



STABILITY OF JWH-200 AND 5F-AB-PINACA SYNTHETIC CANNABINOIDS IN BLOOD AND URINE

Piotr ADAMOWICZ¹, Aleksandra MALCZYK²

¹ *Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

² *Jagiellonian University, Faculty of Chemistry*

Abstract

Synthetic cannabinoids (SC) are the largest group of new psychoactive substances. Their popularity and prevalence causes that they are often detected in biological material, however, their determination is a great challenge for toxicologists, and one of the problems that can be faced during the analysis is the instability of the concentrations of the analysed substances. The aim of the study was to determine the stability of two of them: JWH-200 and 5F-AB-PINACA in whole blood and urine samples stored under different temperature conditions for a period of six months.

Blood and urine enriched with JWH-200 and 5F-AB-PINACA were tested. The material was stored at room temperature (24°C), refrigerated (5°C) and frozen (-26°C) for six months. The extraction was performed initially daily, and then at 1–4 week intervals. The analyses were carried out by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The calculated SC content over time allowed estimation of the half-life and total degradation time of the tested compounds.

The stability of the analysed compounds was strongly dependent on the matrix. Both compounds disappeared more slowly in the urine, while this process was faster in the blood. The content of both compounds in blood stored in different conditions ranged from 30 to 53% of the initial value after storage for six months, and in the urine these values ranged from 52 to 77%. In the case of 5F-AB-PINACA, regardless of the matrix, the rate of this process depended on the storage temperature; the lower the temperature, the greater the stability of this compound. No significant differences were observed in the degradation rate of JWH-200 at different storage temperatures.

The results of research indicate that long-term storage of blood containing SC may lead to a gradual decrease in the content of analytes, thus determining a lower concentration than that which was present at the time of sampling. This shows that regardless of the storage temperature, the analyses for SC should be carried out as soon as possible after sampling.

Keywords

Stability; Synthetic cannabinoids; Biological material; LC-MS/MS.

Received 29 March 2019; accepted 5 November 2019

1. Introduction

Synthetic cannabinoids (SC) are the largest group of new psychoactive substances monitored by the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). JWH-018 was the first synthetic cannabinoid which emerged in drug market in 2006, and two years later was identified in a prepara-

tion called “Spice”. Since then, almost 180 synthetic cannabinoids were detected and reported by the Early Warning System (EWS) of the European Union (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2018). United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) is another organisation responsible for control over global situation of narcotics. In years 2009–2016, 65 countries reported more than 240 these

substances to it (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011).

They are a group of very diverse compounds currently, 14 chemical groups of these substances are known (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2017). Their common feature consists in the fact that imitating the action of tetrahydrocannabinol (THC; United Nations Office on Drugs and Crime, 2011), they have an ability to impact the cannabinoid receptors in the organism. In spite of the fact they are advertised as “legal” and “safe” alternatives for marijuana, their use is connected with a high risk of health loss, or even loss of life. The most frequent adverse effects caused by synthetic cannabinoids include: agitation, aggressive behaviour, ravings, drowsiness, anxiety, hallucinations, psychoses, memory loss, nausea, vomiting, convulsions, hypertension, tachycardia, loss of consciousness and coma. Their use may lead to kidney damage, as well as death, often as a result of acute circulatory-respiratory failure, usually preceded by a heart attack (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2017; Cunningham, Gallegos, Francis, Evans-Brown, 2015).

Because of their popularity and widespread, these substances are frequently detected in biological material collected from both alive persons (e.g. drivers), and corpses (e.g. from persons fatally poisoned with these substances). Determination of these substances in biological material is a difficult challenge for toxicologists, and the problems which may arise during the analysis include instability of concentrations of the analysed substances. In the meantime, their stability and changes in concentrations which may occur during transport and storage, should be well-known. Sometimes, up to several months may pass between collection of samples, screening tests, and determinations of specific substances, and such delays may result in changes in concentrations of synthetic cannabinoids being unstable in biological material. Their degradation may lead to detection of underrated concentrations, and, in consequence, incorrect interpretation of the obtained results.

Considering the above, the goal of this work was to define the stability of concentrations of JWH-200 and 5F-AB-PINACA synthetic cannabinoids (Fig. 1) in whole blood and urine stored at various temperatures for a duration of six months.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

JWH-200, 5F-AB-PINACA and JWH-018-D₉ (internal standard, IS) were purchases from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA). Methanol, acetonitrile (MeCN), and formic acid ($\geq 98\%$) were purchased from Merck (Warsaw, Poland). Blood used in the experiment was obtained from a regional blood donation centre. Urine was obtained from a person who was not using any narcotics or medications.

2.2. Preparation of biological material and course of the experiment

Standards of synthetic cannabinoids were added to blood and urine (60 ml of each of the materials), achieving their concentrations of 100 ng/ml. The samples were stirred for 30 minutes. After the thorough stirring, three blood samples and three urine samples (0.2 ml each) were collected, and the analytes were isolated from them according to the procedure described below. The samples were analysed, and the obtained results (the ratio of the analyte surface area to the internal standard surface area) were averaged and taken as 100% of the analyte contents (initial value). Then, the blood and urine samples were divided into three equal portions and placed in glass vials (not containing any additives including anticoagulant and stabilisers) with a capacity of 20 ml. Every vial was stored under different conditions: frozen (-26°C), cooled (5°C) and at room temperature (24°C). During the 6-month experiment, the temperatures were moni-

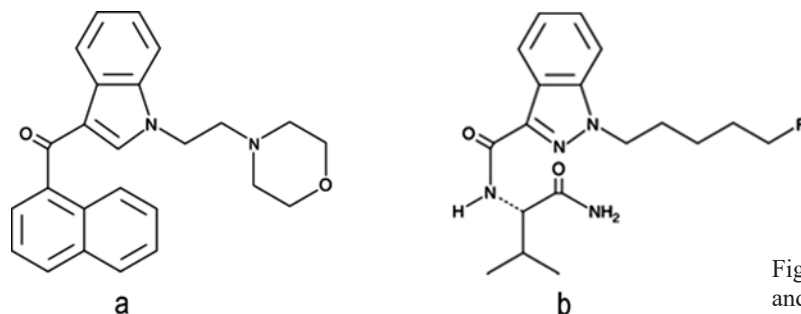


Fig. 1. Chemical formulas of JWH-200 (a) and 5F-AB-PINACA (b).

tored continuously using temperature sensors supported by Q-MSystem (POL-LAB). The temperature data were analysed by Q-MSoft software (version 1.3.1.0). The precisely measured storage temperatures were as follows: (mean \pm SD; Min; Max; number of measurements): freezer $-25.98 \pm 2.44^\circ\text{C}$; -30.7°C ; -20.9°C ; 3108, refrigerator $4.63 \pm 0.57^\circ\text{C}$; 3.3°C ; 8.2°C ; 3108, room temperature $24.16 \pm 0.45^\circ\text{C}$; 20.9°C ; 25.4°C ; 1454. At first, isolation of the analytes and concentration measurements were carried out daily (days 1–3), and then in 1–4-week intervals for a period of six months. The obtained results were compared with the initial values mentioned above. The calculated contents of synthetic cannabinoids were plotted vs. time, and then, curves were fitted for them.

Validation was limited to necessary parameters in the scope of the experiment, *i.e.* selectivity and precision. The selectivity was tested by analyses of blood and urine used in the experiment, free from the analytes, as well as by analysis of these materials enriched with JWH-200 and 5F-AB-PINACA (100 ng/ml). This experiment allowed for ascertaining whether a co-elution of endogenous matrix components together with the analytes occurred. Precision of the determinations was calculated for the concentration of 100 ng/ml ($n = 6$).

2.3. Isolation

Blood or urine samples (0.2 ml) were placed in plastic vials having a capacity of 2.0 ml. Then, 20 μl of an internal standard solution with a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were added, to a final concentration of 100 ng/ml of blood or urine. The samples were precipitated using cooled acetonitrile added dropwise (drop volume 0.6 ml). During the addition, the samples were stirred continuously. In the next step, the samples were stirred for 5 minutes, and then centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The organic phase was transferred into glass vials with a capacity of 2 ml, and then evaporated to dryness in a stream of air at 30°C . Dry residues were dissolved in 100 μl of a 1 : 4 mixture of 0.1% formic acid in acetonitrile (v/v) and 0.1% formic acid in water (v/v). Next, they were transferred into cartridges of autosampler vials. The injection volume was 10 μl .

2.4. Apparatus

The analyses were carried out using an Agilent Technologies 1200 series liquid chromatograph coupled with a 6460 Triple Quad mass spectrometer. Separation of the analytes was performed on a Kinetex C18 2.6 μ 100A (100 \times 4.6 mm) column from Phe-

nomenex. The mobile phase consisted of a mixture of 0.1% formic acid in MeCN (v/v) and 0.1% formic acid in water (v/v) and flowed with a rate of 0.5 ml/min. The analyses were carried out in the gradient mode (in reference to MeCN content): 0 min – 10%, 1 min – 10%, 13 min – 90%, 16 min – 90%, 16.5 min – 10%, 22 min – 10% (total analysis time – 22 min). Retention times of the analytes were 9.7 min (JWH-200) and 11.5 min (5F-AB-PINACA). Dynamic multiple reactions monitoring (dMRM) was used. For every compound, three MRM pairs were monitored (385.2 \rightarrow 155.0; 385.2 \rightarrow 127.0; 385.2 \rightarrow 114.1 for JWH-200; 349.2 \rightarrow 332.1; 349.2 \rightarrow 304.1; 349.2 \rightarrow 233.1 for 5F-AB-PINACA, and 351.2 \rightarrow 223.1; 351.2 \rightarrow 155.0 and 351.2 \rightarrow 127.0 for JWH-018-D₉). Parameters of the mass detector were as follows: capillary voltage: 3000 V; gas flow (nitrogen): 10 l/min; gas temperature: 325°C ; protective gas flow: 11 l/min; protective gas temperature: 325°C ; nebulizer pressure: 40 psi; acceleration voltage in the collision chamber: 7 V. Fragmentor voltage for the individual compounds and collision energies for consecutive MRM pairs amounted to 128; 16, 48, 24 V (JWH-200) and 68; 4, 12, 20 V (5F-AB-PINACA), respectively. The apparatus was operated and the results were analysed using MassHunter software from Agilent Technologies (version B.04.01).

3. Results

The selectivity tests carried out did not exhibit presence of endogenous components which could interfere with the signals originating from the analytes. For both matrices, precision was not exceeding the assumed limit equal to 15% RSD (for JWH-200: 4.4% – blood and 7.9% – urine; for 5F-AB-PINACA: 8.0% – blood and 11.9% – urine).

The obtained consecutive measurement points were compared with the initial values (considered 100%) and percentages of each synthetic cannabinoid in consecutive measurement days were determined. The obtained measurement points were entered into Microsoft Excel calculation spreadsheet. It allowed for fitting functions (linear or exponential). Detailed test results are shown in the form of stability curves, *i.e.* plots of dependences between the concentrations of the individual synthetic cannabinoids (expressed as percentages of the initial concentration) vs. storage times of various materials at different temperatures (Fig. 2). The determined equations of the functions allowed for estimating the half-life time and the total decay time of the studied compounds. Functions

with the highest coefficients of determination R^2 were chosen for the calculations. The half-life periods were estimated on the basis of the fitted linear or exponential functions, while the total decay times – using only linear functions. The estimated SC half-life time was in the range of ca. 2–3 months to more than two years (Table I).

4. Discussion

So far, research aimed for determination of the long-term stability of synthetic cannabinoids was rarely carried out. Investigations of such a type are not always required in validation processes of methods used in toxicological tests (Scientific Working Group for Forensic Toxicology, 2013). An obvious cause

of such a situation is constituted by long times of these tests. Most often, studies of stability of synthetic cannabinoids in various biological materials were carried out with a duration of several days to several weeks. Dresen, Kneisel, Weinmann, Zimmermann, and Auwärter (2011) determined stabilities of JWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-250, WIN 55,212-2, and methanamide in serum stored at -20°C for one week. Stability studies of 15 synthetic cannabinoids in blood were carried out also by Karinen et al. (2013). In turn, Kacinko et al. (2011) studied stability of JWH-018, JWH-073, JWH-019 and JWH-250 in blood stored under various conditions for a period of 30 days. Ammann, McLaren, Gerostamoulos, and Beyer (2012) carried out investigations of 25 synthetic cannabinoids in blood stored for six weeks at a temperature of -20°C . Stability of 20 synthetic cannabi-

Table 1

Estimated half-life times and complete decay times of JWH-200 and 5F-AB-PINACA in blood and urine in years (y), months (m) and days (d)

Compound	Blood – estimated time of					
	half-life			complete degradation		
	-26°C	$+5^{\circ}\text{C}$	$+24^{\circ}\text{C}$	-26°C	$+5^{\circ}\text{C}$	$+24^{\circ}\text{C}$
JWH-200	3.3 m	3.7 m	2.9 m	11.8 m	8.3 m	8.5 m
5F-AB-PINACA	6.5 m	2.6 m	3.9 m	1.1 y	9.0 m	7.7 m

Compound	Urine – estimated time of					
	half-life			complete degradation		
	-26°C	$+5^{\circ}\text{C}$	$+24^{\circ}\text{C}$	-26°C	$+5^{\circ}\text{C}$	$+24^{\circ}\text{C}$
JWH-200	8.0 m	8.6 m	1.0 y	1.5 y	1.5 y	> 2 y
5F-AB-PINACA	2.2 y	10.7 m	9.5 m	> 3 y	1.8 y	1.6 y

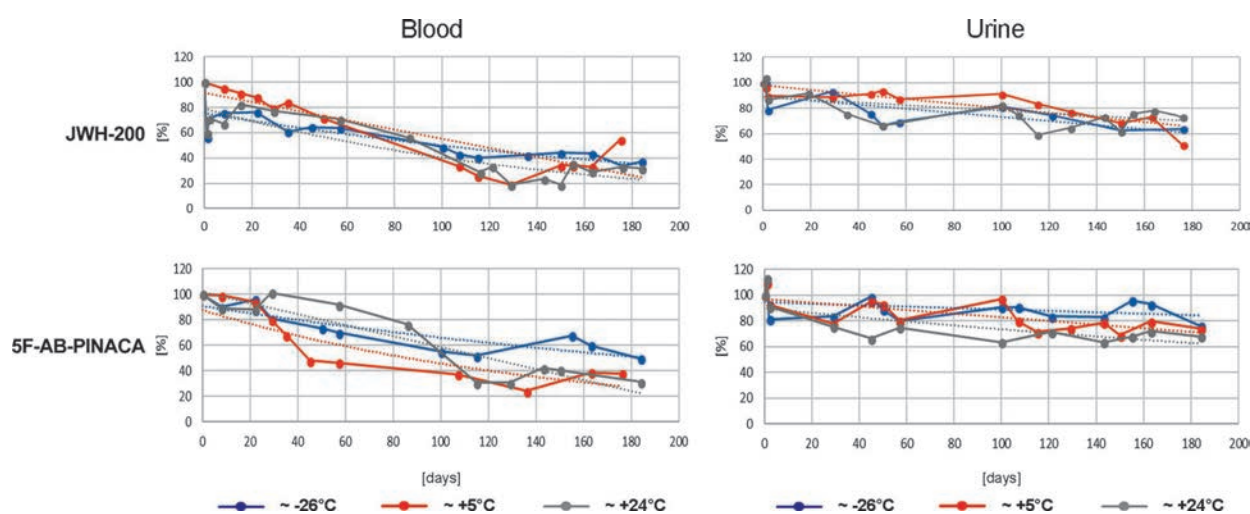


Fig. 2. Stability of JWH-200 and 5F-AB-PINACA in blood and urine.

noids in urine stored for 72 hours under various conditions was studied by Scheidweiler and Huestis (2014). Examinations of their stability in saliva were carried out by Kneisel and co-workers (Kneisel et al., 2013; Kneisel, Speck, Moosmann, Auwärter, 2013).

Works focused on determination of stability of these substances in biological materials stored for a prolonged time are scarce. Stabilities of AB-FUBINACA, AB-PINACA, XLR-11, and UR-144 in blood stored at temperatures of -20°C , 4°C and 22°C for 12 weeks were determined by Fort, Jourdan, Kemp, and Curtis (2017). The broadest and longest research was carried out by Hess, Krueger, Unger, and Madea (2017), studying stabilities of more than 80 synthetic cannabinoids in serum stored at temperatures of -20°C and 4°C for 150 days.

The goal of the present study was to evaluate the impact of temperature, storage time, and type of biological matrix on stability of two substances: JWH-200 and 5F-AB-PINACA, belonging to various groups – aminoalkylindoles and indazoles, respectively. Stability of the studied compounds depended strongly on the matrix. Both substances underwent to a slower decay in urine. The process of their degradation in blood occurred at a faster rate. After a half-year storage, contents of both compounds in blood stored under various conditions amounted to 30–53% of the initial value, while their contents in urine were in the range of 52 to 77%. In the case of 5F-AB-PINACA, the rate of this process depended on the storage temperature regardless of the matrix, and the lower the temperature, the higher the stability of the compound. No significant differences in the JWH-200 degradation rate at various storage temperatures were observed (slightly longer times obtained for higher temperatures may result from the simple way of estimation of these values). The analyte degradation rates could be estimated also on the basis of the fitted functions. Loss of JWH-200 in blood amounted to ca. 8–12% per month (depending on the storage temperature), while in urine – ca. 4–5% per month. These values for 5F-AB-PINACA amounted to 8–13% per month in blood and 2–5% per month in urine.

So far, no such a long experiment was carried out for JWH-200 and 5F-AB-PINACA present in blood and urine. Scheidweiler and Huestis (2014) proved that JWH-200 was stable in urine for 72 hours at a temperature of 4°C (90.0–94.8% of the initial content) and for 16 hours at room temperature (90.0–93.1% of the initial content). These results are close to those obtained during the experiment by the authors of this paper. On the basis of functions fitted to the measurement points obtained during the experiment being de-

scribed herein, it was calculated that JWH-200 content in urine both after 16 hours at room temperature, and after 3 days at a temperature of 5°C , should amount to 88.5% and 97.6%, respectively. Also, stability of JWH-200 in serum was studied (Dresen et al., 2011). It was proved that after three days of storage of the serum at room temperature, content of this compound decreased to 84.7–87.9% (depending on the vial type). After a week, JWH-200 content in serum stored at a temperature of -20°C was 102.6–103.7% (depending on the concentration). Similar results were obtained by Karinen et al. (2013) for JWH-200 in blood stored for a period of one week. Depending on the storage temperature (room temp., 4°C and -20°C), changes in concentration in the range of -1.8% to +7.6% were observed. JWH-200 was characterised also by stability in saliva stored for 3 days at temperatures of 4°C and 25°C and for 14 days at a temperature of -20°C (Kneisel et al., 2013a, 2013b).

Hess et al. (2017) studied stability of 84 synthetic cannabinoids in serum stored at room temperature, 4°C , and -20°C . The authors proved that 51 of 84 compounds were stable after 315 days of storage of the material at a temperature of -20°C (loss of more than 20% of the initial value was considered an instability). It was observed that at this temperature, 82 compounds were stable for at least one month. Their stabilities at temperatures of 4°C and 20°C were significantly worse. The analysed compounds include 5F-AB-PINACA, however lack of exact values and a different biological material studied prevent a comparison of results.

The results of the experiment carried out may help in development of proper procedures for transport and storage of biological material. Samples transported to a lab not always undergo tests immediately, which may be caused by e.g. verification of results or limitations of the methodology. Prolonged storage of the samples containing synthetic cannabinoids, particularly blood, may result in slow decay of the analytes. Lower storage temperatures may inhibit or hinder the analyte loss, however, an understated indication of concentration or even failure to indicate an analyte, may result in erroneous interpretation of the results of toxicological analysis. The studies carried out indicate unambiguously that toxicological analyses of biological material, in which presence of these substances is suspected, should be performed in the shortest time possible. The experiment was to simulate storage of blood samples collected from alive persons. In the case of material collection from deceased persons, the investigated processes may have a different course.

5. Conclusions

During the experiment, long-term stability of two synthetic cannabinoids, JWH-200 and 5F-AB-PIN-ACA, was studied. The factors affecting their stability in time were constituted by the matrix type (to a higher degree) and storage temperature (to a lower degree). The results of experiments indicate that long-term storage of blood containing these compounds may lead to a gradual decrease in the contents of analytes, therefore a determination of a lower concentration than that present at the time of collection of the samples. It proves that regardless of the storage temperature, the analyses directed to synthetic cannabinoids should be carried out in the shortest possible time after collection of the material.

References

1. Ammann, J., McLaren, J. M., Gerostamoulos, D., Beyer, J. (2012). Detection and quantification of new designer drugs in human blood: Part 1 – Synthetic cannabinoids. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(6), 372–380.
2. Cunningham, A., Gallegos, A., Francis, W., Evans-Brown, M. (2015). Harms arising from the use of synthetic cannabinoid products. EMCDDA. Retrieved June, 06, 2019 from http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_242518_EN_07_LXAddictions_ACU_cannabinoids_FINAL.pdf
3. Dresen, S., Kneisel, S., Weinmann, W., Zimmermann, R., Auwärter, V. (2011). 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. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(2), 163–171.
4. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2018). European Drug Report 2018: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. Retrieved June, 06, 2019 from http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001ENN_PDF.pdf
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2016). Perspectives on drugs. Synthetic cannabinoids in Europe. Retrieved June, 06, 2019 from http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_212361_EN EMCDDA_POD_2013_Synthetic%20cannabinoids.pdf
6. Fort, C., Jourdan, T., Kemp, J., Curtis, B. (2017). Stability of synthetic cannabinoids in biological specimens: Analysis through liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(5), 360–366.
7. Hess, C., Krueger, L., Unger, M., Madea, B. (2017). Freeze-thaw stability and long-term stability of 84 synthetic cannabinoids in serum. *Drug Testing and Analysis*, 9(10), 1506–1511.
8. Kacinko, S. L., Xu, A., Homan, J. W., McMullin, M. M., Warrington, D. M., Logan, B. K. (2011). 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. *Journal of Analytical Toxicology*, 35(7), 386–393.
9. Karinen, R., Johnsen, L., Andresen, W., Christophersen, A. S., Vindenes, V., Oiestad, E. L. (2013). Stability study of fifteen synthetic cannabinoids of aminoalkylindole type in whole blood, stored in Vacutainer® evacuated glass tubes. *Journal of Forensic Toxicology & Pharmacology*, 2(1). doi:10.4172/2325-9841.1000106.
10. Kneisel, S., Speck, M., Moosmann, B., Auwärter, V. (2013). Stability of 11 prevalent synthetic cannabinoids in authentic neat oral fluid samples: glass versus polypropylene containers at different temperatures. *Drug Testing and Analysis*, 5(7), 602–6.
11. Kneisel, S., Speck, M., Moosmann, B., Cornillie, T. M., Butlin, N. G., Auwärter, V. (2013). 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4691–4706.
12. Scheidweiler, K. B., Huestis, M. A. (2014). Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1327, 105–117.
13. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (2013). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452–474.
14. United Nations Office on Drugs and Crime (2011). Synthetic cannabinoids in herbal products. Retrieved June, 06, 2019 from https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf

Corresponding author

Piotr Adamowicz
Institute of Forensic Research
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: padamowicz@ies.krakow.pl

STABILNOŚĆ SYNTETYCZNYCH KANNABINOIDÓW JWH-200 I 5F-AB-PINACA WE KRWI I MOCZU

1. Wstęp

Syntetyczne kannabinoidy (SC) stanowią największą grupę nowych substancji psychoaktywnych monitorowanych przez Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA). JWH-018 był pierwszym syntetycznym kannabinoidem, który trafił na rynek narkotykowy w 2006 roku i dwa lata później został zidentyfikowany w preparacie o nazwie „Spice”. Od tego czasu prawie 180 syntetycznych kannabinoidów wykryto i zgłoszono przez system wczesnego ostrzeżenia (EWS) Unii Europejskiej (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2018). Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości (UNODC) to kolejna organizacja odpowiedzialna za kontrolowanie globalnej sytuacji narkotykowej. W latach 2009–2016 65 krajów zaraportowało do niej ponad 240 tych substancji (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011).

Są one grupą związków bardzo różnorodnych – obecnie znanych jest 14 grup chemicznych tych substancji (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2017). Ich wspólną cechą jest to, że naśladując działanie tetrahydrokanabinolu (THC; United Nations Office on Drugs and Crime, 2011), mają zdolność oddziaływania na receptory kannabinoidowe w organizmie. Pomimo że są one reklamowane jako „legalne” i „bezpieczne” zamienniki marihuany, ich przyjmowanie wiąże się z dużym ryzykiem utraty zdrowia, a nawet życia. Do najczęstszych negatywnych efektów wywoływanych przez syntetyczne kannabinoidy należą pobudzenie, agresywne zachowanie, majaczenia, senność, lęki, omamy, psychozy, utrata pamięci, nudności, wymioty, drgawki, nadciśnienie, tachykardia, utrata przytomności i śpiączka. Ich przyjmowanie może prowadzić do uszkodzenia nerek, a także śmierci, często w wyniku ostrej niewydolności krążeniowo-oddechowej, zwykle poprzedzonej zawalem serca (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2017; Cunningham, Gallegos, Francis, Evans-Brown, 2015).

Popularność i rozpowszechnienie tych substancji sprawia, że są one często wykrywane w materiale biologicznym pobranym zarówno od żywych ludzi (np. kierowców), jak ze zwłok (np. od osób śmiertelnie zatrutych tymi substancjami). Ich oznaczanie w materiale biologicznym stanowi duże wyzwanie dla toksykologów, a jednym z problemów, który można napotkać podczas analizy, jest niestabilność stężeń badanych substancji. Tymczasem ich stabilność i zmiany stężeń, które mogą wystąpić podczas transportu i przechowywania, powin-

ny być dobrze poznane. Pomiędzy pobraniem próbek, badaniami przesiewowymi oraz oznaczeniami konkretnych substancji niekiedy może upłynąć do kilku miesięcy, a takie opóźnienia mogą skutkować zmianami stężeń syntetycznych kannabinoidów, które nie są stabilne w materiale biologicznym. Ich degradacja może skutkować wyznaczeniem zaniżonych stężeń, a w konsekwencji nieprawidłową interpretacją uzyskanych wyników.

Wobec powyższego celem niniejszych badań było określenie stabilności stężeń syntetycznych kannabinoidów JWH-200 i 5F-AB-PINACA (rys. 1) we krwi pełnej i moczu przechowywanych w różnych temperaturach przez okres sześciu miesięcy.

2. Materiał i metody

2.1. Odczynniki i materiały

JWH-200, 5F-AB-PINACA i JWH-018-D₉ (standard wewnętrzny, IS) zakupiono w firmie Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA). Metanol i acetonitryl (MeCN) oraz kwas mrówkowy (≥98%) zakupiono w firmie Merck (Warszawa, Polska). Krew stosowana podczas eksperymentu pochodziła z regionalnego centrum krwiodawstwa. Mocz pozyskano od osoby, która nie przyjmowała żadnych narkotyków ani leków.

2.2. Przygotowanie materiału biologicznego i przebieg eksperymentu

Wzorce syntetycznych kannabinoidów dodano do krwi i moczu (po 60 ml każdego materiału), osiągając ich stężenia 100 ng/ml. Próbkę mieszano przez pół godziny. Po dokładnym wymieszaniu pobrano trzy próbki krwi i trzy próbki moczu (po 0,2 ml każda), z których izolowano anality zgodnie z poniżej opisaną procedurą. Próbkę przeanalizowano, a uzyskane wyniki (stosunek powierzchni analitu do powierzchni standardu wewnętrznego) uśredniono i uznano za 100% zawartości analitów (wartość początkowa). Następnie próbki krwi i moczu podzielono na trzy równe porcje i umieszczono w szklanych fiolkach (niezawierających dodatków, w tym antykoagulantów i stabilizatorów) o pojemności 20 ml. Każdą fiolkę przechowywano w odmiennych warunkach: zamrożenia (-26°C), schłodzenia (5°C) i w temperaturze pokojowej (24°C). Podczas 6-miesięcznego eksperymentu temperatury były monitorowane w sposób ciągły z wykorzystaniem czujników temperatury obsługiwanych przez Q-MSystem (POL-LAB). Dane tempe-

ratury analizowano za pomocą oprogramowania Q-M-Soft (wersja 1.3.1.0). Dokładnie zmierzone temperatury przechowywania były następujące: (średnia \pm SD; Min; Maks; liczba pomiarów): zamrażarka $-25,98 \pm 2,44^\circ\text{C}$; $-30,7^\circ\text{C}$; $-20,9^\circ\text{C}$; 3108, lodówka $4,63 \pm 0,57^\circ\text{C}$; $3,3^\circ\text{C}$; $8,2^\circ\text{C}$; 3108, temperatura pokojowa $24,16 \pm 0,45^\circ\text{C}$; $20,9^\circ\text{C}$; $25,4^\circ\text{C}$; 1454. Izolacja analitów i pomiary stężeń były początkowo wykonywane codziennie (dni 1–3), a następnie w odstępach 1–4-tygodniowych – przez okres sześciu miesięcy. Uzyskane wyniki porównano z wyżej wymienionymi wartościami początkowymi. Obliczone zawartości syntetycznych kannabinoidów wykreślono w funkcji czasu, a następnie dopasowano do nich krzywe.

Walidacja została ograniczona do niezbędnych parametrów w zakresie eksperymentu, tj. selektywności i precyzji. Selektywność badano poprzez analizy krwi i moczu stosowanych w eksperymencie, wolnych od analitów, a także analizy tych materiałów wzbogaconych JWH-200 i 5F-AB-PINACA (100 ng/ml). Eksperyment ten pozwolił ustalić, czy dochodzi do koelucji endogennych składników matrycy wraz z analitami. Precyzję oznaczeń obliczono dla stężenia 100 ng/ml ($n = 6$).

2.3. Izolacja

Próbki krwi lub moczu (0,2 ml) umieszczano w plastikowych fiolkach o pojemności 2,0 ml. Następnie dodawano 20 μl roztworu standardu wewnętrznego o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ do uzyskania końcowego stężenia 100 ng/ml krwi lub moczu. Probki strącano schłodzonym acetonitrylem, który dodawano kroplami 0,6 ml. Podczas dodawania próbki mieszano w sposób ciągły. W następnym etapie próbki mieszano przez 5 minut, po czym wirowano przy 13000 obr/min przez 5 min. Fazę organiczną przenoszono do szklanych fiolek o pojemności 2 ml, po czym odparowano do sucha w strumieniu powietrza w temperaturze 30°C . Suche pozostałości rozpuszczono w 100 μl mieszaniny (1 : 4) 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v) i 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (v/v) po czym przenoszono je do wkładek do fiolek autosamplera. Objętość nastrzyku wynosiła 10 μl .

2.4. Aparatura

Analizy prowadzono przy zastosowaniu chromatografu cieczonego Agilent Technologies serii 1200 połączonego ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad. Rozdział analitów następował na kolumnie Kinetex C18 $2,6\mu$ 100A (100 x 4,6 mm) firmy Phenomenex. Faza ruchoma składała się z mieszaniny 0,1% kwasu mrówkowego w MeCN (v/v) oraz 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (v/v) i przepływała z szybkością 0,5 ml/min. Analizy przeprowadzono w trybie gradientowym (w odniesieniu do zawartości MeCN): 0 min – 10%, 1 min – 10%, 13 min – 90%, 16 min – 90%, 16,5 min – 10%,

22 min – 10 % (całkowity czas analizy – 22 min). Czasy retencji analitów wynosiły odpowiednio 9,7 min (JWH-200) i 11,5 min (5F-AB-PINACA). Zastosowano dynamiczne monitorowanie wielu reakcji (dMRM). Dla każdego związku monitorowano po trzy pary MRM (385,2 \rightarrow 155,0; 385,2 \rightarrow 127,0; 385,2 \rightarrow 114,1 dla JWH-200; 349,2 \rightarrow 332,1; 349,2 \rightarrow 304,1; 349,2 \rightarrow 233,1 dla 5F-AB-PINACA oraz 351,2 \rightarrow 223,1; 351,2 \rightarrow 155,0 i 351,2 \rightarrow 127,0 dla JWH-018-D₉). Parametry detektora masy były następujące: napięcie kapilary: 3000 V; przepływ gazu (azot): 10 l/min; temperatura gazu: 325°C ; przepływ gazu osłonowego: 11 l/min; temperatura gazu osłonowego: 325°C ; ciśnienie nebulizera: 40 psi; napięcie przyspieszenia w komorze kolizyjnej: 7 V. Napięcie fragmentora dla poszczególnych związków oraz energie kolizji dla kolejnych par MRM wynosiły odpowiednio 128; 16, 48, 24 V (JWH-200) i 68; 4, 12, 20 V (5F-AB-PINACA). Obsługę aparatu oraz analizę wyników przeprowadzono, stosując oprogramowanie MassHunter firmy Agilent Technologies (wersja B.04.01).

3. Wyniki

Przeprowadzone badania selektywności nie wykazały obecności endogennych składników mogących zakłócać sygnały pochodzące od analitów. Precyzja dla obu matrycy nie przekraczała założonego limitu wynoszącego 15% RSD (dla JWH-200: 4,4% – krew i 7,9% – mocz; dla 5F-AB-PINACA: 8,0% – krew i 11,9% – mocz).

Uzyskane kolejne punkty pomiarowe porównano z wartościami początkowymi (uznanymi za 100%) i określono procentową zawartość każdego syntetycznego kannabinoidu w kolejnych dniach pomiarowych. Uzyskane punkty pomiarowe zostały wprowadzone do arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel. Pozwoliło to na dostosowanie funkcji (liniowych lub wykładniczych). Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w postaci krzywych stabilności, tj. wykresów zależności między stężeniem poszczególnych syntetycznych kannabinoidów (wyrażonych jako procent początkowego stężenia) a czasem przechowywania różnych materiałów w różnych temperaturach (rys. 2). Wyznaczone równania funkcji pozwoliły na oszacowanie czasu półtrwania i całkowitego czasu zanikania badanych związków. Do obliczeń wybierano funkcje o najwyższych współczynnikach determinacji R^2 . Okresy półtrwania szacowano na podstawie dopasowanych funkcji liniowych lub wykładniczych, natomiast czasy całkowitego zaniku – tylko przy wykorzystaniu funkcji liniowych. Oszacowany czas półtrwania SC mieścił się w zakresie od około 2–3 miesięcy do ponad dwóch lat (tabela 1).

4. Dyskusja

Jak dotychczas badania mające na celu określanie długoterminowej stabilności syntetycznych kannabinoidów nie były często prowadzone. Tego typu badania nie zawsze są wymagane w procesie walidacji metod stosowanych w badaniach toksykologicznych (Scientific Working Group for Forensic Toxicology, 2013). Oczywiście przyczyną takiej sytuacji jest ich długotrwałość. Badania stabilności syntetycznych kannabinoidów w różnych materiałach biologicznych były najczęściej prowadzone przez okres od kilku dni do kilku tygodni. Dresen, Kneisel, Weinmann, Zimmermann i Auwärter (2011) określili stabilność JWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-250, WIN 55,212-2 i metanandamidu w surowicy przechowywanej w temperaturze -20°C przez okres jednego tygodnia. Badania stabilności 15 syntetycznych kannabinoidów we krwi prowadzili również Karinen i współpracownicy (2013). Z kolei Kacinko i współpracownicy (2011) badali stabilność JWH-018, JWH-073, JWH-019 i JWH-250 we krwi przechowywanej w różnych warunkach przez okres 30 dni. Ammann, McLaren, Gerostamoulos i Beyer (2012) prowadzili badania 25 syntetycznych kannabinoidów we krwi przechowywanej przez sześć tygodni w temperaturze -20°C . Stabilność 20 syntetycznych kannabinoidów w moczu przechowywanym przez 72 godz. w różnych warunkach została zbadała przez Scheidweilera i Huestis (2014). Badania ich stabilności w ślinie prowadzili Kneisel i współpracownicy (Kneisel i in., 2013; Kneisel, Speck, Moosmann, Auwärter, 2013).

Prace skupiające się na określaniu stabilności tych substancji w materiałach biologicznych przechowywanych przez dłuższy czas są nieliczne. Stabilność AB-FUBINACA, AB-PINACA, XLR-11 i UR-144 we krwi przechowywanej w temperaturach -20°C , 4°C i 22°C przez okres 12 tygodni została wyznaczona przez Fort, Jourdana, Kemp i Curtisa (2017). Najszerze i najdłuższe badania prowadzili Hess, Krueger, Unger i Madea (2017), którzy badali stabilność ponad 80 syntetycznych kannabinoidów w surowicy przechowywanej w temperaturach -20°C i 4°C przez 150 dni.

Celem niniejszych badań była ocena wpływu temperatury, czasu przechowywania i rodzaju matrycy biologicznej na stabilność dwóch substancji: JWH-200 i 5F-AB-PINACA, należących do różnych grup – odpowiednio aminoalkilindoli oraz indazoli. Stabilność badanych związków była silnie zależna od matrycy. Oba związki ulegały wolniejszemu zanikaniu w moczu. Proces ich degradacji we krwi następował szybciej. Po półrocznym przechowywaniu zawartość obu związków we krwi przechowywanej w różnych warunkach wynosiła od 30 do 53% wartości początkowej, podczas gdy w moczu wartości te mieściły się w zakresie od 52 do 77%. W przypadku 5F-AB-PINACA niezależnie od ma-

trycy tempo tego procesu było uzależnione od temperatury przechowywania, przy czym im niższa temperatura, tym większa stabilność tego związku. Nie zaobserwowano istotnych różnic w szybkości degradacji JWH-200 w różnych temperaturach przechowywania (nieznacznie dłuższe czasy uzyskane dla wyższych temperatur mogą wynikać z prostego sposobu szacowania tychże wartości). Na podstawie dopasowanych funkcji możliwe było również oszacowanie szybkości degradacji analitów. Utrata JWH-200 we krwi wynosiła około 8–12% na miesiąc (w zależności od temperatury przechowywania), natomiast w moczu około 4–5% na miesiąc. Wartości te dla 5F-AB-PINACA wynosiły odpowiednio we krwi 8–13% na miesiąc oraz w moczu 2–5% na miesiąc.

Jak dotychczas nie prowadzono tak długiego eksperymentu dla JWH-200 i 5F-AB-PINACA obecnych we krwi i moczu. Scheidweiler i Huestis (2014) wykazali, że JWH-200 był stabilny w moczu przez 72 godz. w temperaturze 4°C (90,0–94,8% zawartości początkowej) oraz przez 16 godzin w temperaturze pokojowej (90,0–93,1% zawartości początkowej). Wyniki te są zbliżone do uzyskanych podczas eksperymentu autorów niniejszego artykułu. Na podstawie funkcji dopasowanych do punktów pomiarowych uzyskanych podczas opisywanego tutaj eksperymentu obliczono, że zawartość JWH-200 w moczu zarówno w temperaturze pokojowej po 16 godzinach, jak po 3 dniach w temperaturze 5°C powinna wynosić odpowiednio 88,5% i 97,6%. Stabilność JWH-200 badano również w surowicy (Dresen i in., 2011). Wykazano, że po trzech dniach przechowywania surowicy w temperaturze pokojowej zawartość tego związku obniżała się do 84,7–87,9% (w zależności od rodzaju fiołki). Po tygodniu w przechowywanej w temperaturze -20°C surowicy zawartość JWH-200 wynosiła 102,6–103,7% (w zależności od stężenia). Podobne wyniki uzyskali Karinen i współpracownicy (2013) dla JWH-200 we krwi przechowywanej przez okres tygodnia. W zależności od temperatury przechowywania (pokojowa, 4°C i -20°C) zaobserwowano zmiany stężeń w zakresie od $-1,8\%$ do $+7,6\%$. JWH-200 charakteryzował się również stabilnością w ślinie przechowywanej przez 3 dni w temperaturach 4°C i 25°C oraz przez 14 dni w temperaturze -20°C (Kneisel i in., 2013a, 2013b).

Hess i współpracownicy (2017) badali stabilność 84 syntetycznych kannabinoidów w surowicy przechowywanej w temperaturze pokojowej, 4°C i -20°C . Autorzy wykazali, że 51 z 84 związków było stabilnych po 315 dniach przechowywania materiału w temperaturze -20°C (jako niestabilność uznawano utratę ponad 20% wartości początkowej). Zaobserwowano, że w tej temperaturze 82 związki były stabilne przez co najmniej miesiąc. Ich stabilność w temperaturach 4°C i 20°C była znacznie gorsza. Wśród analizowanych związków był 5F-AB-PINACA, jednak brak dokładnych wartości oraz inny poddany

badaniu materiał biologiczny uniemożliwiają porównanie wyników.

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu mogą pomóc w opracowaniu właściwych procedur transportu i przechowywania materiału biologicznego. Próbki dostarczone do laboratorium nie zawsze są poddawane natychmiastowym badaniom, co może być spowodowane np. weryfikacją wyników lub ograniczeniami metodyki. Długotrwałe przechowywanie próbek, a w szczególności krwi, zawierających syntetyczne kannabinoidy może skutkować powolnym zanikaniem analitów. Niższe temperatury przechowywania mogą spowalniać lub hamować utratę analitu, jednakże wykazanie zaniżonego stężenia, a nawet niewykazanie analitu, może skutkować błędną interpretacją wyników analizy toksykologicznej. Przeprowadzone badania wskazują jednoznacznie, że analizy toksykologiczne materiału biologicznego, w którym podejrzewa się obecność tych substancji, powinny być prowadzone w jak najkrótszym czasie. Eksperyment miał symulować przechowywanie próbek krwi pobranych od osób żywych. W przypadku pobrania materiału od osób zmarłych badane procesy mogą zachodzić w inny sposób.

5. Wnioski

Podczas eksperymentu badano długoterminową stabilność dwóch syntetycznych kannabinoidów: JWH-200 i 5F-AB-PINACA. Czynniki mającymi wpływ na ich trwałość w czasie były – w większym stopniu rodzaj matrycy, a w mniejszym – temperatura przechowywania. Wyniki badań wskazują, że długoterminowe przechowywanie krwi z zawartością tych związków może prowadzić do stopniowego zmniejszania się zawartości analitów, a więc wyznaczenia niższego stężenia niż to, które było obecne w czasie pobierania próbek. Świadczy to o tym, że niezależnie od temperatury przechowywania analizy w kierunku syntetycznych kannabinoidów powinny być prowadzone w jak najkrótszym czasie po pobraniu materiału.