = \frac{A}{B} \times 100, \quad \text{Mátrixhatás (\%)} = \frac{B}{C} \times 100,$$

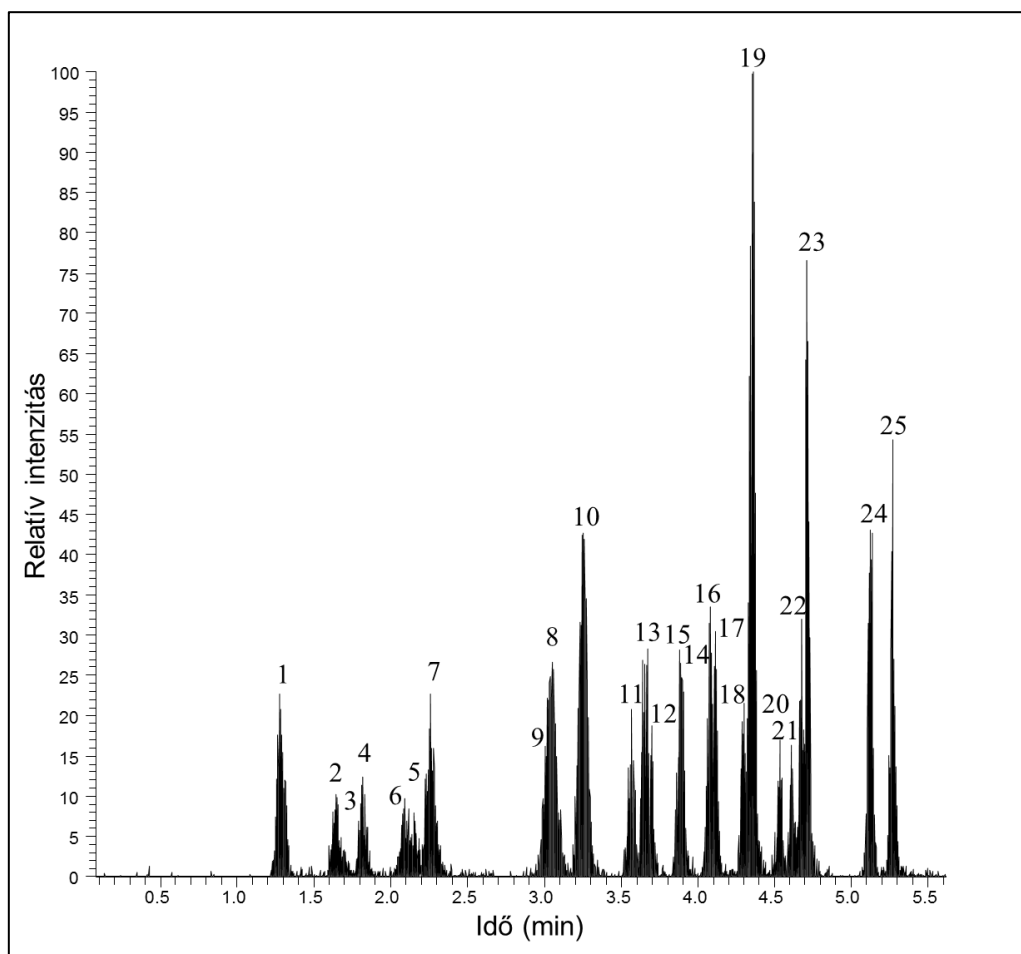
$$\text{Teljes folyamathatékonyág (\%)} = \frac{A}{C} \times 100$$

Eredmények és értékelésük

Az ionizáció során a vizsgált szintetikus kannabinoidokra a következő egyszeresen töltött szülőionok keletkeztek: 5F-MN18 376 (m/z), AMB-CHMICA 371 (m/z), AMB-FUBINACA 384 (m/z), APP-CHMINACA 405 (m/z), CUMYL-4CN-BINACA 361 (m/z) és THJ-2201 361 (m/z). A fragmentáció során – az AMB-CHMICA kivételével – a célion mellett a pontosabb azonosítás érdekében két kísérőion került kiválasztásra: 5F-MN18 233 m/z (20eV) célion, 145 m/z (43eV) és 213 m/z (30eV) kísérőion; AMB-CHMICA 240 m/z (144eV) célion és 144 (45eV) kísérőion; AMB-FUBINACA 253 m/z (26eV) célion, 109 m/z (49eV) és 324 m/z (20eV) kísérőionok; APP-CHMINACA 241 m/z (32eV) célion, 145 m/z (50eV) és 360 m/z (20eV) kísérőionok; CUMYL-4CN-BINACA 226 m/z (29eV) célion, 119 m/z (35 eV) és 243 m/z (17 eV) kísérőionok; THJ-2201 233 m/z (20eV) célion, 145 m/z (42eV) és 213 m/z (28eV) kísérőionok. A 6 új optimalizált vegyület apolárisabb tulajdonságuknak köszönhetően később eluálódnak (**1. Ábra**). A retenciós idő 5F-MN18 4,50 perc, AMB-CHMICA 4,31 perc, AMB-FUBINACA 3,85 perc, APP-CHMINACA 3,51 perc, CUMYL-4CN-BIACA 3,19 és a THJ-2201 esetében 4,58 perc lett.

A mennyiségi meghatározás során kapott eredményekről elmondható, hogy 0,2-10 ng/mL-es koncentráció tartományban lineáris. Az R^2 értéke a CUMYL-4C-BINACA kivételével (0,98) minden esetben 0,99. A belső standardra normalizált területek relatív szórása (*RSD*%) minden vegyületre 20% alatti. A kapott mérési adatok alapján a kimutatási határ (*LOD*) a 6 új pszichoaktív anyagra 0,2 ng/mL, a meghatározási határ (*LOQ*) 0,05 ng/mL.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy az általunk használt mintaelőkészítési módszerrel a CUMLY-4CN-BINACA vegyületet lehet a leghatékonyabban, azaz 74,7%-ban visszanyerni. A többi anyagra a visszanyerés 60-70% közötti, míg az AMB-CHMICA esetében 58,5 % lett. A mátrixhatást tekintve legtöbb esetben negatív befolyásolásról beszélhetünk, melynek feltételezhető oka, hogy a mátrixban lévő nagy koncentrációjú jól ionizálódó endogén komponensek ionelnyomó hatást eredményeznek a spray képzés során. Ez látszik az 5F-MN18 (87,1%), APP-CHMINACA (88,8%), CUMYL-4CN-BINACA (99,3%) és a THJ-2201 (88,1%) esetén. Két esetben, AMB-CHMICA és AMB-FUBINACA szereknél pozitív mátrixhatásról beszélhetünk (107,0% és 120,9%), melynek feltételezhető oka, hogy a mátrixban található egyéb komponensek segítik az adott vegyület ionizálhatóságát protonátadással vagy felületi feszültséget csökkentő hatásukkal. A folyamathatékonyság vizsgálat a visszanyerés és mátrixhatás vizsgálat eredményeit együttesen mutatja. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az egyes szintetikus kannabinoidok terület százalécai korrelálnak a mátrixhatás eredményeivel.



1. ábra Az újonnan vizsgált 6 szintetikus kannabinoid és a már ismert 18 szintetikus kannabinoid, valamint a belső standard teljes ionáram kromatogramja. (1) 5F-AMBICA, (2) AMB-FUBINACA, (3) 5F3P, (4) 5F-APP-PINACA, (5) ADB-FUBINACA, (6) APP-FUBINACA, (7) AB-PINACA, (8) ADB-PINACA, (9) AB-CHMINACA, (10) CUMYL-4CN-BINACA, (11) APP-CHMINACA, (12) ADB-CHMINACA, (13) 5F-AMB, (14) AMB-FUBINACA, (15) MDMB-FUBICA, (16) THC-COOH-D₃, (17) 5F-MDMB-PINACA, (18) MDMB-FUBINACA, (19) AMB-CHMICA, (20) 5F-MN18, (21) THJ-2201, (22) ADAMANTYL-THPINACA, (23) MDMB-CHMICA, (24) AKB48F, (25) FUB-AKB-48F.

Következtetés

Munkánk során a 2016 és 2017-ben megjelent legújabb 6 szintetikus kannabinoid vizelet mintából vett HPLC-ESI-MS/MS analízisét végeztük. A tömegspektrometriás detektálás során meghatároztuk a szülő- és célionokat. A későbbi pontosabb minőségi meghatározás érdekében 2 kísérőion került kiválasztásra. A már optimalizált tömegspektrometriás paraméterekkel fordított fázisú kromatográfiás rendszerben meghatároztuk a retenciós időket. A vizelet mintákból az adott anyag azonosítása során figyelembe vesszük a retenciós idejét, a szülőion, a célion és kísérőionok tömegét (m/z) és azok intenzitását adott ütközési energia mellett. A mennyiségi meghatározás a célionok belső standardra normalizált csúcsterülete, valamint a kalibrációs görbe alapján történik. A vizsgált szintetikus kannabinoidokat az általunk használt folyadék-folyadék extrakciós mintelőkészítési módszerrel 58-74%-ban lehet visszanyerni.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást az EFOP-3.6.1-16-2016-00008 azonosítójú, EU társfinanszírozású projekt támogatta.

References

- [1] Kábítószer és Kábítószer-függőség Európai Megfigyelőközpontja: Európai kábítószer-jelentés, Tendenciák és fejlemények, 2016. Link: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001HUN.pdf>
- [2] Kábítószer és Kábítószer-függőség Európai Megfigyelőközpontja: Európai kábítószer-jelentés, Tendenciák és fejlemények, 2017. Link: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001HUN.pdf_en
- [3] W. D Wessinger, J. H Moran and K. A. Seely.: Synthetic Cannabinoids Effects on Behavior and Motivation, In: Patrizia Campolongo, Liana Fattore (Ed.), Cannabinoid Modulation of Emotion, Memory, and Motivation, Springer, 2015, 205-221.
- [4] É. Sija, R. Berkecz, S. Zsigrai, T. Janáky, É. Kereszty, T. Varga, L. Insititóris: Módszerfejlesztés szintetikus kannabinoidok kimutatására vizeletből, In: TOX'2015 Tudományos Konferencia, Harkány, Hungary, 2015.10.14-16.p. 76. 1 p. (poster).
- [5] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng: Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS, In: Anal. Chem. 2003. 75, 3019-3030
- [6] E. G. Yanes, D. P. Lovett: High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC-MS/MS, In: Journal of Chromatography B, 909 (2012), 42-50.