

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКУРОНИДНОЙ И СВОБОДНОЙ ФОРМЫ Δ^9 -ТЕТРАГИДРОКАННАБИНОЛА В МОЧЕ МЕТОДОМ СВЕРХПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

А.Л. Чуловская, М.А. Дикунец

Анна Леонидовна Чуловская *

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый центр», Елизаветинский пер., 10/1, Москва, Российская Федерация, 105005.

Кафедра экспертизы в допинг- и наркоконтроле, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Миусская пл., 9, Москва, Российская Федерация, 125047

E-mail: chulovskaya@dopingtest.ru *

Марина Александровна Дикунец

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый центр», Елизаветинский пер., 10/1, Москва, Российская Федерация, 105005.

E-mail: dikunets@dopingtest.ru

Тетрагидроканнабинол (Δ^9 -ТГК) является липофильным соединением, в организме человека практически полностью метаболизирует до 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты (Δ^9 -ТГК-СООН). Для эффективного выведения почками Δ^9 -ТГК-СООН конъюгируется с глюкуроновой кислотой, превращаясь в более полярное и растворимое в воде соединение. Δ^9 -ТГК-СООН и Δ^9 -ТГК-СООН-глюкуронид являются основными маркерами употребления марихуаны. Для извлечения целевых соединений использовали жидкость-жидкостную экстракцию, разрушение химических связей конъюгатов осуществляли посредством ферментативного гидролиза (β -глюкуронидаза E.-Coli K12). Анализ метаболитов Δ^9 -ТГК в моче проводили методом сверхпроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией с электрораспылительной ионизацией в режиме регистрации отдельных реакций. В работе представлены результаты масс-спектрометрических параметров регистрации депротонированной молекулы Δ^9 -ТГК-СООН с m/z 343, в результате которой определены величина энергии соударений для получения ионов-продуктов с максимальной интенсивностью и точное значение амплитуды радиочастоты S-образной линзы. Показано, что регистрация отрицательных ионов при определении Δ^9 -ТГК-СООН является предпочтительной. Выбраны переходы, которые позволяют повысить чувствительность и селективность определения Δ^9 -ТГК-СООН, а также исключить влияние компонентов матрицы. Определено, что переход m/z 343 \rightarrow 245 (30 эВ) обладает наибольшей интенсивностью и минимальной интерференцией коэлюирующих компонентов матрицы. Рассчитаны концентрации и процентное содержание глюкуронидной и свободной фракций Δ^9 -ТГК-СООН в образцах мочи лиц, употреблявших марихуану. Концентрации глюкуронидной и свободной формы Δ^9 -ТГК-СООН в организме человека изменяются не пропорционально. Показано, что при суммарной концентрации Δ^9 -ТГК-СООН в организме человека более 100 нг/мл концентрация свободной формы резко возрастает.

Ключевые слова: Δ^9 -тетрагидроканнабинол, метаболиты, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, моча

EVALUATION OF GLUCURONIDE AND FREE FORMS OF Δ^9 -TETRAHYDROCANNABINOL LEVELS IN URINE BY MEANS OF ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – TANDEM MASS SPECTROMETRY

A.L. Chulovskaya, M.A. Dikunets

Anna L. Chulovskaya *

Federal State-Funded Institution Antidoping centre, Elizavetinskiy lane, 10/1, Moscow, 105005, Russia
Department of Expert Analysis in Doping and Drug Control, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miuskaya sq., 9, 125047, Russia
E-mail: chulovskaya@dopingtest.ru *

Marina A. Dikunets

Federal State-Funded Institution Antidoping centre, Elizavetinskiy lane, 10/1, Moscow, 105005, Russia
E-mail: dikunets@dopingtest.ru

*Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) is a lipophilic compound. It is shown that Δ^9 -THC in human is almost completely metabolized to 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid (Δ^9 -THC-COOH) that further is metabolized to Δ^9 -THC-COOH-glucuronide. Δ^9 -THC-COOH and Δ^9 -THC-COOH-glucuronide could be reliable markers of Δ^9 -THC abuse. Target compounds were extracted from urine by liquid-liquid extraction. Transformation of Δ^9 -THC-COOH-glucuronide to Δ^9 -THC-COOH was performed by enzymatic hydrolysis using β -glucuronidase from *E. Coli*. The urine was directly analyzed by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with electrospray ionization using selected reaction monitoring. During method development the optimal sample preparation conditions are suggested and mass-spectrometric parameters of deprotonated Δ^9 -THC-COOH (m/z 343) molecules detection are shown. Collision energy (CE) and exact S-lens amplitude were determined. It was revealed that registration of negative charges ions at the determination of Δ^9 -THC-COOH is preferred. Transitions which could increase sensitivity and selectivity of Δ^9 -THC-COOH determination were selected. It was determined that the transition with m/z 343 \rightarrow 245 (CE-30 eV) had the largest intensity and minimum interferences with matrix components. Furthermore, concentrations and percentage of both glucuronide and free fractions of Δ^9 -THC-COOH were calculated. Increasing level of cannabinoids in human organism results in non-proportional changes of Δ^9 -THC-COOH-glucuronide and free-form concentrations. Thus, when total level of cannabinoids reaches more than 100 ng/ml severe enhancement of free-form is inspected.*

Key words: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, metabolites, ultra-performance liquid chromatography, mass spectrometry, urine

Для цитирования:

Чуловская А.Л., Дикунец М.А. Оценка содержания глюкуронидной и свободной формы Δ^9 -тетрагидроканнабинола в моче методом сверхпроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. *Иzv. вузов. Химия и хим. технология*. 2017. Т. 60. Вып. 4. С. 95–99.

For citation:

Chulovskaya A.L., Dikunets M.A. Evaluation of glucuronide and free forms of Δ^9 -tetrahydrocannabinol levels in urine by means of ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2017. V. 60. N 4. P. 95–99.

ВВЕДЕНИЕ

Всемирным Антидопинговым Агентством применение марихуаны запрещено во всех видах спорта в соревновательный период [1], поэтому

установление факта употребления марихуаны является важным этапом практики лабораторий антидопингового контроля. Основным компонентом, отвечающим за психоактивные свойства марихуаны, является Δ^9 -тетрагидроканнабинол (Δ^9 -ТГК).

Δ^9 -ТГК – липофильное соединение, практически полностью метаболизируется в организме [2,3]. Основной путь его метаболизма осуществляется за счет быстрого окисления углерода аллильной группы энзимной системой печеночного цитохрома P450 до первичного психоактивного короткоживущего 11-гидрокси-дельта-9-тетрагидроканнабинола (Δ^9 -ТГК-ОН), который под действием алкогольдегидрогеназы окисляется в конечный биологически неактивный продукт 11-нор-9-карбокси-дельта-9-тетрагидроканнабиноловую кислоту (Δ^9 -ТГК-СООН), выделяющуюся с мочой в виде конъюгата с глюкуроновой кислотой. Метаболизм Δ^9 -ТГК представлен на схеме. Именно наличие Δ^9 -ТГК-СООН в моче является важным показателем для установления факта употребления марихуаны.

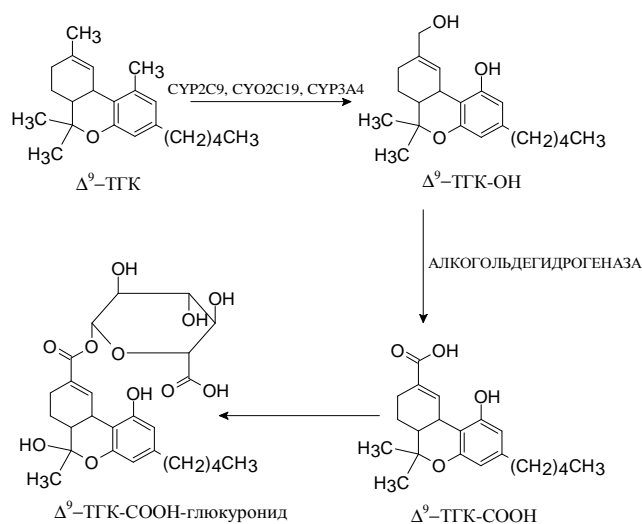


Схема. Метаболизм Δ^9 -ТГК
 Scheme. Biotransformation of Δ^9 -THC

Отмеченные особенности метаболизма Δ^9 -ТГК предъявляют жесткие требования к выбору аналитического метода, способного обеспечить быстрый и точный анализ, а также подходящую пробоподготовку биообъекта. Традиционные методики пробоподготовки для анализа каннабиноидов хромато-масс-спектрометрическим методом довольно длительны и трудоемки, позволяют определить суммарное количество свободного и связанного Δ^9 -ТГК [4, 5]. В последнее время все большее применение получает метод сверхпроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (СВЭЖХ–МС/МС), который позволяет проводить определение запрещенных веществ и их метаболитов как в виде конъюгатов, так и в виде свободных соединений [6-8].

Цель настоящей работы заключалась в выборе условий, позволяющих из одной фракции мочи отдельно определить как свободную, так и связанную формы Δ^9 -ТГК-СООН, оценить их процентное содержание.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали сертифицированную бланковую мочу, не содержащую Δ^9 -ТГК-СООН (NCU); мочу, содержащую 30 нг/мл Δ^9 -ТГК-СООН (PCU); 5 образцов мочи лиц, употреблявших марихуану, предоставленные химико-токсикологической лабораторией Московского научно-практического центра наркологии.

Для извлечения свободной Δ^9 -ТГК-СООН к аликвотам (3 мл) исследуемых образцов мочи добавляли 1 мл фосфатного буферного раствора (pH = 6,2-6,5), 5 мл диэтилового эфира и проводили жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) на орбитальном автоматическом шейкере в течение 20 мин. Полученную аликвоту криостатировали, затем количественно органический слой переносили в пробирку и упаривали досуха в твердофазном нагревателе. К сухому остатку добавляли 50 мкл метанола и 50 мкл воды, экстракт переносили в полипропиленовые виалы и закрывали крышкой. Выраженная способность каннабиноидов к образованию конъюгатов с глюкуроновой кислотой требует проведения дополнительной стадии пробоподготовки – ферментативного гидролиза, позволяющего разрушить моно- и диглюкурониды. Для этого водный слой размораживали, добавляли 30 мкл β -глюкуронидазы *E.-Coli* K12 (Roshe, Германия) и перемешивали. Ферментативный гидролиз проводили в инкубаторе при температуре 55 °C в течение 60 мин. По его окончании в каждую пробирку добавляли 1-2 г сульфата натрия, 1 мл карбонатного буферного раствора (pH = 9,6-9,9), 5 мл диэтилового эфира и проводили ЖЖЭ в течение 20 мин. После экстракции проводили аналогичные действия, как и с органическим слоем, содержащим свободную Δ^9 -ТГК-СООН.

Анализ метаболитов Δ^9 -ТГК проводили на жидкостном хроматографе модели UltiMate 3000 фирмы Dionex (Германия) с масс-спектрометрическим детектором TSQ Vantage фирмы Thermo Fisher Scientific (США), имеющим внешний источник электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком (ЭРИНП).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ионизация Δ^9 -ТГК-СООН может протекать в режиме регистрации положительных и отрица-

тельных ионов, так как в ее структуре имеется карбоксильная группа. В условиях ЭРИНП с регистрацией положительных ионов Δ^9 -ТГК-СООН образует протонированную молекулу $[M+H]^+$ с m/z 345 и ионы-аддукты с натрием и метанолом: $[M+Na]^+$ с m/z 367, $[M-H+2Na]^+$ с m/z 399, $[M+Na+CH_3OH]^+$ с m/z 389, $[M-H+2Na+CH_3OH]^+$ с m/z 421. В режиме регистрации отрицательных ионов Δ^9 -ТГК-СООН образует только депротонированную молекулу с m/z 343, а ее дейтерированный аналог d_3 - Δ^9 -ТГК-СООН – депротонированную молекулу с m/z 346, соответственно. Таким образом, при определении Δ^9 -ТГК-СООН в условиях ЭРИНП регистрация отрицательных ионов является предпочтительной.

В табл. 1 представлены результаты оптимизации масс-спектрометрических параметров регистрации депротонированной молекулы Δ^9 -ТГК-СООН при помощи специализированного программного обеспечения прибора, полученные прямым вводом в масс-спектрометр раствора соединения (0,01) мг/мл со скоростью 10 мкл/мин с использованием встроенного шприцевого насоса. Данные по диссоциации иона-прекурсора в ячейке столкновений с атомами аргона, позволили установить точную величину энергии соударений для получения ионов-продуктов с максимальной интенсивностью и точное значение амплитуды радиочастоты S-образной линзы (S_L). S_L фокусирует пучок ионов под действием радиочастотного излучения, что повышает чувствительность. Амплитуда радиочастоты S_L – стандартная величина, необходимая для задания масс-спектрометрических параметров для проведения анализа.

Таблица 1

Оптимальные масс-спектрометрические параметры регистрации депротонированной молекулы Δ^9 -ТГК-СООН

Table 1. Optimized MS/MS conditions of Δ^9 -THC-COOH deprotonated molecule detection

Δ^9 -ТГК-СООН	Ион-прекурсор, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия столкновений, эВ	S_L , В
	343,1	299,0	24	
		245,0	30	
		191,0	37	
		325,0	24	
		297,0	28	
		179,0	30	
		203,0	40	
		229,0	39	

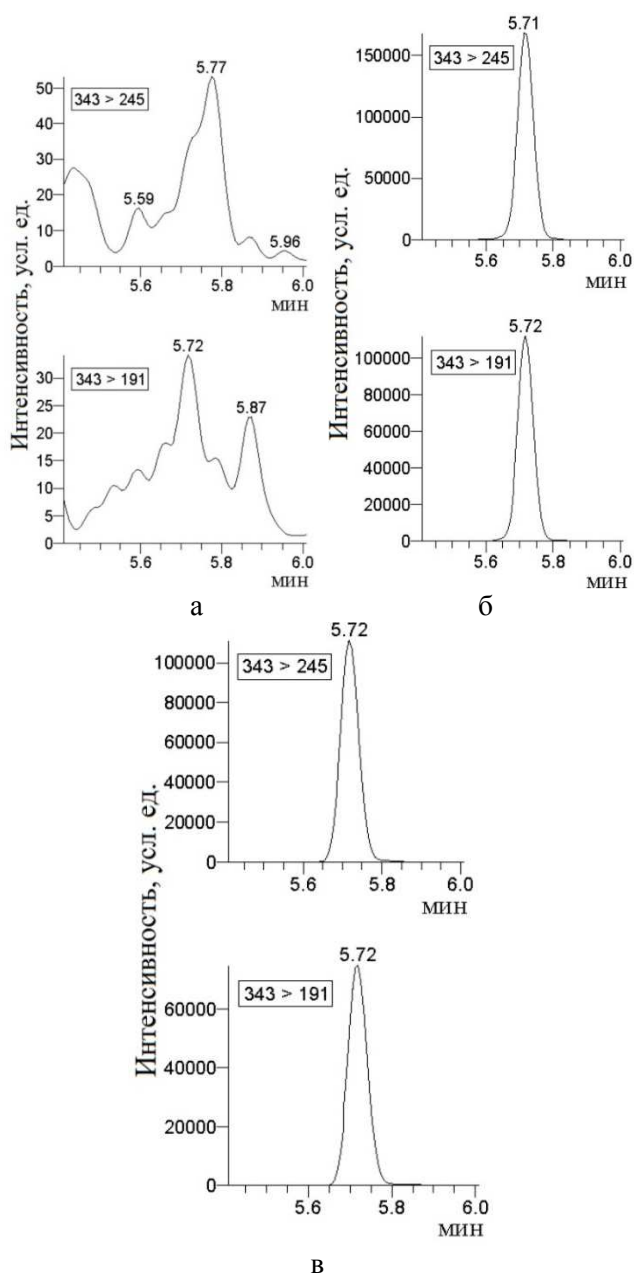


Рис. Масс-хроматограммы образцов мочи: не содержащей Δ^9 -ТГК-СООН (а), с добавлением 30 нг/мл Δ^9 -ТГК-СООН (б), после приема марихуаны (в)

Fig. SRM chromatograms of negative urine(a), negative urine spiked with 30 ng/ml of Δ^9 -THC-COOH (б) and excretion urine after cannabis (в)

Сравнительный анализ масс-хроматограмм экстрактов образцов мочи, заведомо не содержащих Δ^9 -ТГК-СООН, с образцами, содержащими Δ^9 -ТГК-СООН, полученных методом СВЭЖХ-МС/МС в режиме регистрации отдельных реакций, то есть регистрации определенных ионов-продуктов, образующихся из выбранного иона-прекурсора с определенным значением m/z , позволил выбрать

переходы (m/z 343 \rightarrow 245 и m/z 343 \rightarrow 191), позволяющие не только исключить влияние компонентов матрицы (мочи), но и повысить чувствительность и селективность определения Δ^9 -ТГК-СООН.

На рис. 1 представлены масс-хроматограммы исследуемых образцов мочи. Переход m/z 343 \rightarrow 245 (30 эВ) обладает наибольшей интенсивностью и минимальной интерференцией с компонентами матрицы.

Сопоставление интенсивностей высот хроматографических пиков в образцах мочи позволило рассчитать концентрации глюкуронидной и свободной фракции Δ^9 -ТГК-СООН. Общую концентрацию Δ^9 -ТГК-СООН в моче лиц, употреблявших марихуану, рассчитывали, суммируя концентрации двух фракций, и производили пересчет в процентное соотношение Δ^9 -ТГК-СООН-глюкуронида к Δ^9 -ТГК-СООН после выведения из организма (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация свободной и глюкуронидной формы Δ^9 -ТГК-СООН

Table 2. Concentrations of glucuronide and free fractions of Δ^9 -THC-COOH

№	Концентрация					
	Общая		Δ^9 -ТГК-СООН-глюкуронида		Δ^9 -ТГК-СООН	
	нг/мл	%	нг/мл	%	нг/мл	%
1	4,4	100	4,3	97	0,1	3
2	16,6	100	14,5	87	2,1	13
3	31,2	100	28,1	90	3,1	10
4	48,6	100	45,4	93	3,2	7
5	533,6	100	418,9	79	114,7	21

С увеличением содержания каннабиноидов в организме концентрации глюкуронидной и свободной формы Δ^9 -ТГК-СООН изменяются не пропорционально: наблюдается резкое увеличение свободной формы при общем содержании каннабиноидов более 100 нг/мл. Поэтому для определения Δ^9 -ТГК-СООН нельзя пренебрегать свободной формой, так как стандартное отклонение при расчете концентрации будет велико.

ВЫВОДЫ

Таким образом, для определения метаболита марихуаны методом СВЭЖХ-МС/МС регистрация отрицательных ионов является предпочти-

тельной. Проведена оптимизация масс-спектрометрических параметров регистрации депротонированной молекулы Δ^9 -ТГК-СООН с m/z 343, а именно, оптимизация амплитуды радиочастоты S-образной линзы и выбор ионов-продуктов. Рассчитаны концентрации и процентное содержание как глюкуронидной, так и свободной фракций Δ^9 -ТГК-СООН.

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

1. The Prohibited List International Standard, January 2017 [Электронный ресурс] URL: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list> (дата обращения-28.01.2017) The Prohibited List International Standard, January 2017 [Electronic resource] URL: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2017-dl> (date of access-28.01.2017).
2. **Brenneisen R., Meyer P., Chtioui H., Saugy M., Kamber M.** Plasma and urine profiles of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its metabolites 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol after cannabis smoking by male volunteers to estimate recent consumption by athletes. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. N 7. P. 2493-2502. DOI: 10.1007/s00216-009-3431-3.
3. **Takeda S., Jiang R., Aramaki H., Imoto M., Toda A., Eyanagi R., Amamoto T., Yamamoto I., Watanabe K.** Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its major metabolite Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid as 15-lipoxygenase inhibitors. *J. Pharm. Sci.* 2011. V. 100. N 3. P. 1206-1211. DOI: 10.1002/jps.22354.
4. **Cela-Perez M.C., Bates F.L., Jimenez-Morigosa C., Lendoiro E., de Castro A., Lopez-Rivadulla M., Cruz A, Lopez-Vilarino J.M., Gonzalez-Rodríguez M.V.** Water-compatible imprinted pills for sensitive determination of cannabinoids in urine and oral fluid. *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1429. P. 53-64. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.011.
5. **Kim S.Y., Kim J.Y., Kwon W., In M.K. Kim Y.E., Paeng K.J.** Method development for simultaneous determination of amphetamine type stimulants and cannabinoids in urine using GC-MS. *Microchem. J.* 2013. V. 110. P. 326-333. DOI: 10.1016/j.microc.2013.04.004.
6. **Lee K.M., Kim H.J., Son J., Park J.H., Kwon O.S., Lee J.** Simple quantitation of formoterol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in doping control. *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 967. P. 8-12. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.07.009.
7. **Thevis M., Thomas A., Schanzer W.** Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. N 2. P. 405-420. DOI: 10.1007/s00216-011-4859-9.
8. **Rumpler M.J.** Quantitative analysis of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC-MS/MS following a simple filtration. *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 957. P. 77-83. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.02.056.

Поступила в редакцию 01.02.2017
Принята к опубликованию 14.03.2017

Received 01.02.2017
Accepted 14.03.2017