

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ 4F-MDMB-BINACA В КРОВИ И МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В СОЧЕТАНИИ С ТАНДЕМНОЙ КВАДРУПОЛЬ-ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

М.А. Гофенберг

зав. химико-токсикологической лабораторией, Областная наркологическая больница; провизор-аналитик, химико-токсикологическая лаборатория, Свердловская областная клиническая психиатрическая больница; ст. преподаватель, кафедра фармации и химии, Уральский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Екатеринбург, Россия)
E-mail: Hoffenberg@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2877-1301>

В.А. Шевырин

к.х.н., ст. науч. сотрудник, научная лаборатория перспективных исследований в области нефтехимии, химической технологии и биотехнологии; вед. инженер, аналитическая испытательная лаборатория, Инновационный центр химико-фармацевтических технологий, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург, Россия)
E-mail: vadim.shevyrin@gmail.com; Orcid ID: 0000-0002-0369-0786

О.Н. Дворская

д.фарм.н., доцент, зав. кафедрой фармации и химии, фармацевтический факультет, Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Челябинск, Россия)
E-mail: dvoksnik@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4774-8887>

С.С. Катаев

к.х.н., зав. судебно-химическим отделением, Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы (г. Пермь, Россия)
E-mail: forenschemist@narod.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6742-2054>

А.М. Григорьев

д.х.н., химик-эксперт, Московское областное бюро судебно-медицинской экспертизы (Москва, Россия)
E-mail: chrzond4250@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6742-2054>

Актуальность. Синтетические агонисты каннабиноидных рецепторов занимают одну из лидирующих позиций в структуре новых психоактивных веществ, выявляемых как в России, так и в мире. Их употребление часто становится причиной острых отравлений, в том числе с летальным исходом. В организме синтетические каннабимиметики подвергаются интенсивному метаболизму и в неизменном виде с мочой практически не выводятся, что обуславливает сложности обнаружения агонистов каннабиноидных рецепторов в биологическом материале и корректной постановки клинического диагноза. Для своевременного установления причины отравлений психоактивными веществами необходимо изучение направлений метаболизма новых синтетических каннабимиметиков.

Цель работы – обнаружение метаболитов 4F-MDMB-BINACA фаз I и II на основе анализа образцов мочи человека с использованием метода жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией.

Материал и методы. Для поиска метаболитов и их глюкуронидов 4F-MDMB-BINACA использованы двадцать пять образцов мочи, два образца гепаринизированной крови от живых лиц и два посмертных образца мочи. Жидкостной хроматограф 1290 Infinity II LC, оснащенный колонкой Zorbax Eclipse Plus C18 с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром 6545 (Agilent Technologies, США).

Результаты. В моче человека обнаружены сорок девять метаболитов 4F-MDMB-BINACA, которые, предположительно, идентифицированы как продукты гидролиза, гидроксирования различных фрагментов, дефторирования с гидроксированием или карбоксилированием, образования дигидродиола, карбоксилирования остатка неопентана, N-деалкилирования и комбинации этих реакций. Также выявлены продукты дегидрирования трет-лейцинового остатка, свойства которых предполагают внутримолекулярную циклизацию с образованием лактона. Основными метаболическими путями являлись гидролиз и дефторирование, сопровождающиеся карбоксилированием. Большинство метаболитов присутствовало в моче, как в свободной, так и в глюкуронированной формах. Приведены рекомендации по обнаружению метаболитов и маркеров нового каннабимиметика с гидролизом мочи при пробоподготовке и без этого этапа.

Выводы. Результаты исследования могут быть использованы для диагностики острых отравлений каннабимиметиком 4F-MDMB-BINACA, а также для прогнозирования направлений метаболизма новых синтетических каннабимиметиков, имеющих похожие структурные элементы.

Ключевые слова: синтетические каннабимиметики, 4F-MDMB-BINACA, метаболиты, глюкурониды, жидкостная хроматография с времяпролетной масс-спектрометрией.

Для цитирования: Гофенберг М.А., Шевырин В.А., Дворская О.Н., Катаев С.С., Григорьев А.М. Исследование метаболического профиля 4F-MDMB-BINACA в крови и моче человека с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(10):26–37. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-10-04>

Согласно комплексной статистике Европейского центра мониторинга наркотиков и наркозависимости (EMCDDA), синтетические каннабиноиды (СК) являются наиболее изменчивым семейством новых психоактивных веществ, на долю которых приходится максимальное количество новых соединений и изъятий, зарегистрированных через Систему раннего предупреждения ЕС (отчет ЕС о наркотиках за 2021 г.) [1]. Несмотря на небольшое снижение темпов появления новых СК на европейском рынке за последние 5 лет, количество новых субстанций остается высоким [2]. Разнообразие СК объясняется рядом факторов: введением законодательных мер контроля, ограничивающих оборот СК; сравнительной простотой синтеза; широким спектром структурно различных соединений, проявляющих высокую активность в отношении каннабиноидных рецепторов млекопитающих [3, 4].

Каннабиноидная психоактивность СК определяет рекреационный характер их употребления, сопровождающийся рядом острых токсических и побочных эффектов (изменение восприятия и поведения, беспокойство, паранойя, зависимость) и в некоторых случаях может привести к смерти [5, 6]. Хроническое употребление СК вызывает уменьшение объема серого вещества в головном мозге, сопровождающееся функциональными расстройствами [7].

Появление на нелегальном рынке наркотических средств нового СК – метил 2-(1-(4-фторбутил)-1H-индазол-3-карбоксамидо)-3,3-диметилбутаноата (позже названного 4F-MDMB-BINACA) в ноябре 2018 г. впервые было обнаружено по наличию его метаболитов в моче в Институте судебной медицины (Фрайбург, Германия) [8]. Впоследствии правоохранительные органы ряда европейских стран и Центр исследований и образования в области судебной медицины (США) сообщили об идентификации 4F-MDMB-BINACA в изъятых из незаконного оборота образцах [8, 9]. В начале 2019 г. появление этого вещества отмечено в России, а его метаболиты обнаружены в образцах мочи человека методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [10].

Ц е л ь р а б о т ы – обнаружение метаболитов 4F-MDMB-BINACA фаз I и II на основе анализа значительного количества образцов мочи человека. Для структурной идентификации использо-

вали метод жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией (ЖХ–К/ВПР).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовались: ацетонитрил (чистота для ВЭЖХ) от Fisher Scientific UK (Лафборо, Великобритания); метанол (чистота для ВЭЖХ) от Scharlab, S.L. (Испания); муравьиная кислота (аналитическая чистота), формиат аммония (чистота для ВЭЖХ) и β-глюкуронидаза (тип HP-2) от Sigma-Aldrich (Германия); вода (18,2 МОм) из системы очистки воды Milli-Q Advantage A10 (Merck, Германия). Все остальные растворители и химические вещества (ч.д.а.) получили от компании Химмед (Москва, Россия).

Образцы мочи и крови. Для поиска метаболитов 4F-MDMB-BINACA отобрали двадцать пять образцов мочи и два образца гепаринизированной крови, собранные в разных регионах России у пациентов, поступивших в больницу с подозрением на отравление наркотическими средствами. Во время рутинного скрининга с помощью ГХ-МС метаболит M1.1 обнаружили во всех образцах после деконъюгации. Неизмененный 4F-MDMB-BINACA выявили в двух образцах в виде следов. Перед анализом образцы хранили при –20 °С.

Кроме того, собрали два посмертных образца мочи для случаев, когда 4F-MDMB-BINACA обнаружили в цельной крови при проведении судебно-медицинского анализа. Однако только один из них содержал метаболиты 4F-MDMB-BINACA и поэтому включен в исследование.

Пробоподготовка. Цельная и гепаринизированная кровь. К крови (100 мкл) добавляли охлажденный ацетонитрил (500 мкл). Смесь встряхивали и затем охлаждали при –10 °С в течение 10 мин. Отобранный супернатант (100 мкл) упаривали, сухой остаток растворяли в смеси ацетонитрила и воды (100 мкл, 1:1 об.).

Моча, метод 1. Образцы мочи (900 мкл) с добавлением ацетонитрила (100 мкл) центрифугировали (3000 об/мин, 5 мин). Супернатанты вводили в систему ЖХ–К/ВПР без дополнительной подготовки. Этот метод использовали для измерения относительных площадей пиков метаболитов и определения глюкуронидов.

Моча, метод 2 (деконъюгация). β-Глюкуронидазу (50 мкл) и ацетатный буфер (1 мл, 0,1 М, рН

4,8) добавляли к 1 мл мочи, смесь инкубировали при 55 °С в течение 2 ч. После охлаждения pH смеси доводили до 2,0–2,5 с помощью соляной кислоты, затем экстрагировали этилацетатом (2 мл). Экстракт упаривали, сухой остаток растворяли в смеси ацетонитрила и воды (100 мкл, 1:1 об.). Деконъюгированные образцы использовали для обнаружения свободных форм минорных метаболитов.

Оборудование. Жидкостной хроматограф 1290 Infinity II LC, оснащенный колонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (длина 50 мм, внутренний диаметр 2,1 мм, размер частиц 1,8 мкм), был соединен с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром 6545 (Agilent Technologies, США). Разделение проводили при изменении состава элюента, состоявшего из фазы А (5 мМ формиата аммония, 0,1% муравьиной кислоты и 1% ацетонитрила в воде) и фазы В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле) согласно программе: 1% фазы В (2 мин); линейный градиент до 100% фазы В (18 мин) с выдерживанием состава в течение 2 мин. Температура колонки составляла 40 °С, скорость потока подвижной фазы 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл. Масс-спектрометрический детектор настраивали для работы в режиме ионизации электрораспылением при следующих условиях: температура газа-осушителя 350 °С (N₂, 10 л/мин); температура газа-завесы 125 °С (N₂, 3 л/мин), давление в распылителе 40 psi (N₂);

напряжение на капилляре 3500 В; напряжение фрагментатора 100 В; давление газа для диссоциации, вызванной соударением 23 psi (N₂); энергия 20 эВ; частота детектирования 2 ГГц; постоянная подстройка величин, m/z. Метаболиты считали обнаруженными, если высота их пиков более 5×10³ условных единиц.

Для оценки содержания метаболитов и степени их глюкуронирования использовали площади хроматографических пиков протонированных молекул (диапазон m/z менее ±5 мДа). Содержание метаболитов оценивали относительно суммы площадей свободных и глюкуронированных форм метаболита М1.1. Степень глюкуронирования выражали как отношение площади пика глюкуронида к сумме площадей глюкуронида и свободной формы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурно 4F-MDMB-BINACA является гомологом 5F-MDMB-PINACA с меньшим количеством СН₂-групп в боковой N-алкилиндазольной цепи (рис. 1). Такие структурные модификации СК относительно редки, поскольку они приводят к снижению активности (EC₅₀) или аффинности (K_i) вещества к рецептору CB1, которые определяют психотропное действие СК [11, 12]. Интересен факт, что активность обоих веществ выше, чем у известного СК JWH-018 (EC₅₀ 20,4 нМ) [11].

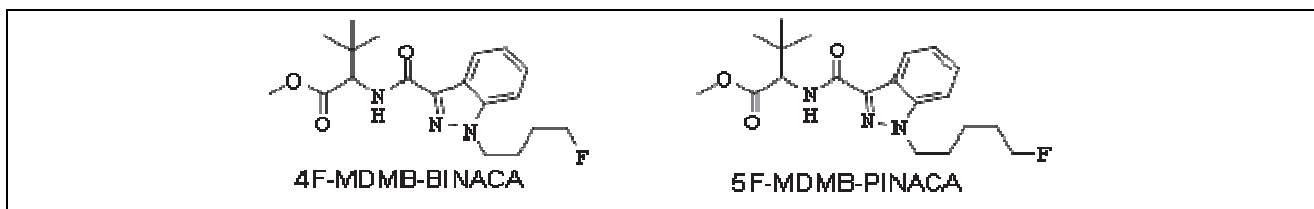


Рис. 1. Структуры 4F-MDMB-BINACA и 5F-MDMB-PINACA

подавляющее большинство известных СК подвергаются интенсивному метаболизму [13]. Первое исследование метаболического профиля 4F-MDMB-BINACA у людей описано Krotulski A.J. с соавторами [14]. Девять метаболитов, которые являются продуктами гидролиза сложного эфира, дефторирования и дальнейшего гидроксирования, обнаружены с помощью ЖХ-К/ВПР в четырех образцах мочи и крови. Эти результаты подтверждены Naschimi V. с коллегами [8], которые проанализировали 17 образцов мочи человека и обнаружили еще шесть гидроксированных метаболитов. Обе исследовательские группы подвер-

гали образцы мочи деконъюгации, поэтому идентифицировали только метаболиты фазы I.

Недавние исследования метаболизма 4F-MDMB-BINACA были сосредоточены на сравнении метаболических профилей, наблюдаемых у людей, с профилями, полученными с использованием модельных методов. Wagmann L. и др. [15] для изучения метаболизма использовали объединенную фракцию S9 печени человека, клетки НераRG печени человека и личинки рыбок данио (*Danio rerio*). Основываясь на критерии наличия четырех метаболитов в образце мочи человека, установили, что наилучшей моделью является ин-

кубация с клетками НераRG. Кроме того, основной вклад в образование метаболитов фазы I принадлежит карбоксилэстеразе человека и цитохрому CYP3A5 в процессах гидролиза и окисления соответственно. Leong H.S. с соавторами [16] описали *in vitro* метаболизм 4F-MDMB-BINACA с клетками печени НерG2, грибом *Cunninghamella elegans* и объединенными микросомами печени человека (HLM). Основываясь на метаболическом профиле человека, описанном Krotulski A.J. с коллегами [14], авторы пришли к выводу о преимуществе HLM для моделирования метаболизма 4F-MDMB-BINACA.

Предполагаемые структурные формулы 49 обнаруженных метаболитов и возможные пути образования показаны на рис. 2. Метаболиты, описанные ранее другими исследовательскими группами, выделены жирным шрифтом. Характеристики обнаруженных соединений представлены в табл. 1.

Структурную идентификацию проводили на основе трех подходов:

- 1) интерпретация спектров при положительной ионизации;
- 2) ионизируемость при отрицательных условиях;
- 3) уменьшение удерживания при увеличении рН элюента.

Последние два подхода указывают на наличие карбоксильной группы в молекуле метаболита.

Анализ крови: помимо неизмененного 4F-MDMB-BINACA, все четыре образца крови содержали следовые количества гидролизованного метаболита M1.1. Другие метаболиты не обнаружены.

Анализ мочи: метаболиты групп M1, M2 (гидролиз и последующее гидроксилирование).

Примерная хроматограмма пробы мочи, полученной без деконъюгации (метод 1) со значительным содержанием метаболитов, представлена на рис. 3.

В целом в метаболической смеси преобладали продукты гидролиза метилового эфира (табл. 1, рис. 4). Это согласуется с результатами предыдущих исследований [8, 9]. Основной обнаруженный метаболит – M1.2, который представляет собой

глюкуронид M1.1 (степень глюкуронирования 0,8, табл. 2).

Установлено, что неопентановый остаток является наиболее вероятной целью для гидроксилирования (M2.1). Глюкуронид метаболита M2.1 не обнаружен. Относительное содержание изомерных метаболитов (M2.2, M2.3 и M2.4, M2.5, гидроксилированных по N-фторбутильной цепи и индазольному бициклу соответственно) невелико. Все эти метаболиты глюкуронированы в средней и высокой степени. Метаболиты групп M3 (гидролиз с последующим образованием дигидродиола) и M4 (дополнительное гидроксилирование неопентанового остатка) почти не подвержены конъюгации, что можно объяснить их значительной гидрофильностью, способствующей выведению свободных форм с мочой. Метаболиты, идентифицированные как дигидродиолы по индазольному бициклу, ранее обнаружили в моче потребителей MDMB-FUBINACA и ADB-FUBINACA, и в последнем случае их хроматографические пики были очень интенсивными [17].

В молекулах метаболитов групп M5 (гидролиз и дефторирование в сочетании с гидроксилированием) и M6 (дополнительное гидроксилирование неопентанового остатка) атом фтора заменен гидроксильной группой. Относительное содержание этих веществ невелико, а степень конъюгации с глюкуроновой кислотой высока. Относительное содержание дефторированного карбоксилированного метаболита M7.1, являющегося продуктом дальнейшего окисления M6.1, наоборот, весьма велико, а степень глюкуронирования мала. Согласно нашему опыту, образование значительных количеств подобных соединений характерно для многих СК, имеющих атом фтора на конце боковых алкильных цепей. Метаболиты групп M9 (гидролиз с последующим N-деалкилированием индазольного бицикла) и M10 (дополнительное гидроксилирование) малоспецифичны, поскольку являются общими для разных СК. Относительное содержание метаболита M9.1 выше, чем содержание его производных, гидроксилированных по неопентановому остатку (M10.1) и по индазольному бициклу (M10.2, M10.3). Незначительное глюкуронирование (около 0,1) обнаружено только для метаболита M9.1.

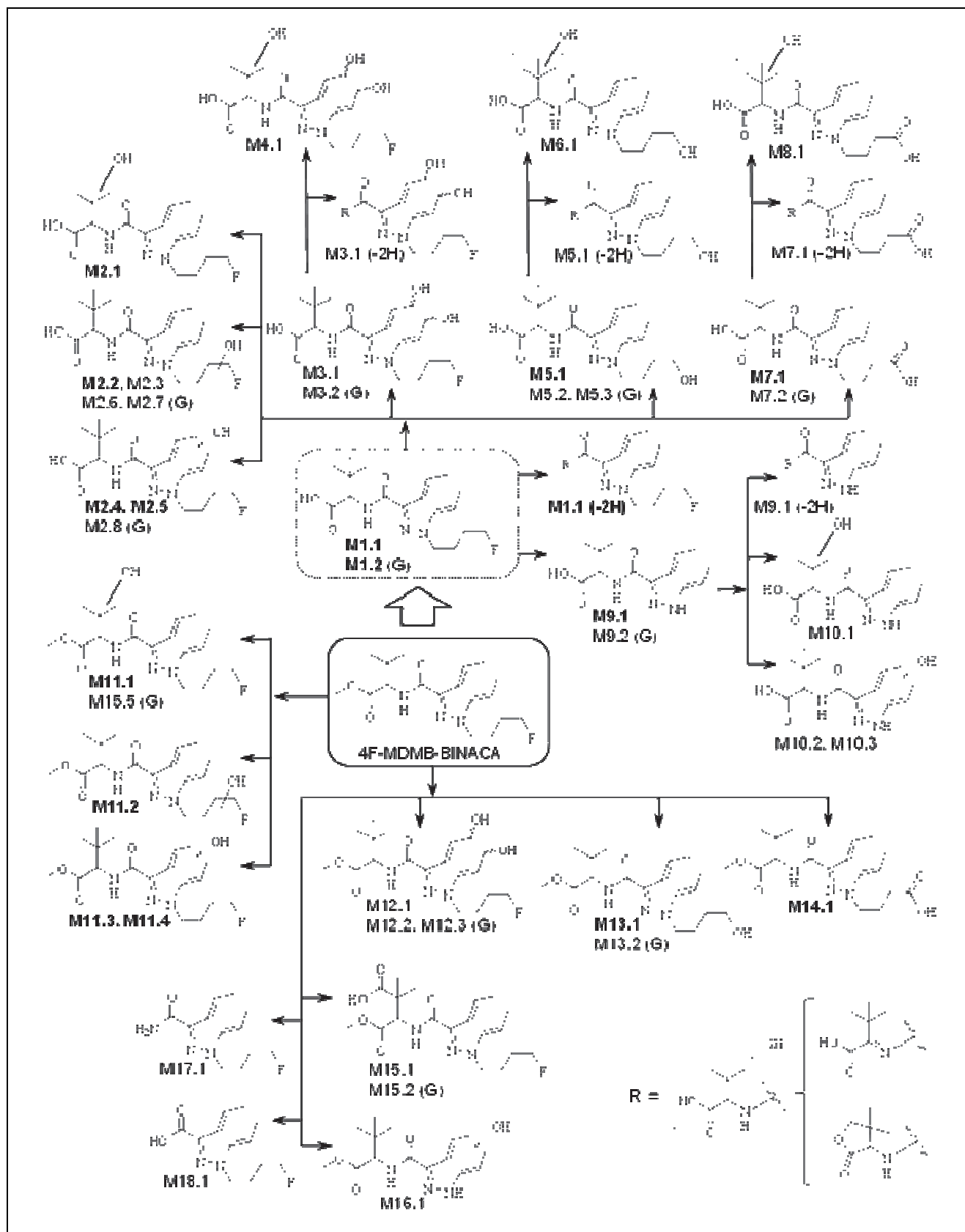


Рис. 2. Предполагаемые пути метаболизма и структуры метаболитов 4F-MDMB-BINA-CA (G: глюкурониды); метаболиты, которые ранее описаны [8, 14–16], выделены жирным шрифтом

Таблица 1. Характеристики предполагаемых метаболитов 4F-MDMB-VINACA, идентифицированных в моче человека

Соединение	Метаболические и артефактные реакции	Брутто-формула	Теоретическая масса, Да	Ошибка, ppm	t_r , мин	Характерные ионы-продукты, Да	Ранг* (медиана)
1	2	3	4	5	6	7	8
4F-MDMB-VINACA	-	$C_{19}H_{26}FN_3O_3$	364,2031	-	-	304,182; 219,093; 145,040	n/o
M1.1	Гидролиз	$C_{18}H_{24}FN_3O_3$	350,1875	1,3	14,0	304,182; 219,093; 145,040	2
M1.1 (-2H)	Гидролиз + дегидрирование	$C_{18}H_{22}FN_3O_3$	348,1718	0,6	12,8	290,166; 219,093; 145,040	> 15
M1.2	Гидролиз + глюкуронирование	$C_{24}H_{32}FN_3O_9$	526,2195	1,7	12,7	350,188; 304,182; 219,093	1
M2.1	Гидролиз + гидроксиглирование (неопентан)	$C_{18}H_{22}FN_3O_3$	366,1824	1,7	11,9	290,166; 219,093; 145,040	5
M2.2	Гидролиз + гидроксиглирование (фторбутил)	$C_{18}H_{22}FN_3O_3$	366,1824	0,4	12,3	320,177; 235,088; 145,040	> 10
M2.3	Гидролиз + гидроксиглирование (фторбутил)	$C_{18}H_{22}FN_3O_3$	366,1824	1,7	12,5	320,177; 235,088; 145,040	> 10
M2.4	Гидролиз + гидроксиглирование (индазол)	$C_{18}H_{22}FN_3O_3$	366,1824	2,3	12,9	320,177; 235,088; 161,035	> 10
M2.5	Гидролиз + гидроксиглирование (индазол)	$C_{18}H_{22}FN_3O_3$	366,1824	-0,2	13,6	320,177; 235,088; 161,035	> 10
M2.6	Гидролиз + гидроксиглирование (фторбутил) + глюкуронирование	$C_{24}H_{32}FN_3O_{10}$	542,2145	0,8	11,0	366,182; 320,177; 235,088	> 10
M2.7	Гидролиз + гидроксиглирование (фторбутил) + глюкуронирование	$C_{24}H_{32}FN_3O_{10}$	542,2145	-0,8	11,2	366,182; 320,177; 235,088	> 10
M2.8	Гидролиз + гидроксиглирование (индазол) + глюкуронирование	$C_{24}H_{32}FN_3O_{10}$	542,2145	-1,9	11,5	366,182; 320,177; 235,088	> 10
M3.1	Гидролиз + образование дигидродиола	$C_{18}H_{26}FN_3O_5$	384,1929	-0,1	10,4	338,187; 253,098; 161,035	9
M3.1 (-2H)	Гидролиз + образование дигидродиола + дегидрирование	$C_{18}H_{24}FN_3O_5$	382,1773	0,8	8,51	324,172; 253,098; 161,035	> 10
M3.2	Гидролиз + образование дигидродиола + глюкуронирование	$C_{24}H_{34}FN_3O_{11}$	560,2250	1,4	8,88	384,193; 338,187; 253,098	> 10
M4.1	Гидролиз + образование дигидродиола + гидроксиглирование	$C_{18}H_{26}FN_3O_6$	400,1878	-0,1	7,36	324,172; 253,098; 235,088	> 10
M5.1	Гидролиз + дефторирование + гидроксиглирование	$C_{18}H_{25}N_3O_4$	348,1918	2,1	12,6	302,186; 217,097; 145,040	> 10
M5.1 (-2H)	Гидролиз + дефторирование + гидроксиглирование + дегидрирование	$C_{18}H_{23}N_3O_4$	346,1761	0,2	11,3	328,166; 217,097; 145,040	> 10
M5.2	Гидролиз + дефторирование + гидроксиглирование + глюкуронирование	$C_{24}H_{33}N_3O_{10}$	524,2239	1,6	11,3	348,192; 302,186; 217,097	> 10
M5.3	Гидролиз + дефторирование + гидроксиглирование + глюкуронирование	$C_{24}H_{33}N_3O_{10}$	524,2239	1,8	11,5	348,192; 302,186; 217,097	> 10
M6.1	Гидролиз + дефторирование + дигидроксиглирование	$C_{18}H_{25}N_3O_5$	364,1867	0,3	10,3	288,171; 217,097; 145,040	> 10
M7.1	Гидролиз + дефторирование + карбоксиглирование	$C_{18}H_{23}N_3O_5$	362,1711	1,0	12,5	316,166; 231,076; 145,040	3

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
M7.1 (-2H)	Гидролиз + дефторирование + карбоксилирование + дегидрирование	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅	360,1554	-0,8	11,1	342,145; 231,076; 87,044	8
M7.2	Гидролиз + дефторирование + карбоксилирование + глюкуронирование	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₁₁	538,2031	0,7	11,2	362,171; 316,166; 231,076	4
M8.1	Гидролиз + дефторирование + карбоксилирование + гидроксиллирование	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₆	378,1660	1,2	10,2	302,150; 231,076; 145,040	10
M9.1	Гидролиз + N-дезалкилирование (индазол)	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	276,1343	1,2	11,7	230,129; 145,040; 86,096	7
M9.1(-2H)	Гидролиз + N-дезалкилирование (индазол) + дегидрирование	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₃	274,1186	1,8	10,2	216,113; 145,040; 72,081	> 10
M9.2	Гидролиз + N-дезалкилирование (индазол) + глюкуронирование	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₉	452,1664	2,1	10,4	276,134; 230,129; 145,040	> 10
M10.1	Гидролиз + N-дезалкилирование (неопентан) + гидроксиллирование	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₄	292,1292	-2,0	9,00	216,113; 145,040; 72,081	> 10
M10.2	Гидролиз + N-дезалкилирование (индазол) + гидроксиллирование	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₄	292,1292	1,1	10,4	216,113; 145,040; 72,081	> 10
M10.3	Гидролиз + N-дезалкилирование (индазол) + гидроксиллирование	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₄	292,1292	0,1	10,8	246,124; 161,035; 86,096	> 10
M11.1	Гидроксиллирование (неопентан)	C ₁₉ H ₂₆ FN ₃ O ₄	380,1980	0,5	13,1	290,166; 219,093; 145,040	> 10
M11.2	Гидроксиллирование (фторбутил)	C ₁₉ H ₂₆ FN ₃ O ₄	380,1980	0,2	13,6	320,177; 235,088; 145,040	> 10
M11.3	Гидроксиллирование (индазол)	C ₁₉ H ₂₆ FN ₃ O ₄	380,1980	1,6	14,3	320,177; 235,088; 161,035	> 10
M11.4	Гидроксиллирование (индазол)	C ₁₉ H ₂₆ FN ₃ O ₄	380,1980	0,2	14,8	320,177; 235,088; 161,035	> 10
M11.5	Гидроксиллирование (неопентан) + глюкуронирование	C ₂₅ H ₃₄ FN ₃ O ₁₀	556,2301	1,3	11,6	380,198; 348,172; 219,093	6
M12.1	Образование дигидродиола	C ₁₉ H ₂₈ FN ₃ O ₅	398,2086	-1,0	12,2	338,187; 253,098; 161,035	> 10
M12.2	Образование дигидродиола + глюкуронирование	C ₂₅ H ₃₆ FN ₃ O ₁₁	574,2407	0,8	10,6	514,220; 380,198; 235,088	> 10
M12.3	Образование дигидродиола + глюкуронирование	C ₂₅ H ₃₆ FN ₃ O ₁₁	574,2407	0,1	10,7	514,220; 380,198; 235,088	> 10
M13.1	Дефторирование + гидроксиллирование	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₄	362,2074	1,3	13,7	302,186; 217,097; 145,040	> 10
M13.2	Дефторирование + гидроксиллирование + глюкуронирование	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₁₀	538,2395	1,4	12,4	362,207; 302,186; 217,097	> 10
M14.1	Дефторирование + карбоксилирование	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₅	376,1867	1,6	13,6	316,166; 231,076; 87,044	> 10
M15.1	Карбоксилирование	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₅	394,1773	1,1	13,1	348,172; 219,093; 145,040	> 10
M15.2	Карбоксилирование + глюкуронирование	C ₂₅ H ₃₂ FN ₃ O ₁₁	570,2094	0,2	11,3	394,177; 348,172; 219,093	> 10
M16.1	N-Дезалкилирование (индазол) + гидроксиллирование	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₄	306,1448	0,6	12,3	246,124; 161,035; 86,096	> 10
M17.1	N-Дезалкилирование (карбоксамидная цепь)	C ₁₂ H ₁₄ FN ₃ O	236,1194	1,8	10,5	219,093; 145,040; 55,054	> 10
M18.1	Гидролиз (карбоксамидная цепь)	C ₁₂ H ₁₃ FN ₃ O ₂	237,1034	1,8	10,8	219,093; 145,040; 55,054	> 10

Примечание: * – ранг определяли на основании площади пика протонированных молекул (медиана); t_r – время удерживания; n/o – не обнаружено.

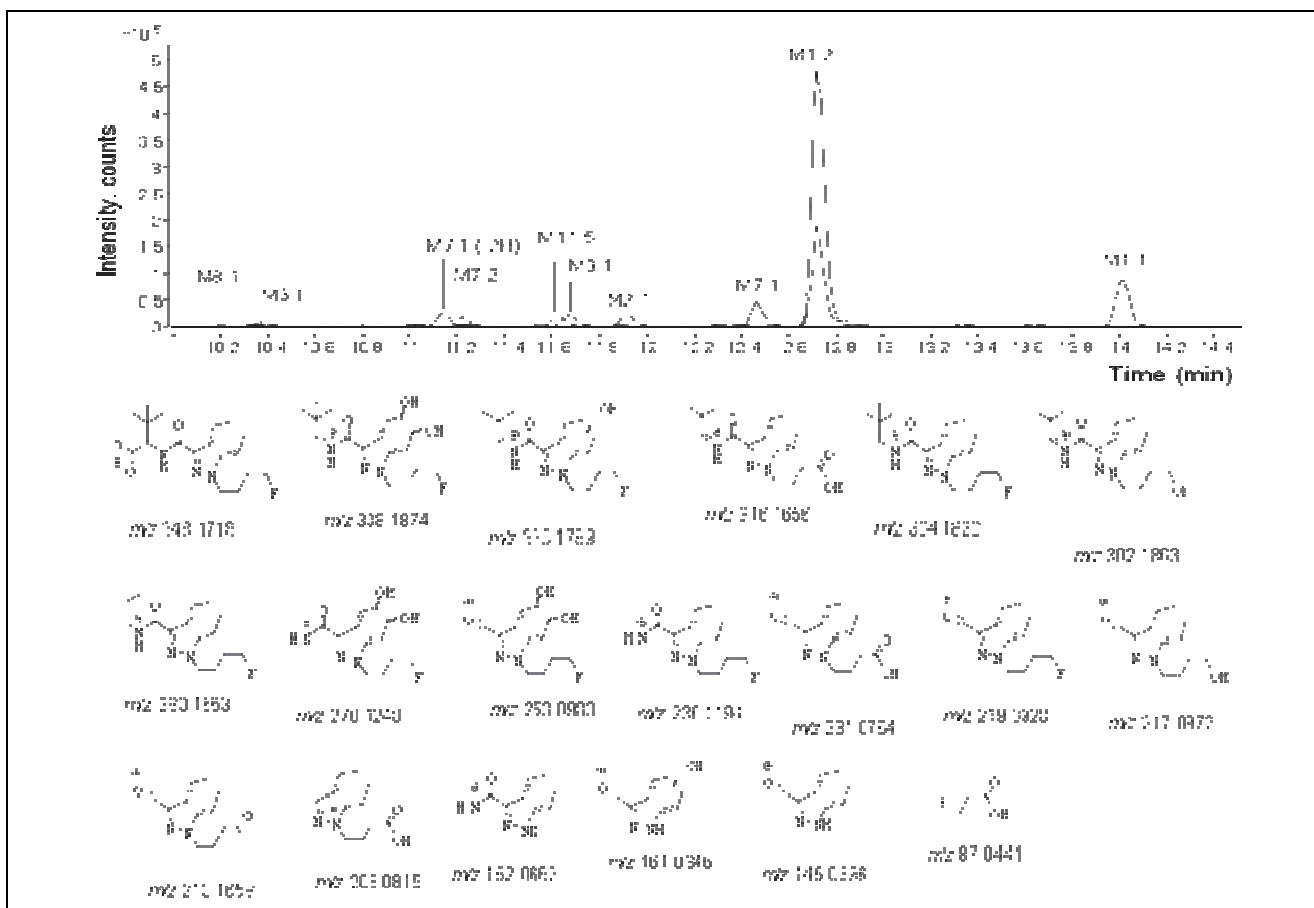


Рис. 3. Хроматограмма образца мочи, полученного без деконъюгации (метод 1). Предлагаемые структуры ионов-продуктов

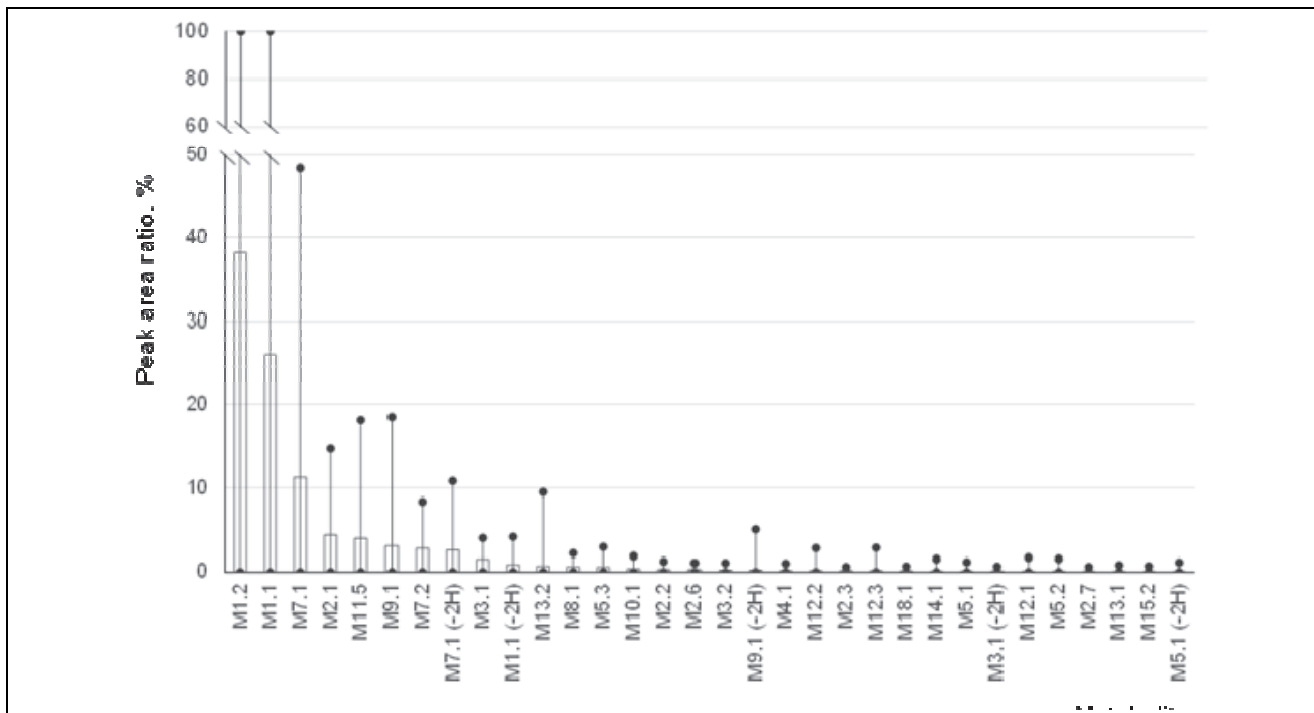


Рис. 4. Ранжирование предполагаемых метаболитов 4F-MDMB-BINACA в образцах мочи человека. Столбцы соответствуют среднему значению отношений площадей хроматографических пиков к сумме площадей метаболитов M1.1 и M1.2 (продуктов гидролиза эфира и его глюкуроида). Планки погрешностей выражают наибольшие и наименьшие значения относительных площадей пиков

Таблица 2. Оценка степени глюкуронирования метаболитов 4F-MDMB-BINACA*

Метаболические реакции (фаза I)	Метаболит фазы I	Метаболит фазы II	Степень конъюгации (медиана)
Гидролиз	M1.1	M1.2	0,8
Гидролиз + гидроксирование (фторбутил)	M2.2 + M2.3	M2.6 + M2.7	0,4
Гидролиз + гидроксирование (индазол)	M2.4 + M2.5	M2.8	0,8
Гидролиз + образование дигидродиола	M3.1	M3.2	0,2
Гидролиз + дефторирование + гидроксирование	M5.1	M5.2 + M5.3	1,0
Гидролиз + дефторирование + карбоксилирование	M7.1	M7.2	0,2
Гидролиз + N-дезалкилирование (индазол)	M9.1	M9.2	0,1
Гидроксирование (неопентан)	M11.1	M11.5	1,0
Образование дигидродиола	M12.1	M12.2+M12.3	0,7
Дефторирование + гидроксирование	M13.1	M13.2	1,0
Карбоксилирование	M15.1	M15.2	1,0

Примечание: * – степень глюкуронирования оценивалась как отношение площади пика глюкуронида к сумме площадей глюкуронида и свободной формы.

Брутто-формулы и спектры дегидрогенированных метаболитов (ДГМ, M1.1 (-2H), M3.1 (-2H), M5.1 (-2H), M7.1 (-2H), M9.1 (-2H)) соответствуют формальному элиминированию двух атомов водорода от трет-лейциновых остатков метаболитов соответствующих групп. Это возможно либо при образовании двойной связи между вторичным атомом углерода и атомом азота [18], либо при образовании лактона [19]. В свою очередь, образование этих структур может быть результатом дегидратации метаболитов, гидроксированных по трет-лейциновому остатку, когда гидроксильная группа расположена на вторичном атоме углерода или на метильной группе соответственно. Последний вариант возможен только для гидролизированных метаболитов. Дегидрогенированные метаболиты (ДГМ) наблюдались в метаболических профилях человека и в смесях *in vitro* для ряда СК, имеющих в своих структурах остатки трет-лейцина и валина (таких как MDMB-CHMICA, ADB-FUBINACA, MDMB-FUBINACA и 4F-MDMB-BINACA) [8, 14–19].

Окончательный ответ о действительной структуре ДГМ возможен только при их исследовании методом ЯМР. Однако можно перечислить общие характеристики этих соединений, которые отличали их от метаболитов с карбоксильными группами в структуре:

1) хроматографическое удерживание ДГМ не изменялось при увеличении pH элюента;

2) все ДГМ, кроме N-дезалкилированного метаболита M14.1, не ионизировались в отрицательном режиме;

3) фрагментация ДГМ, рассмотренная на примере M1.1 (-2H), проходила двумя независимыми путями: первый – отщепление воды с участием карбонильной группы в третьем положении индазольного бицикла (m/z 330) и последующее образование иона с m/z 113 ($C_6H_9O_2^+$) и предполагаемой лактонной структурой [15], второй – последовательное отщепление монооксида углерода и формальдегида (m/z 320 и 290, соответственно) от дегидрогенированного трет-лейцинового остатка и образование ионов, структура которых включала индазолиллоксометильный катион (m/z 219 и 145);

4) согласно известным нам публикациям, образование ДГМ наблюдали только для гидролизированных метаболитов, что соответствует и нашим наблюдениям;

5) относительное содержание ДГМ в образцах, приготовленных по методу 2 (включая экстракцию и выпаривание), значительно выше, чем в образцах, приготовленных по методу 1, а относительное содержание метаболитов, гидроксированных по трет-лейциновому фрагменту, подчиняется обратной зависимости.

В недавней статье Leong H.S. с соавт. [16] отметили, что присутствие в спектре M1.1 (-2H) иона с m/z 330 (что соответствует элиминированию воды от протонированной молекулы) более характерно для случая наличия двойной связи в трет-лейциновом остатке, нежели для лактона. Действительно, потеря воды больше соответствует дегидратации карбоксильной группы (также как для M1.1), в то время как фрагментация сложного эфира (4F-MDMB-BINACA) приводит к элимини-

рованию метанола и монооксида углерода. Вместе с тем наши наблюдения показывают, что спектр для 4F-MDMB-BINACA также содержит малоинтенсивный ион с m/z 346, соответствующий потере воды. Кроме того, в дегидратации ДГМ участвует карбонильная группа в 3-м положении индазола, а не депротонированный трет-лейциновый остаток. Эти особенности предполагают лактонную природу ДГМ и недвусмысленно подтверждают их артефактное происхождение. Последнее приводит к выводу о нецелесообразности использования ДГМ в качестве биомаркеров.

Относительное содержание всех метаболитов, представляющих собой метиловые эфиры, невелико. Однако, принимая во внимание возможность существования других сложных эфиров, гомологичных 4F-MDMB-BINACA, обнаружение этих соединений позволяет сделать выводы о действительной структуре исходного вещества.

В структурах четырех обнаруженных метаболитов группы M11 (гидроксилирование) гидроксильные группы расположены на неопентановом (M11.1), фторбутильном (M11.2) и индазольном (M11.3 и M11.4) остатках. Степень глюкуронидирования M11.1 очень высока, а относительное содержание его глюкуронида (M11.5) – самое высокое по сравнению с другими метаболитами группы M11. Глюкурониды других гидроксилированных метаболитов (M11.2–M11.4) не обнаружены. Метаболит M11.5 представляет собой простой эфир глюкуроновой кислоты и 4F-MDMB-BINACA, гидроксилированного по неопентановому остатку.

Дигидродиол M12.1 в значительной степени (около 0,7) глюкуронирован.

Степень глюкуронирования дефторированных метаболитов с гидроксилированием (M13.1) или карбоксилированием (M14.1) соответствует их гидролизованному производному (M5.1 и M7.1 соответственно). Для M13.1 это значение велико (около 1). Глюкуронид метаболита M14.1 не обнаружен.

Единственный метаболит группы M15 (карбоксилирование) практически полностью конъюгирован. Метаболиты, подобные M15.1, ранее обнаружены для MDMB-CHMICA, MDMB-FUBINACA и ADB-FUBINACA [17–19]. Однако их структуры не были достаточно детализированы относительно вида функциональных групп на трет-лейциновом фрагменте, поскольку предполагали ряд вариантов, включая дигидроксилирова-

ние и образование двойной связи C-N, гидроксилирование и образование альдегида или карбоксилирование. Согласно нашим наблюдениям, хроматографическое удерживание M15.1 уменьшается с увеличением pH элюента, что прямо указывает на карбоксилирование.

Метаболиты группы M16–M18 образованы при N-деалкилировании и гидролизе амида. M16.1 был единственным обнаруженным метаболитом, лишенным N-бутильной цепи, в его структуре присутствует дополнительная гидроксильная группа на индазольном бицикле.

Два соединения, M17.1 и M18.1, могут рассматриваться либо как метаболиты, либо как примеси или побочные продукты синтеза 4F-MDMB-BINACA, отличающиеся от последнего уменьшенной боковой цепью в 3-м положении индазольного бицикла. Если придерживаться гипотезы о метаболическом происхождении, то M17.1 и M18.1 образуются в результате N-деалкилирования и гидролиза амида соответственно. Глюкурониды M16–M18 не выявлены.

ВЫВОДЫ

Сорок девять метаболитов 4F-MDMB-BINACA обнаружены в моче человека. Они были предположительно идентифицированы как продукты гидролиза, гидроксилирования различных фрагментов, дефторирования с гидроксилированием или карбоксилированием, образования дигидродиола, карбоксилирования остатка неопентана, N-деалкилирования и комбинации этих реакций. Кроме того, выявлены продукты дегидрирования трет-лейцинового остатка, свойства которых предполагают внутримолекулярную циклизацию с образованием лактона. Основными метаболическими путями были гидролиз и дефторирование, сопровождающиеся карбоксилированием. Большинство метаболитов присутствовало в моче как в свободной, так и в глюкуронированной формах. Наибольшая степень глюкуронирования наблюдалась для гидрофобных структур, таких как метиловые эфиры. Среди гидролизованных метаболитов продукты гидролиза без дополнительных модификаций (M1.1), гидроксилирования индазольного кольца и дефторирования с гидроксилированием преимущественно глюкуронированы.

При анализе мочи без предварительного гидролиза рекомендуется выявлять гидролизованный метаболит, его глюкуронид и дефторированный

карбоксилированный метаболит (M1.2, M1.2 и M7.1 соответственно). Для подтверждения присутствия метилового эфира в качестве целевого анализа рекомендуется использовать продукт гидроксирования неопентанового остатка в форме глюкуронида (M11.5). В случае подготовки образца, включающей стадию гидролиза, рекомендуется обнаружение гидролизованного (M1.1), гидроксильного (M11.1) и гидролизованного с дефторированием и карбоксилированием (M7.1) метаболитов 4F-MDMB-BINACA.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. EMCDDA-Europol. EU Drug Markets Report 2019. Publications Office of the European Union, Luxembourg. Available at https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12078/20192630_TD0319332ENN_PDF.pdf. Accessed March 10, 2021.
2. EMCDDA. European Drug Report 2020: trends and developments. Publications Office of the European Union, Luxembourg. Available at https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13236/TDAT20001ENN_web.pdf. Accessed March 10, 2021.
3. *Cannaert A., Sparkes E., Pike E., Luo J.L. et al.* Synthesis and in Vitro Cannabinoid Receptor 1 Activity of Recently Detected Synthetic Cannabinoids 4F-MDMB-BICA, 5F-MPP-PICA, MMB-4en-PICA, CUMYL-CBMICA, ADB-BINACA, APP-BINACA, 4F-MDMB-BINACA, MDMB-4en-PINACA, A-CHMINACA, 5F-AB-P7AICA, 5F-MDMB-P7AICA, and 5F-AP7AICA. *ACS Chem Neurosci* 11:4434-4446. 2020. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00644.
4. *Banister S.D., Connor M.* The Chemistry and Pharmacology of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists as New Psychoactive Substances: Origins. *Handb Exp Pharmacol*. 2018; 252: 165–190. doi:10.1007/164_2018_143.
5. *Assi S., Marshall D., Bersani F.S., Corazza O.* Uses, Effects and Toxicity of Synthetic Cannabinoids from the Perspective of People with Lived Experiences. *J Psychoactive Drugs*. 2020; 52: 237–247. doi:10.1080/02791072.2020.1723748.
6. *Giorgetti A., Busardò F.P., Tittarelli R., Auwärter V., Giorgetti R.* Post-Mortem Toxicology: A Systematic Review of Death Cases Involving Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists. *Front Psychiatry*. 2020; 11: 464. doi: 10.3389/fpsy.2020.00464.
7. *Livny A., Cohen K., Tik N., Tsarfaty G., Rosca P., Weinstein A.* The effects of synthetic cannabinoids (SCs) on brain structure and function. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2018; 28: 1047–1057. doi:10.1016/j.euroneuro.2018.07.095.
8. *Haschimi B., Mogler L., Halter S., Giorgetti A., Schwarze B., Westphal F., Fischmann S., Auwärter V.* Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 4F-MDMB-BINACA in “legal high” products and human urine specimens. *Drug Test Anal*. 2019; 11: 1377–1386. doi:10.1002/dta.2666.
9. *Krotulski A.J., Mohr A.L.A., Logan B.K.* Trend report: Q4. 2018 – synthetic cannabinoids in the United States (summary). https://www.forensicscienceeducation.org/wp-content/uploads/2019/02/Synthetic-Cannabinoid-Trend-Report_Summary_2018-Q4.pdf (accessed March 10, 2021).
10. *Kataev S.S., Dvorskaya O.N., Gofenberg M.A.* Identification of cannabimimetic MDMB(N)-073F metabolites in urine by method of gas chromatography with mass spectrometric detection. *Pharmacy&Pharmacology*. 2019; 7(2):70–83. doi: 10.19163/2307-9266-2019-7-2-70-83.
11. *Huffman J.H.* Cannabimimetic Indoles, Pyrroles, and Indenes: Structure–Activity Relationships and Receptor Interactions. In: *P.H. Reggio* (ed.) *The cannabinoid receptors*. Humana Press, New York City. 2009. doi: 10.1007/978-1-59745-503-9.
12. *Lie W., Cheong E.J.Y., Goh E.M.L., Moy H.Y., Cannaert A., Stove C.P., Chan E.C.Y.* Diagnosing intake and rationalizing toxicities associated with 5F-MDMB-PINACA and 4F-MDMB-BINACA abuse. *Arch Toxicol*. 2021; 95:489–508. doi: 10.1007/s00204-020-02948-3.
13. *Diao X., Huestis M.A.* Approaches, challenges and advances in metabolism of new synthetic cannabinoids and identification of optimal urinary marker metabolites. *Clin Pharmacol Ther*. 2017; 101: 239–253. doi:10.1002/cpt.534.
14. *Krotulski A.J., Mohr A.L.A., Kacinko S.L., Fogarty M.F., Shuda S.A., Diamond F.X., Kinney W.A., Menendez M.J., Logan B.K.* 4F-MDMB-BINACA: A New Synthetic Cannabinoid Widely Implicated in Forensic Casework. *J Forensic Sci*. 2019; 64: 1451–1461. doi:10.1111/1556-4029.14101.
15. *Wagmann L., Frankenfeld F., Park Y.M., Herrmann J., Fischmann S., Westphal F., Müller R., Flockerzi V., Meyer M.R.* How to Study the Metabolism of New Psychoactive Substances for the Purpose of Toxicological Screenings – A Follow-Up Study Comparing Pooled Human Liver S9, HepaRG Cells, and Zebrafish Larvae. *Front Chem*. 2020; 8: 539. doi:10.3389/fchem.2020.00539.
16. *Leong H.S., Watanabe S., Kuzhiumparambil U., Fong C.Y., Moy H.Y., Yao Y.J., Witting P.K., Fu S.* Monitoring metabolism of synthetic cannabinoid 4F-MDMB-BINACA via high-resolution mass spectrometry assessed in cultured hepatoma cell line, fungus, liver microsomes and confirmed using urine samples. *Forensic Toxicol*. 2021; 39: 198–212. doi: 10.1007/s11419-020-00562-7.
17. *Kavanagh P., Grigoryev A., Krupina N.* Detection of metabolites of two synthetic cannabimimetics, MDMB-FUBINACA and ADB-FUBINACA, in authentic human urine specimens by accurate mass LC–MS: a comparison of intersecting metabolic patterns. *Forensic Toxicol*. 2017; 35: 284–300. doi: 10.1007/s11419-017-0356-y.
18. *Franz F., Angerer V., Moosmann B., Auwärter V.* Phase I metabolism of the highly potent synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA and detection in human urine samples. *Drug Test Anal*. 2017; 9: 744–753. doi:10.1002/dta.2049.
19. *Grigoryev A., Kavanagh P., Pechnikov A.* Human urinary metabolite pattern of a new synthetic cannabimimetic, methyl 2-(1-(cyclohexylmethyl)-1H-indole-3-carboxamido)-3,3-dimethylbutanoate. *Forensic Toxicol*. 2016; 34: 316–328. doi: 10.1007/s11419-016-0319-8.

Поступила 30 июня 2022 г.