

In vitro metabolism of two synthetic cannabinoids and using the obtained metabolites in routine drug screening methods.

Miklós Nagy, Klaudia Hegyiné Kemenes, Előd Hidvégi, Gábor Süvegh

HIFS – Department of Forensic Toxicology

Abstract • The present study aims to generate glucuronic acid-conjugated metabolites of the carboxylic acid metabolites of two of the most prevalent synthetic cannabinoids in humans, MDMB-4en-PINACA and ADB-BUTINACA, using in vitro pHLM and pS9 systems. Additionally, the study seeks to optimize and integrate the resulting metabolites into routine drug screening methods. Another objective was to enhance our understanding of phase 2 metabolic transformations of next-generation synthetic cannabinoids by simultaneously detecting both conjugated and free forms. Furthermore, by monitoring the decomposition of glucuronides, we evaluated the efficiency of our routine hydrolysis method—used for confirmatory measurements of synthetic cannabinoids—by comparing it to two alternative hydrolysis procedures. For in vitro experiments, an NADP regeneration system and a UGT system were utilized. Sample acquisitions were performed using a Shimadzu LC-MS/MS-8040 system. A total of 14 urine samples were analyzed, both with and without hydrolysis, followed by acetonitrile precipitation. The hydrolysis efficiency of *Escherichia coli* β -D-glucuronidase-IX-A was compared with that of alkaline hydrolysis and Abalonnase. The in vitro-produced ADB-BUTINACA-carboxylic acid glucuronide and MDMB-4en-PINACA-carboxylic acid glucuronide were MRM-optimized and incorporated into the screening method, supported by chromatographic separation. The glucuronide-bound form of MDMB-4en-PINACA was present in 70% of the samples, while that of ADB-BUTINACA was detected in 93%. The average concentration of ADB-BUTINACA-carboxylic acid was 181 ng/mL, whereas that of MDMB-4en-PINACA-carboxylic acid was 4.17 ng/mL. Alkaline hydrolysis demonstrated the highest efficiency, completely degrading glucuronide-bound metabolites in all samples and yielding the highest concentrations of free metabolites. On average, the concentrations increased by more than 700% following alkaline hydrolysis, compared to increases of approximately 300% with β -D-glucuronidase and 190% with Abalonnase. Our findings indicate that the preparation and monitoring of phase 2 metabolites of synthetic cannabinoids enhance drug detection and reduce the likelihood of false-negative results. However, further studies are required to fully assess the reliability of hydrolysis methods.

Keywords • synthetic cannabinoids; ADB-BUTINACA; MDMB-4en-PINACA; in vitro.

DOI: 10.2478/orvtudert-2023-0011

Bulletin of Medical Sciences 2023, 96(2): 133–144

Introduction

Synthetic cannabinoids are a diverse group of compounds with chemical structures distinct from natural cannabis. However, they can bind to CB1 and/ or CB2 receptors, often making them significantly more powerful—and potentially more dangerous—than traditional or semi-synthetic cannabinoids. The most common side

Corresponding author

Miklós Nagy
HIFS – Department of Forensic Toxicology
Károli Gáspár Tér 3
Budapest XI, 1114, Hungary
Email: nagymiki98@yahoo.com

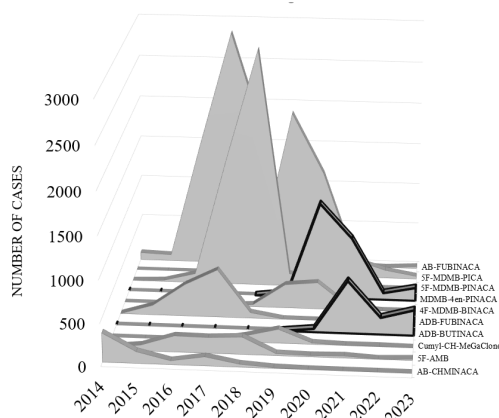


Figure 1. Prevalence of synthetic cannabinoids (2014–2023)

effects include neurological, psychotic, gastrointestinal, renal, and cardiovascular disorders, but in severe cases, death may occur [1, 2].

Over the past decade, trends in synthetic cannabinoid use have demonstrated the highly dynamic and evolving nature of the illegal drug market, which continues to expand with new substances. Since the first synthetic cannabinoids emerged, more than 250 additional compounds have been reported worldwide, making them one of the most prominent groups of new psychoactive substances [3]. In Hungary, approximately 55–60 synthetic cannabinoids and their metabolites have been identified in human urine and blood samples over the past decade. The most frequently detected compounds include AB-FUBINACA and 5F-MDMB-PINACA (with over 2,500 cases reported between 2015 and 2019), followed by 5F-MDMB-PICHA (nearly 2,000 cases between 2017 and 2020) (Figure 1.)

Although these three compounds have nearly disappeared, two newer substances—MDMB-4en-PINACA and ADB-BUTINACA—have become the most commonly detected synthetic cannabinoids in Hungary since their introduction in 2019 respectively 2020. Our data is corroborated by the 2023 annual report published by the National Drug Focal Point, which states that in 2021, more than 70% of confiscations involving synthetic cannabinoid-impregnated plant material contained ADB-BUTINACA (48%) and MDMB-4-en-PINACA (28%). In 2022, plant materials containing ADB-BUTINACA were found in approximately 60% of confiscations. [4].

Our current study focuses on the main metabolites of these two synthetic cannabinoids excreted in urine, specifically the carboxylic acid metabolites and their glucu-

ronide-conjugated forms. Since glucuronide-conjugated compounds are not commercially available, we investigated their *in vitro* production and adoption into screening methods. Additionally, we used them to compare the efficiency of different hydrolysis procedures.

Our key objectives include:

1. *In vitro* production and analysis of glucuronide-conjugated metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with multiple reaction monitoring (MRM), followed by integration of optimized MRM ion transitions into routine screening methods.
2. Expanding knowledge of phase II metabolic transformations of next-generation synthetic cannabinoids by detecting both free and conjugated metabolites.
3. Subsequently, we compared the efficacy of the *Escherichia coli* β -D-glucuronidase-IX-A enzyme used for confirmatory tests with the efficacy of classic alkaline hydrolysis and the Abolanase ULTRA enzyme.

Material and Methods

Reference Standards: ADB-BUTINACA-carboxylic acid and MDMB-4en-PINACA-carboxylic acid were purchased from Cayman Chemicals.

Reagents for Incubation:

- **Buffers & Cofactors:** 0.5 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) (Corning), NADPH regeneration system (Solutions A and B) (Corning), UGT system (Solutions A and B) (Corning), superoxide dismutase enzyme (Corning), KCl (Merck), $MgCl_2$ (Merck).
- **Solvents:** Methanol (LC-MS) (Merck), acetonitrile (LC-MS) (Merck), ultrapure water (Rotisolv), formic acid (LC-MS, $\geq 99\%$) (Rotipuran), ammonium formate (LC-MS, $\geq 99\%$) (Merck), KOH ($\geq 85\%$) (Merck).
- **Enzymes for Hydrolysis:** Abalanase ULTRA + buffer solution (UCT), *Escherichia coli* β -D-glucuronidase IX-A.

In Vitro Incubation System: Described in Table 1 [5, 6].

Abbreviations:

- **UGT:** Uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase)
- **SOD:** Superoxide dismutase
- **K/Mg:** 8 mM $MgCl_2$ and 33 mM KCl solution

Table 1. In Vitro Incubation Systems

Component	pHLM Incubation (μL)	pS9 Incubation (μL)
Solution A	5	5
Solution B	1	1
Water	60	60
Buffer (0.5 M)	20	20
Substrate (1 mg/mL)	1	1
pHLM (20 mg/mL)	5	—
pS9 (20 mg/mL)	—	5
SOD (3 kU/mL)	10	—
K/Mg Solution	—	10
UGT Solution A	10	10
UGT Solution B	25	25
Incubation Time	120 min	120 min
Temperature	37.5°C	37.5°C

The 14 previously confirmed positive urine samples were analyzed using different preparation methods, including direct analysis without hydrolysis and acetonitrile precipitation, following three distinct hydrolysis procedures [7-10] (**Table 2**). These approaches contrast with the more complex sample preparation techniques typically employed in routine confirmatory studies, such as solid-phase extraction (SPE), freezing, and evaporation [11, 12].

LC-MS/MS Parameters

Analysis was performed using a Shimadzu LC-MS/MS

Table 2. Conditions of Hydrolysis Processes

Process of Hydrolysis	Hydrolysis Time (minutes)	Column Temperature (°C)	Shaking Speed (spm)
E. coli	120	37.5	250
Abalonnase ULTRA	30	60	250
KOH (10 M)	15	60	250

8040 system, with data evaluated using LabSolutions software. The eluents used were:

- Eluent A: 0.15 mM formate buffer (pH 4)
- Eluent B: Acetonitrile acidified with 0.1% formic acid

The chromatographic gradient (**Figure 2**) was as follows:

- Initially, 5% eluent B, increasing to 25% within 1 minute and reaching 25% at 3 minutes.
- Within the next minute, the organic eluent concentration increased to 80%, maintained for 3 minutes.
- The concentration then decreased to 5% within 0.5 minutes.
- The final 1.5 minutes restored equilibrium to the initial conditions.

Other chromatographic parameters included:

- Flow rate: 0.5 mL/min
- Column: Kinetex® C18 (100 mm × 3 mm × 2.6 μm)
- Column temperature: 40°C
- Injection volume: 10 μL

Mass Spectrometry Parameters

The mass spectrometry conditions were as follows:

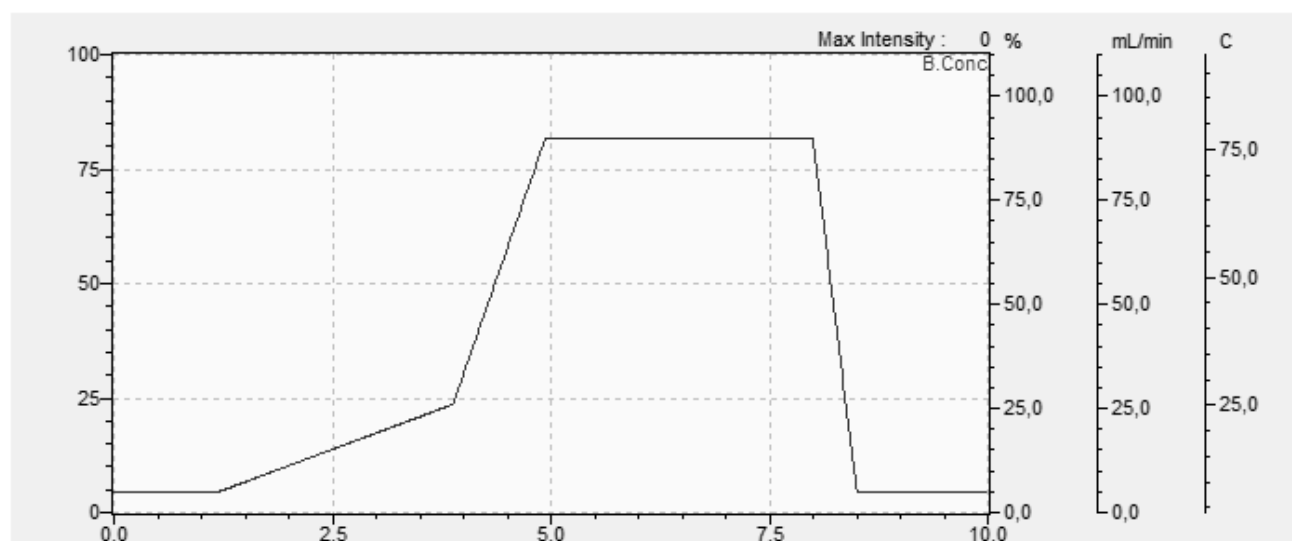
**Figure 2.** Chromatography gradient

Table 3. Tested Fragments and Collision Energies

Metabolite	Retention Time (min)	MRM Transitions (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	Collision Energy (CE)	Q3 Pre Bias (V)
ADB-BUTINACA-carboxylic acid	5.879	332.000 > 201.050 332.000 > 286.150	-16.0 -16.0	-22.0 -14.0	-21.0 -20.0
ADB-BUTINACA-x-glucuronide	5.450	508.100 > 332.100 508.100 > 286.150 508.100 > 201.100	-28.0 -20.0 -38.0	-14.0 -24.0 -35.0	-16.0 -10.0 -13.0
MDMB-4en-PINACA-carboxylic acid	5.899	344.100 > 213.050 344.100 > 298.150	-13.0 -13.0	-24.0 -16.0	-23.0 -21.0
MDMB-4en-PINACA-x-glucuronide	5.480	520.300 > 344.150 520.300 > 213.050 520.300 > 298.150	-20.0 -20.0 -20.0	-15.0 -41.0 -25.0	-25.0 -22.0 -10.0

- Desolvation line temperature: 230°C
- Heat block temperature: 300°C
- Atomizing gas (N₂) flow rate: 3 L/min
- Drying gas (N₂) flow rate: 10 L/min

Detection was performed using positive electrospray ionization (ESI) in multiple reaction monitoring (MRM) mode, targeting selected fragments (Table 3).

Of the 14 urine samples analyzed, 9 tested positive for MDMB-4en-PINACA-carboxylic acid, while all 14 were positive for ADB-BUTINACA-carboxylic acid, based on screening and confirmatory tests.

Results

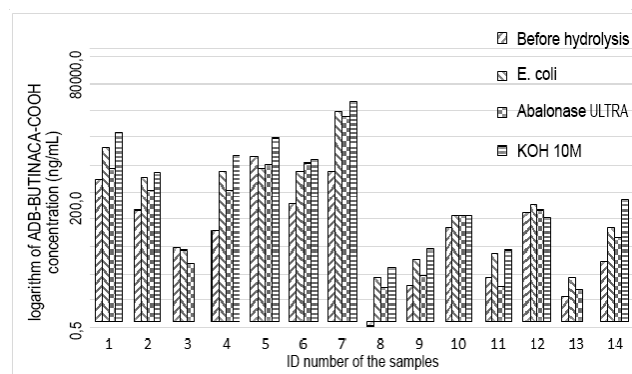
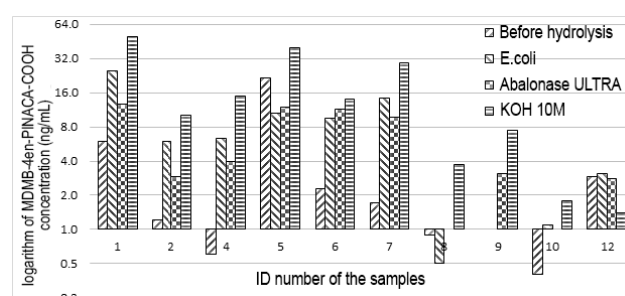
We successfully synthesized and optimized glucuronide-conjugated metabolites of both compounds using in vitro pHLM and pS9 systems.

The glucuronidated form was identified alongside the carboxylic acid metabolite in 93% and 78% of MDMB-4en-PINACA samples. Following all three hydrolysis

steps, an increase in the free carboxylic acid concentration for both compounds (Figures 3 and 4) was observed, accompanied by a decrease in the bound glucuronide form (Figure 5).

Hydrolysis using the *E. coli* β -D-glucuronidase IX-A enzyme resulted in an average concentration increase of 332% for ADB-BUTINACA-carboxylic acid and 312% for MDMB-4en-PINACA. The Abalonnase ULTRA enzyme demonstrated lower efficiency, yielding increases of 188% and 189%, respectively. In contrast, classical alkaline hydrolysis (KOH 10 M) produced significantly higher concentration increases of 716% for ADB-BUTINACA-carboxylic acid and 745% for MDMB-4en-PINACA-carboxylic acid.

Due to the absence of a suitable reference standard, the reduction in glucuronide forms could only be estimated based on absolute peak areas. For ADB-BUTINACA-carboxylic acid glucuronide, hydrolysis with *E. coli* β -D-glucuronidase IX-A reduced peak area values by an average of 21.4%, while Abalonnase ULTRA led to a 59.5% reduction. Alkaline hydrolysis demonstrated nearly 100% efficiency in glucuronide degradation. Similarly, for MDMB-4en-PINACA-carboxylic acid glucuronide,

**Figure 3.** ADB-BUTINACA Carboxylic Acid Concentration Before and After Hydrolysis**Figure 4.** MDMB-4en-PINACA Carboxylic Acid Concentration Before and After Hydrolysis

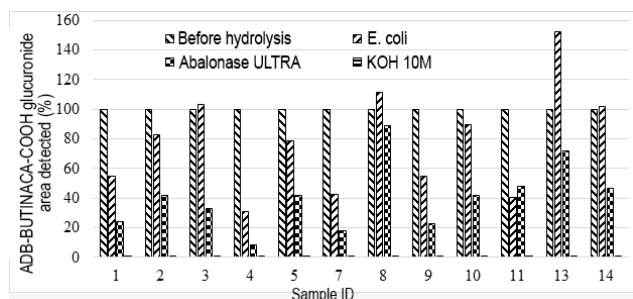


Figure 5. Glucuronide Peak Area Values in Hydrolyzed vs. Unhydrolyzed Samples

all three hydrolysis methods resulted in almost complete degradation of the glucuronide-bound metabolite.

A possible explanation for the observed differences in hydrolysis efficiencies between the two glucuronide-conjugated metabolites could be the significant concentration differences between the target compounds. This may have influenced the quantitative ratio between the enzyme and the target compound.

To evaluate the matrix effect, three different blind urine samples and a distilled aqueous sample were used as reference backgrounds. These were spiked with both carboxylic acid metabolites (A and B) at three concentration levels and subjected to the three hydrolysis procedures, as well as a control without hydrolysis. By comparing corresponding samples, the effect of background matrix changes on concentration variation—primarily an increase—was assessed (Figure 6).

The results confirm that all three hydrolysis pro-

cesses contribute to an increased matrix effect. The use of appropriate internal standards is essential to mitigate this issue. Additionally, the matrix effect was found to be inversely proportional to the concentration of the target compound.

Conclusion

The incorporation of glucuronide-conjugated synthetic cannabinoid metabolites, synthesized and optimized using pHLM and pS9 systems, into routine screening methods enhances the detection of drug users and reduces false-negative results, ensuring more reliable identification of synthetic cannabinoids.

Among the hydrolysis methods, alkaline hydrolysis proved to be the most effective; however, its extreme reaction conditions and high temperatures pose stability challenges and amplify matrix effects, making it unsuitable for routine applications. The efficacy of the two enzymatic hydrolysis methods yielded contradictory results. When evaluating the increase in carboxylic acid metabolite concentration alone, β -D-glucuronidase IX-A demonstrated nearly twice the efficiency of Abalonase ULTRA. However, when assessing glucuronide depletion, Abalonase ULTRA proved more effective, leaving fewer detectable glucuronide-bound metabolites than β -D-glucuronidase IX-A.

Additional investigations are required to address questions regarding enzyme selectivity, temporal activity

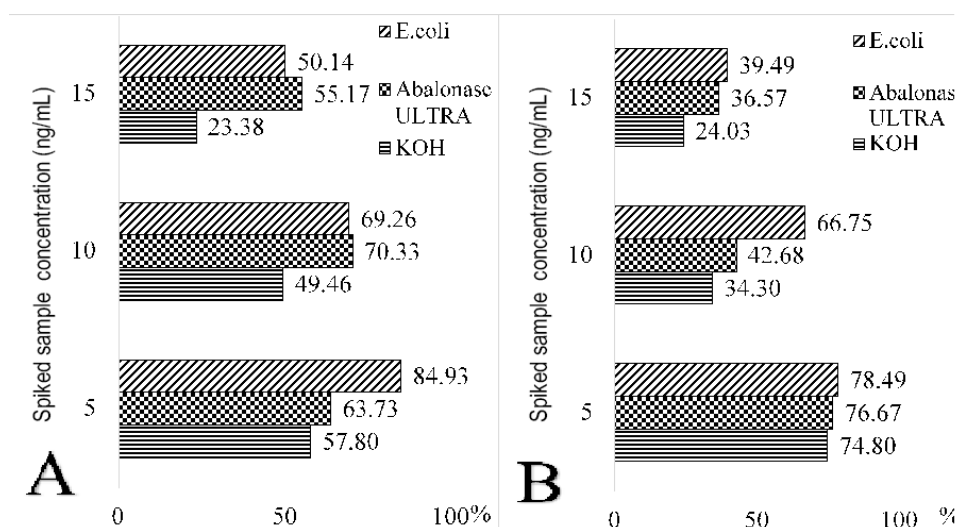


Figure 6. Matrix Effect Representation A: MDMB-4en-PINACA carboxylic acid; B: ADB-BUTINACA carboxylic acid.

decay, and incubation parameters. Additional research is required to better understand these factors.

List of Abbreviations:

- ADB-BUTINACA: N-[(2S)-1-amino-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]-1-butyl-1H-indazole-3-carboxamide
- MDMB-4en-PINACA: Methyl (S)-3,3-dimethyl-2-(1-(pent-4-en-1-yl)-1H-indazole-3-carboxamido)butanoate
- E. coli: Escherichia coli
- pHLM: Pooled Human Liver Microsomes (human liver microsome fraction)
- pS9: Human liver microsomal homogenate, containing cytosol
- ESI: Electron Spray Ionization
- -ks: Carboxylic acid metabolite
- -glu: Glucuronide-conjugated form
- LC-MS/MS: Ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry
- LC-MS: Mass spectrometry-grade solvent/reagent
- MRM: Multiple Reaction Monitoring
- SPE: Solid-Phase Extraction
- UGT: Uridine-5-diphospho-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase)
- SOD: Superoxide Dismutase
- Cu/Mg: 8 mM MgCl₂ and 33 mM KCl solution

References

1. Giorgetti A, Busardò FP, Tittarelli R, Auwärter V, Giorgetti R. Post-mortem toxicology: A systematic review of death cases involving synthetic cannabinoid receptor agonists. *Front Psychiatry*. 2020;11(May):1–22.
2. Assi S, Marshall D, Bersani FS, Corazza O. Uses, Effects and Toxicity of Synthetic Cannabinoids from the Perspective of People with Lived Experiences. *J Psychoactive Drugs*. 2020;52(3):237–47.
3. Xu DQ, Dai Y, Zhang WF, Wang JF, Wang YY, Zhang Y, et al. Rapid Identification of MDMB-CHMINACA Metabolites Using Zebrafish and Human Liver Microsomes as the Biotransformation System by LC-QE-HF-MS. *J Anal Toxicol*. 2020;44(9):1012–26.
4. Nemzeti Drog Fókuszpont - Nemzeti Kábítószer Adatgyűjtő és Kapcsolattartó Központ. 2023-as ÉVES JELENTÉS (2022-es adatok) az EMCDDA számára [Internet]. Budapest: Nemzeti Drog Fókuszpont; 2023. Available from: <https://drogfokuszpont.hu/eves-jelentesek/>
5. Klaudia K, Előd H, Ágnes K, Gábor S. Metabolism of the synthetic cathinone alpha-pyrrolidinoisohexanophenone in humans using UHPLC-MS-QToF. *Toxicol Anal Clin*. 2022;34(3):58–59.
6. Maria A, Xingxing D, Ariane W, Karl BS, Marilyn AH. Metabolic profiling of new synthetic cannabinoids AMB and 5F-AMB by human hepatocyte and liver microsome incubations and high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2016;30(8):1067–1078.
7. United Chemical Technologies Inc. Beta-Glucuronidase Product Line [Internet]. Budapest: UCT.Inc; 2023. Available from: <https://www.unitedchem.com/>
8. United Chemical Technologies Inc. Abalonase™ Ultra – ALL-NEW Purified Enzymatic Formula at Maximum Activity Thresholds [Internet]. Budapest: UCT.Inc; 2023. Available from <https://www.unitedchem.com/>.
9. Sigma-Aldrich Inc. β-Glucuronidase Type IX-A from Escherichia coli – Product Information [Internet]. Budapest: Sigma-Aldrich.Inc; 2023. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/357/772/g7396dat.pdf>.
10. Mateus MB, Allan B, Regina HCQ, Yasmin LH, Marilyn AH. Impact of enzymatic and alkaline hydrolysis on CBD concentration in urine. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(14):4679–4689.
11. Andrew DdJ, Janet VW, Michael H, Wendy F, Ashley H. LC-MS/MS method for the quantification of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine – An Australian perspective. *J Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Lide Sci* 2012;897: 22–31.
12. Rebecca H, Melinda KS, Dennis JC, David LB, Timothy AR, Lucas M, Chantel LB, Anne Z. Michael AC. Prevalence of synthetic cannabinoids in U.S. athletes: initial findings. *J Anal Toxicol*. 2012;36(8):588–593.

Szintetikus kannabinoidok in vitro metabolizmusa és a kapott metabolitok felhasználása rutin kábítószer szűrési módszerekben

Nagy Miklós, Hegyiné Kemenes Klaudia, Hidvégi Előd, Süvegh Gábor

NSZKK – Toxikológiai Szakértő Intézet

Összefoglaló • Magyarországon a lefoglalási adatok alapján 2021 óta a két leggyakoribb szintetikus kannabinoid az MDMB-4en-PINACA és az ADB-BUTINACA. Jelen tanulmány célja, hogy in vitro, pHLM és pS9-rendszerek felhasználásával ezeknek a vegyületeknek az emberi szervezetben keletkező karbonsav bomlástermékeinek glükuronsavval konjugált metabolitját előállítsuk, tandem tömegspektrometriás (MRM) mérési paramétereit optimalizáljuk és beágyazzuk egy rutin LC-MS/MS szűrővizsgálati módszerbe. Következő célunk, hogy rutinvizsgálataink során monitorozva a konjugált és a szabad formákat, ismereteinket bővíthessük a fázis 2. metabolikus átalakulásokról az új generációs szintetikus kannabinoidok tekintetében. Végül szeretnénk összehasonlítani a szintetikus kannabinoidok kvantitatív megerősítő vizsgálatához eddig rutinszerűen használt hidrolízis módszert két másik típusú hidrolízis eljárással a glükuronidált metabolitok fogyásának követésével. Az in vitro kísérletekhez NADP-regeneráló rendszert és UGT-rendszert alkalmaztunk. A méréseket Shimadzu LC-MS-8040 készüléken végeztük, Kinetex® C18 (100mm x 3mm, 2,6 µm) oszloppal. A vizsgált 14 vizeletmintát hidrolízis nélkül, illetve három féle hidrolízist követően, acetonitriles kicsapással készítettük elő. Az *Escherichia coli* β-D-glükuronidáz-IX-A enzim hidrolízis-hatékonyágát a lúgos hidrolízis és az Abalonase ULTRA enzim hatékonyságával hasonlítottuk össze. Az in vitro előállított ADB-BUTINACA-karbonsav-glükuronid és MDMB-4en-PINACA-karbonsav-glükuronid MRM paramétereit kromatográfiás elválasztással támogatva optimalizáltuk és beállítottuk a szűrő módszerbe. A nem hidrolizált 14 minta 92,9%-ában detektáltuk az ADB-BUTINACA-karbonsav mellett a glükuroniddal konjugált metabolitot. Az MDMB-4en-PINACA esetében 70%-ban volt jelen a glükuronid-kötött forma. Az ADB-BUTINACA-karbonsav koncentrációja átlagosan 181 ng/mL volt. Az MDMB-4en-PINACA-karbonsav koncentrációja átlagosan 4,17 ng/mL volt. A lúgos hidrolízis bizonyult a leghatékonyabbnak, mivel hidrolízis után nem voltak detektálhatóak a mintákban a glükuronid-kötött metabolitok, illetve ez az eljárás produkálta a legmagasabb koncentrációt a szabad metabolitokra nézve. A koncentrációk átlaga több mint 700%-kal emelkedett, míg a β-D-glükuronidáz és az Abalonase 300% körüli növekedést produkált. Eredményeink alapján a szintetikus kannabinoidokból származó karbonsav-metabolitok glükuronsavval konjugált formáinak előállítása és szűrővizsgálatokba történő beágyazása megkönnyíti a szerhasználat észlelését, illetve csökkenti a fals negatív eredmények számát. A hidrolízismódszerek megbízhatóságát tekintve további kísérletek szükségesek az enzimek mennyiségére és az inkubáció körülményeire vonatkozóan.

Kulcsszavak • szintetikus kannabinoidok; ADB-BUTINACA; MDMB-4en-PINACA; in vitro

DOI: 10.2478/orvtudert-2023-0011

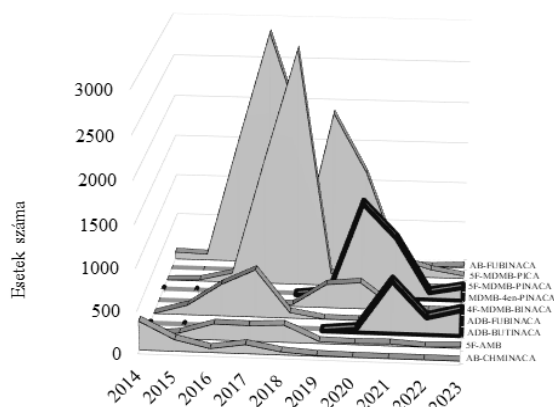
Orvostudományi Értesítő 2023, 96(2): 133-144

Bevezetés

Szintetikus kannabinoidoknak a vegyületek azon csoportját nevezzük, melyek kémiai szerkezete eltér a vadkenderből származó hatóanyagokétól, de képesek kapcsolódni a CB1 és/vagy CB2 receptorokhoz. Így gyakran a hagyományos, vagy félszintetikus kannabinoidoknál jóval potensebbek és egyben jóval veszélyesebbek is.

Gyakori mellékhatásaik főleg neurológiai, pszichotikus, gyomor-bélrendszeri, vesét érintő és kardiovaszkuláris rendellenességekből tevődnek össze, de súlyos esetekben halált is okozhatnak [1, 2].

Az elmúlt évtized szintetikus kannabinoid-trendjeit tekintve egyértelműen elmondható, hogy az illegális drogpiac egy dinamikus változó ágáról beszélünk, amely gyorsan bővül újabb és újabb szerekkel. Az első szinte-



1. ábra. Szintetikus kannabinoidok előfordulásának gyakorisága (2014-2023)

tikus kannabinoidok megjelenése óta napjainkig több mint 250 további vegyületet jelentettek világszerte, így az új pszichoaktív anyagok egyik legjelentősebb csoportjává váltak [3]. Magyarországi adatok alapján az elmúlt évtizedben kb. 55-60 féle szintetikus kannabinoidot és azok bomlástermékeit azonosítottak emberi vizelet és vérmin-tákból. Ezek közül a legtöbbször detektált vegyületek az AB-FUBINACA és az 5F-MDMB-PINACA (több mint 2500 eset 2015-2019 közt), amelyeket az 5F-MDMB-PINACA követ (közel 2000 eset 2017-2020 között) (**1. ábra**).

E három vegyület napjainkra szinte teljesen el is tűnt, azonban a sorban következő két anyag, az MDMB-4en-PINACA és az ADB-BUTINACA 2019-es, illetve 2020-as megjelenése óta a két leggyakrabban detektált szintetikus kannabinoiddá vált Magyarországon. Adatainkat a Nemzeti Drog Fókuszpont által megjelentett, 2023-as éves jelentés is megerősíti, miszerint 2021-ben szintetikus kannabinoidot tartalmazó impregnált növényi anyagot érintő lefoglalások több mint 70%-ában ADB-BUTINACA (48%) és MDMB-4-en-PINACA (28%) fordult elő. 2022-ben a lefoglalások mintegy 60%-ában ADB-BUTINACA-t tartalmazó növényi anyagokat találtak [4].

Jelenlegi tanulmányunk ezen két szintetikus kannabinoid vizelettel ürülő fő bomlástermékeivel, azaz a karbonsav metabolitokkal és azok glükuronid-konjugált formájával foglalkozik. Mivel kereskedelmi forgalomban nem kaphatóak a glükuronid-konjugált vegyületek, in vitro előállításukat és szűrőmódszerbe való adoptálásukat vizsgáltuk, illetve segítségükkel különböző hidrolízis-eljárások hatékonyságát hasonlítottuk össze.

Célkitűzéseink

Első és egyben legfőbb célunk a glükuronid-konjugált metabolitok in vitro előállítása és vizsgálata folyadékkromatográfiához kapcsolt tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS), a többszörös termékion követő (multiple reaction monitoring, MRM) módszerrel, valamint az optimált MRM ionátmenetek beágyazása a rutin szűrőmódszerbe.

Ezt követően a kibővített módszerrel egyszerre detektálva a kötött és szabad formákat, a fázis 2 metabolikus átalakulásokkal kapcsolatos ismereteink bővítését tűztük ki célul az új generációs szintetikus kannabinoidok tekintetében.

Ezután a megerősítő vizsgálatokhoz használt *Escherichia coli* β -D-glükuronidáz-IX-A enzim hatékonyságát hasonlítottuk össze a klasszikus lúgos hidrolízis és az Abolanase ULTRA enzim hatékonyságával.

Anyagok és módszerek

Az ADB-BUTINACA-karbonsav és MDMB-4en-PINACA-karbonsav metabolit referencia standardokat a Cayman Chemicals-tól szereztük be.

Az inkubációhoz használt reagensek: 0,5 M kálium-foszfát puffer (pH 7,4) (Corning), NADPH-regeneráló rendszer (Solution A and B) (Corning), UGT-rendszer (Solution A and B) (Corning), szuperoxid-diszmutáz enzim (Corning), KCl (Merck), MgCl₂ (Merck).

Felhasznált oldószerek: metanol (LC-MS) (Merck), acetonitril (LC-MS) (Merck), ultratiszta víz (Rotisolv), hangyasav (LC-MS) ($\geq 99\%$) (Rotipuran), ammónium-formiát (LC-MS) ($\geq 99\%$) (Merck), KOH ($\geq 85\%$) (Merck).

A hidrolízishez felhasznált enzimek: Abolanase ULTRA + puffer oldat (UCT); *Escherichia coli* β -D-glükuronidáz-IX-A.

Az in vitro inkubációs rendszer leírását az **1. táblázat** tartalmazza [5, 6].

A vizsgált 14, előzőekben igazoltan pozitív vizeletmintát hidrolízis nélkül, illetve háromféle hidrolízis eljárást [7-10] (2. táblázat) követő acetonitriles kicsapással készítettük elő, a rutin megerősítő vizsgálatok során használt összetettebb mintaelőkészítési folyamatokkal (SPE, kifagyasztás, bepárlások stb.) ellentétben [11, 12].

1.táblázat. In vitro inkubációs rendszerek

pHLM inkubáció		pS9 inkubáció	
A oldat	5 (µL)	A oldat	5 (µL)
B oldat	1 (µL)	B oldat	1 (µL)
Víz	60 (µL)	Víz	60 (µL)
Puffer (0,5 M)	20 (µL)	Puffer (0,5 M)	20 (µL)
Szubsztrát (1 mg/mL)	1 (µL)	Szubsztrát (1 mg/mL)	1 (µL)
pHLM (20 mg/mL)	5 (µL)	pS9 (20 mg/mL)	5 (µL)
SOD (3 kU/mL)	10 (µL)	K/Mg	10 (µL)
A UGT oldat	10 (µL)	A UGT oldat	10 (µL)
B UGT oldat	25 (µL)	B UGT oldat	25 (µL)
idő	120 (perc)	idő	120 (perc)
hőmérséklet	37,5 (°C)	hőmérséklet	37,5 (°C)

UGT: Uridin-5-difosforo-glükuronoziltransferáz (UDP glükuronoziltranszferáz)
 SOD: Szuperoxid-dizmutáz
 K/Mg: 8 mM MgCl₂ és 33 mM KCl oldat

LC-MS/MS paraméterek

A méréseket Shimadzu LC-MS/MS 8040 készüléken végeztük és a LabSolutions szoftver segítségével értékeltük. Felhasznált eluensek: A eluens: 0,15 mM formiát puffer (pH 4); B eluens: 0,1% hangyasavval savanyított acetonitril. A kromatográfiás gradiens (2. ábra) 5% B

2.táblázat. A hidrolízis eljárások körülményei

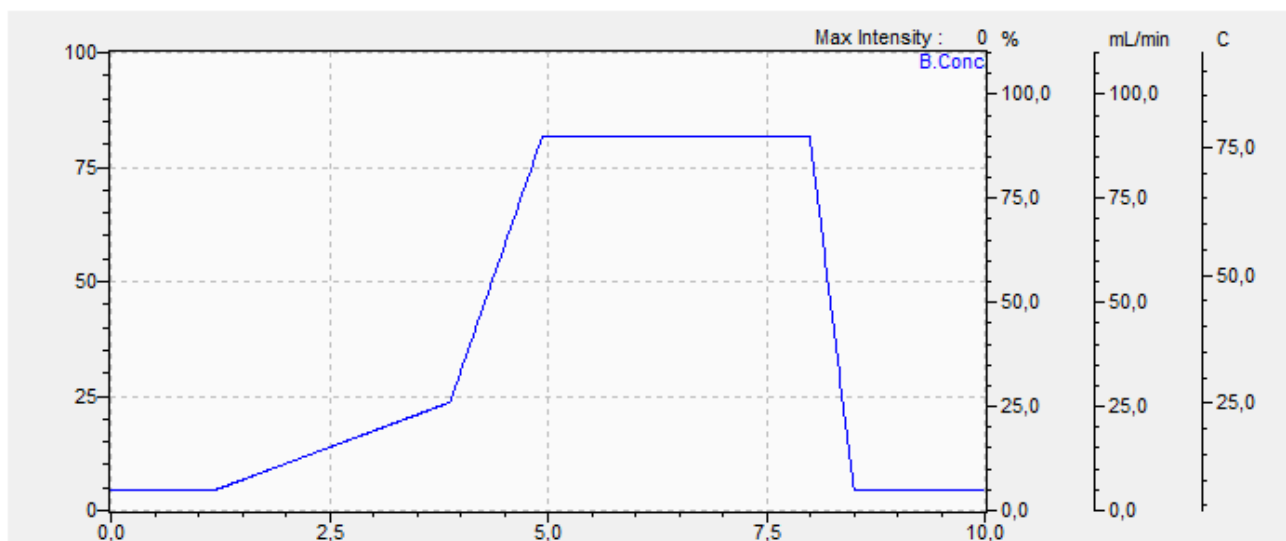
Hidrolízis-eljárás	Hidrolízis ideje (perc)	Oszlophőmérséklet (°C)	Rázási sebesség (rpm)
E. coli	120	37,5	250
Abalonase ULTRA	30	60	250
KOH (10 M)	15	60	250

eluensről indul, majd 1 perc után fokozatosan 25%-ra emelkedik 3 perc alatt. A következő 1 percben 80%-ra emelkedik a szerves eluens koncentrációja, amit 3 percig ezen a szinten tartunk, majd fél perc alatt a kezdeti 5%-os koncentrációt állítjuk vissza. A maradék 1,5 percben a kezdeti egyensúlyi állapot visszaállása valósul meg.

Egyéb kromatográfiás paraméterek: áramlási sebesség: 0,5 mL/ perc; oszlop: Kinetex® C18 (100 mm x 3 mm x 2,6 µm); oszlophőmérséklet: 40°C, injektált térfogat: 10 µL.

A tömegspektrometriás paraméterek a következők voltak: a desolvation line hőmérséklete 230°C, míg a heat block hőmérséklete 300°C volt. A porlasztó gáz (N₂) áramlási sebessége 3 L/ perc, valamint a szárító gáz (N₂) áramlási sebessége 10 L/ perc volt. A meghatározás pozitív elektron spré ionizációval (ESI), pozitív MRM módban történt, a kiválasztott fragmensekre (3. táblázat).

A 14 vizsgált vizeletmintából 9 volt pozitív az MDMB-4en-PINACA-karbonsavra és 14 az ADB-BUTINACA-karbonsavra a szűrő- és megerősítő vizsgálatok alapján.


2. ábra. Kromatográfiás gradiens

3. táblázat. Vizsgált fragmensek és ütközési energiák

Metabolitok	Ret. Idő (perc)	MRM átmenetek (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
ADB-BUTINACA-karbonsav	5,879	332,000 > 201,050	-16,0	-22,0	-21,0
		332,000 > 286,150	-16,0	-14,0	-20,0
ADB-BUTINACA-ks-glükuronid	5,450	508,100 > 332,100	-28,0	-14,0	-16,0
		508,100 > 286,150	-20,0	-24,0	-10,0
		508,100 > 201,100	-38,0	-35,0	-13,0
MDMB-4en-PINACA-karbonsav	5,899	344,100 > 213,050	-13,0	-24,0	-23,0
		344,100 > 298,150	-13,0	-16,0	-21,0
MDMB-4en-PINACA-ks-glü	5,480	520,300 > 344,150	-20,0	-15,0	-25,0
		520,300 > 213,050	-20,0	-41,0	-22,0
		520,300 > 298,150	-20,0	-25,0	-10,0

Eredmények

Mindkét vegyület esetében sikeresen előállítottuk és optimalizáltuk a glükuronid konjugált metabolitokat in vitro pHLM és pS9 rendszerek segítségével. Az ADB-BUTINACA esetében

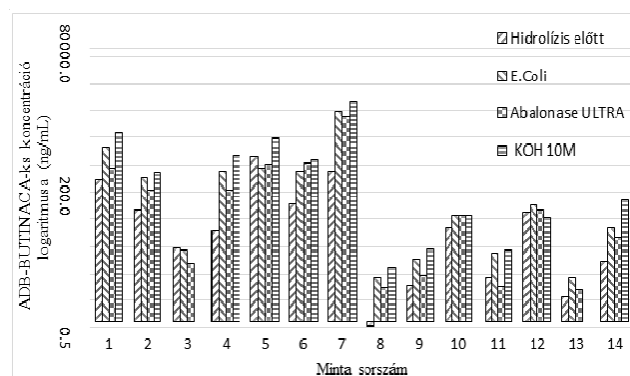
93%-ban, míg az MDMB-4en-PINACA esetében 78%-ban azonosítottuk a karbonsav-metabolit mellett a glükuronidált formát.

Mindhárom hidrolízist követően megfigyelhető volt mindkét vegyület szabad karbonsav koncentrációjának emelkedése (3. ábra és 4. ábra) és a kötött glükuronid forma koncentrációjának csökkenése (5. ábra).

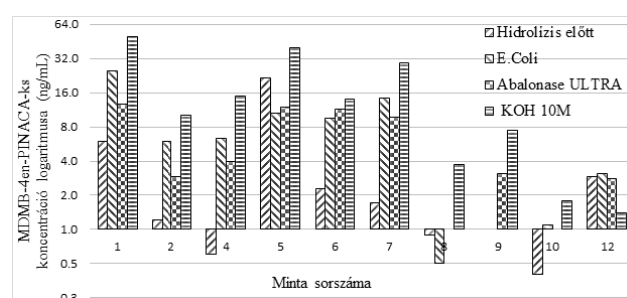
Az *E. coli* β -D-glükuronidáz-IX-A enzimmel történő hidrolízis az ADB-BUTINACA-karbonsav esetében átlagosan 332%-os, míg az MDMB-4en-PINACA esetében 312%-os koncentráció-emelkedést produkált. Az Abalonase ULTRA enzim jóval kisebb hatékonyságú volt, 188% és 189% koncentrációemelkedést eredményezett a vizsgált vegyületek esetében. Ezzel szemben a klasszi-

kus lúgos hidrolízis (KOH 10 M) lényegesen nagyobb, az ADB-BUTINACA-karbonsav esetében 716% és az MDMB-4en-PINACA-karbonsav esetében 745% koncentrációemelkedést okozott. A glükuronid formák csökkenését csak az abszolút csúcsterületek alapján lehet megbecsülni, hiszen megfelelő referenciastandard hiányában a kvantitatív meghatározás nem lehetséges. Az ADB-BUTINACA-karbonsav-glükuronidot tekintve az *E. coli* β -D-glükuronidáz-IX-A enzim átlagosan 21,4 %-kal, az Abalonase ULTRA 59,5 % -al csökkentette az csúcsterület-értékeket, míg a lúgos hidrolízis esetében közel 100%-os hatékonyságú hidrolízist figyeltünk meg. Az MDMB-4en-PINACA-karbonsav-glükuronid esetében mindhárom hidrolízis közel 100%-ban elbontotta a glükuronid-kötött metabolitot. A két glükuronid-konjugált metabolitra vonatkozó hidrolízis-hatékonyságok közti különbség egy lehetséges magyarázata a célvegyületek közti, több nagyságrendnyi koncentrációkülönbség lehet, melynek következtében eltolódott az enzim és célvegyület közti mennyiségi arány.

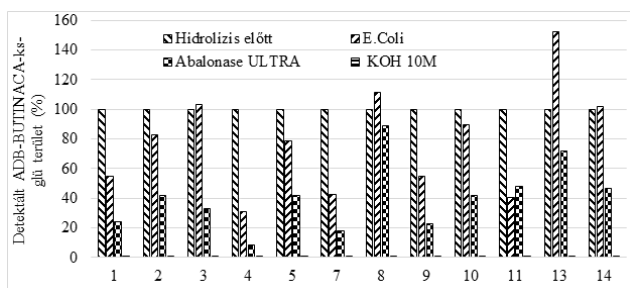
A háttérmátrix vizsgálatához három különböző vak vizeletmintát és referencia gyanánt egy desztillált vizes



3. ábra. ADB-BUTINACA-karbonsav koncentráció változása hidrolízis előtt és után



4. ábra. MDMB-4en-PINACA-karbonsav koncentráció változása hidrolízis előtt és után



5. ábra. A hidrolizált mintákban visszamaradó glükuronid csúcsterület értékek a hidrolizálatlan mintákban mértékhez képest

mintát addicionáltunk három koncentrációsinten mindkét karbonsav metabolittal (A és B), és előkészítettük a már ismertett három típusú hidrolízis eljárással, valamint hidrolízis nélkül is. Így a megfelelő mintákat összehasonlítva megfigyelhető a háttérmátrix változásából eredő koncentrációváltozás, esetünkben emelkedés (6. ábra).

Az eredmények alátámasztják, hogy mindhárom hidrolízis nagyobb mátrixhatást eredményez. Ennek kiküszöbölésére elengedhetetlen a megfelelő belső standardok használata. Megfigyelhető továbbá, hogy a mátrixhatás fordítottan arányos a célvegyület koncentrációjával.

Következtetés

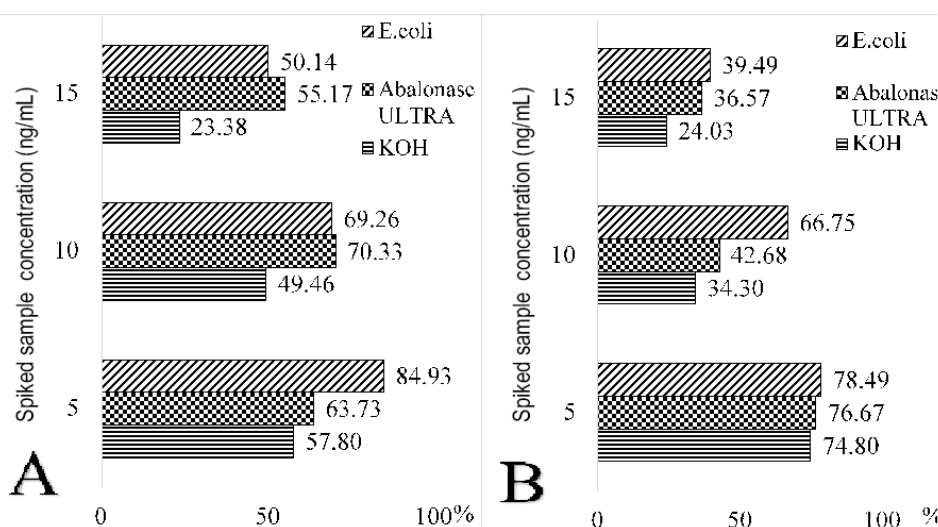
A pHLM és pS9 rendszerek segítségével előállított és optimalizált glükuronid-konjugált szintetikus kannabi-

noid-metabolitok rutin szűrőmódszerbe való beágyazása megkönnyíti a szerfogyasztók észlelését, és csökkenti a fals negatív eredmények számát, biztosítja a szintetikus kannabinoidok megbízhatóbb detektálhatóságát.

A hidrolízismódszerek közül a lúgos hidrolízis bizonyult a leghatékonyabbnak, azonban az extrém kémhatás és erőteljes hőhatás miatt felléphetnek stabilitás problémák, illetve növelheti a mátrixhatást. Emiatt használata nem előnyös rutineljárások során. A két enzim hatékonyságát tekintve az eredmények ellentmondásosak. Ha csak a karbonsav-metabolitok koncentrációjának emelkedését vesszük figyelembe, a β -D-glükuronidáz-IX-A enzim közel kétszeres átlagos koncentrációemelkedést produkált az Abalonase-hoz képest. Ha pedig a glükuronid-kötött metabolitok fogyását szemszögéből vizsgáljuk az enzimek hatékonyságát, az Abalonase jóval kevesebb detektálható glükuronidot hagyott a mintákban, azaz többet bontott el, mint a β -D-glükuronidáz-IX-A. Ezen kívül további kérdések is felvetődnek az enzimek szelektivitását, időbeni aktivitáscsökkenését és inkubációs paramétereit illetően. Mindezek tisztázására további kísérletek szükségesek!

Rövidítések jegyzéke:

- ADB-BUTINACA: N-[(2S)-1-amino-3,3-dimetil-1-oxobután-2-il]-1-butil-1H-indazol-3-karboxamid;
- MDMB-4en-PINACA: metil-(S)-3,3-dimetil-2-(1-(pent-4-en-1-il)-1H-indazol-3-karboxamido)butanoát;
- E. coli: Escherichia coli;



6. ábra. Mátrix hatás ábrázolása. A- MDMB-4en-PINACA-karbonsav esetében; B- ADB-BUTINACA-karbonsav esetében

- pHLM: pooled Human Liver Microsomes – emberi máj mikroszóma frakció;
- pS9: emberi máj mikroszóma homogenizátum, mely már a citoszolt is tartalmazza;
- ESI: elektron spré ionizátor;
- -ks: karbonsav metabolit;
- -glü: glükuronid konjugált forma;
- LC-MS/MS: ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográf – tandemtömegspektrométer;
- LC-MS: tömegspektrometriához alkalmas tisztaságú oldószer / reagens;
- MRM: többszörös termékion követési mód;
- SPE: szilárd fázisú extrakció
- UGT: uridin-5-difosforo-glükuronoziltransferáz (UDP-glükuronoziltransferáz)
- SOD: Szuperoxid-dizmutáz
- Cu/Mg: 8 mM MgCl₂ és 33 mM KCl oldat

Irodalom

(lásd az angol nyelvű cikk végén)