

超高效液相色谱-高分辨质谱联用分析新型毒品 5F-AMB 的体外肝微粒体代谢物及代谢途径

李 静*, 花镇东, 王优美

(公安部禁毒情报技术中心, 北京 100193)

摘要: 本文研究新型毒品 5F-AMB 在体外肝微粒体模型中的代谢物。在体外人肝微粒体孵育模型中加入 5F-AMB 以模拟在人体的代谢过程, 并利用超高效液相色谱高分辨质谱联用技术 (UPLC-HR-MS) 分析代谢发生位点及代谢途径。结果显示, 5F-AMB 在人肝微粒体模型中共产生 9 种代谢物, 其主要代谢途径为酯键水解、酯键水解合并脱氟氧化、酯键水解合并戊烷基链羟化和酯键水解合并吡啶环羟化。以上结果表明该方法简便快捷, 推荐 5F-AMB 的酯键水解、酯键水解合并脱氟氧化、酯键水解合并戊烷基链羟化和酯键水解合并吡啶环羟化代谢物为合适的潜在尿液标志物。

关键词: *N*-(1-甲氧基羰基-2-甲基丙基)-1-(5-氟戊基) 吡啶-3-甲酰胺; 合成大麻素; 高分辨质谱; 肝微粒体; 体外

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 11-1743-05

Analysis of metabolites and metabolic pathway of 5F-AMB *in vitro* using UPLC-HR-MS

LI Jing*, HUA Zhen-dong, WANG You-mei

(National Narcotic Laboratory, Drug Intelligence and Forensic Center of Minister of Public Security, Beijing 100193, China)

Abstract: This study was designed to investigate the metabolites of 5F-AMB by human liver microsomes model *in vitro*. 5F-AMB was added in the reaction mixture to simulate the metabolic process in human hepatocytes *in vivo*, and then to determine the reaction points and pathways of metabolism by ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled to high resolution mass spectrum (HR-MS). 5F-AMB generated 9 metabolites in total in the human liver microsomes model. Ester hydrolysis, combination of ester hydrolysis and oxidative defluorination, combination of ester hydrolysis and hydroxylation on pentyl chain moiety and combination of ester hydrolysis and hydroxylation on indazole ring moiety reactions were its main metabolic pathways. The method is fast and efficient so that the ester hydrolysis, combination of ester hydrolysis and oxidative defluorination, combination of ester hydrolysis and hydroxylation on pentyl chain moiety and combination of ester hydrolysis and hydroxylation on indazole ring moiety metabolites of 5F-AMB can be used as the suitable and potential biomarkers in the urine samples.

Key words: methyl (2S)-2-[[1-(5-fluoropentyl)-1H-indazol-3-yl]formamido]-3-methylbutanoate; synthetic cannabinoids; high resolution mass spectrum; human liver microsomes; *in vitro*

收稿日期: 2017-07-09; 修回日期: 2017-08-08.

基金项目: 国家重点研究与发展计划资助项目 (2016YFC0800903).

*通讯作者 Tel: 86-10-61957099, E-mail: caroline1990717@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0670

新精神活性物质又称为“合法兴奋剂”和“策划药物”, 它可以产生类似列管毒品的麻醉、兴奋和致幻作用。合成大麻素是目前全球滥用最为严重的新精神活性物质, 它可以产生类似天然大麻素的结合

和激动大麻素受体 CB1 和 CB2 的药效, 产生类似于天然大麻素的成瘾性和戒断症状。5F-AMB (图 1) 为吲唑-3-甲酰胺类合成大麻素类新精神活性物质, 是 5F-AB-PINACA 的结构衍生物^[1,2], 早于 2014 年就在日本网上非法贩卖的香草产品中被检出^[3]。相关致死案例报道在脂肪组织和股血中均可检测到 5F-AMB^[4,5], 然而因合成大麻素的广泛代谢性致其母药在尿液中罕见^[6-9], 故尿液中代谢物的鉴定对临床和法庭分析起着至关重要的作用。本研究旨在通过体外人肝微粒体模型模拟人体代谢环境从而确定 5F-AMB 的 I 相代谢物及代谢途径, 以填补国内有关其药理学、毒理学、安全性及代谢相关数据信息的空白, 从而为临床和法庭鉴定的尿液检测提供潜在的标志物。

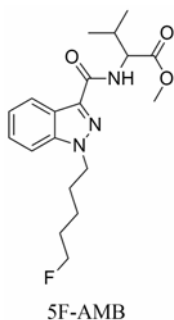


Figure 1 Chemical structure of 5F-AMB

材料与方法

仪器、试剂与材料 待分析物 5F-AMB ($C_{19}H_{26}FN_3O_3$; m/z 363.195 82, 由国家毒品实验室缴获物纯化)。D-葡萄糖-6-磷酸二钠盐合物、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) 钠盐合物和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH) (德国 Sigma Aldrich 公司)。混合男性肝微粒体 (pHLM; 蛋白浓度, 20 $mg \cdot mL^{-1}$, 北京 iPhase 生物科技有限公司)。微粒体送达后于 37 $^{\circ}C$ 解冻、分装、储存于 -80 $^{\circ}C$ 直至使用。

液质级乙腈、甲醇和甲酸 (德国 Merck); 超纯水 (德国 Merck 公司的 Milli-Q Advantage A10 自动蒸馏水机制备)。其他所有试剂和溶剂均为分析纯并未再进一步净化。

色谱及质谱条件 超高压液相色谱系统 (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 RSLC) 串联带有热电喷雾离子化源 (HESI) 的 Q Exactive Plus 质谱 (美国)。色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), 柱温为 35 $^{\circ}C$; 流动相为乙腈 (B)-0.1% (v/v) 甲酸水 (A) 溶液, 梯度洗脱, 流速和程序如下: 0.0~7.0 min, 70% A~40% A;

7.0~7.2 min, 40% A~10% A; 7.2~9.0 min 保持 10% A; 9.0~9.1 min, 10% A~70% A; 9.1~12.0 min 保持 70% A, 流速持续保持在 0.4 $mL \cdot min^{-1}$ 。仪器在使用前进行正离子模式下的质量校准。离子源条件如下: 离子传输毛细管温度, 350 $^{\circ}C$; 辅气加热温度, 350 $^{\circ}C$; 鞘气流速, 35 AUs; 辅气流速, 10 AUs; 喷雾电压, 3.50 kV, S-透镜 RF 水平, 60.0。MS 采用正离子全扫描模式, 并选取特定质荷比的代谢物母离子作为目标物进行二级质谱分析。代谢物的准确分子量通过软件 Thermo MetWorks 1.3 SP4.200 版本计算得出。全扫描数据采集参数设置如下: 分辨率, 70 000; 自动增益控制 (AGC), 1.0×10^6 ; 最大注射时间 (IT), 100 ms; 扫描范围, m/z 70~1050。目标离子的二级参数设置如下: 分辨率, 17 500; 目标物 AGC, 5.0×10^5 ; 最大 IT, 50 ms; 分离窗, m/z 0.6; 正态碰撞能量, 20%、40%、60%。

体外人肝微粒体代谢模型的制备与代谢物分析将 5F-AMB 溶于甲醇制备成 5 $mmol \cdot L^{-1}$ 的溶液, 吸取 1 μL 与新鲜配制的 NADPH 再生系统溶液 (终体积: 200 μL , 由 100 $mmol \cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4), 1.3 $mmol \cdot L^{-1}$ NADP⁺, 3.3 $mmol \cdot L^{-1}$ G-6-P, 0.4 $U \cdot mL^{-1}$ G-6-PDH, 3.3 $mmol \cdot L^{-1}$ Mg²⁺, 1 $mg \cdot mL^{-1}$ 微粒体蛋白组成)。反应由预孵育的再生系统 (3.3 $mmol \cdot L^{-1}$ Mg²⁺, 1.3 $mmol \cdot L^{-1}$ NADP⁺, 3.3 $mmol \cdot L^{-1}$ G-6-P, 0.4 $U \cdot mL^{-1}$ G-6-PDH) 的加入启动, 混合物在 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h。之后, 加入乙腈 200 μL , 并将溶液于 14 000 $\times g$ 离心 10 min。然后吸取 100 μL 上清将其转移入玻璃进样瓶中, 进样量 5 μL 。利用 TF 软件 Xcalibur Qual Browser 4.0.27.10 版本进行系统控制和数据采集。

将空白溶液和未加母药的孵育反应系统溶液作为对照同样进行分析。合成大麻素 5F-AMB 在未加入微粒体的孵育体系中的稳定性研究同样被进行 (37 $^{\circ}C$, 1 h) 以确证代谢物由微粒体的引入而生成。

结果

实验共发现 5F-AMB 的 9 种体外代谢物, 5F-AMB 的保留时间为 8.24 min, 9 种代谢物的保留时间在 3.49~6.29 min 之间, 检测误差均在 2.0 ppm 以内 (图 2, 图 3, 表 1), 分别为烷基链羟化代谢物 1 种 (M1)、酯键水解合并烷基链羟化代谢物 3 种 (M2~M4)、酯键水解合并吲唑环羟化代谢物 1 种 (M5)、酯键水解代谢物 1 种 (M6)、酯键水解合并脱氟氧化代谢物 1 种 (M7)、酯键水解合并脱氟氧化羧化代谢物 1 种 (M8)、脱氟氧化至戊酸代谢物 1 种 (M9)。羟化发生

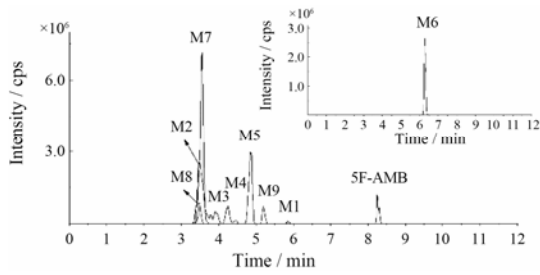


Figure 2 Combined extracted ion chromatograms of 5F-AMB and metabolites (M1–M9) identified in human liver microsomes

在烷基链的代谢物共 4 种 (M1~M4), 发生在吡啶环的代谢物共 1 种 (M5)、发生在戊烷基链的代谢物共计 2 种 (M1、M2)、发生在丁烷基侧链部分的代谢物共计 2 种 (M3、M4)。由羟化代谢发生的位点、数目

及峰面积上来看, 羟化代谢反应优先发生在戊烷基链, 其次是吡啶环, 再次是丁烷基侧链部分, 羟化的目的是使分子极性增大, 更有利于体内通过代谢后排出体外。图 2 为母药 5F-AMB 及其所有代谢物的提取离子峰色谱图。图 3 阐释了所有代谢物的特征碎片离子及碎裂途径。根据提取离子色谱峰的峰面积, 主要代谢物为酯键水解、酯键水解合并脱氟氧化、酯键水解合并戊烷基链羟化和酯键水解合并吡啶环羟化代谢物。表 1 总结了孵育 1 h 后所有代谢物的代谢反应类型、保留时间、母离子的准确质量数 $[M+H]^+$ (m/z)、实际质量数 $[M+H]^+$ (m/z)、质量误差、分子式、离子碎片和峰面积。代谢物被标记为“M”, 代谢反应途径由图 4 所示。

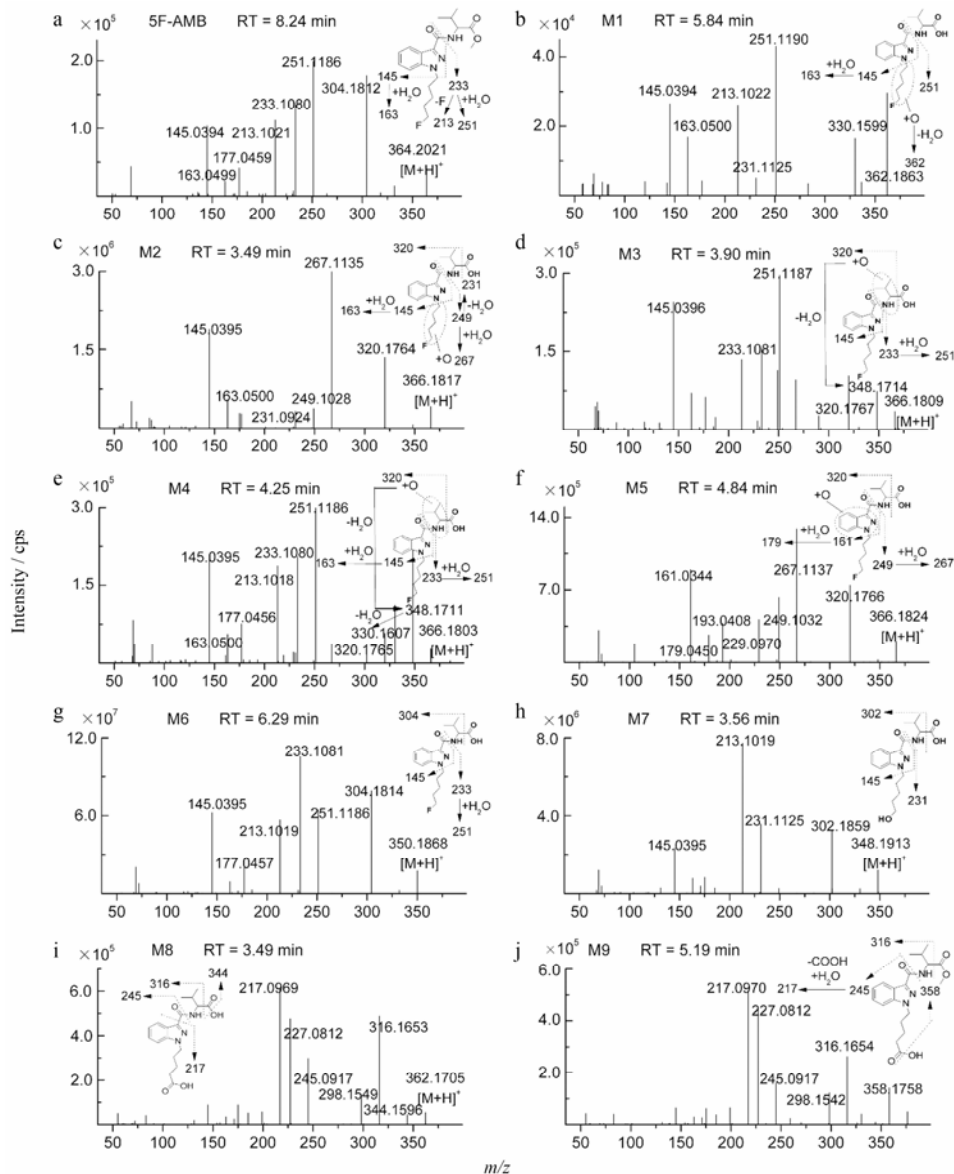


Figure 3 Product ion mass spectra and assigned fragmentation patterns for 5F-AMB (a) and all metabolites (b–j) that were identified after human liver microsomes incubation. Markush bond indicates unassigned metabolic position

Table 1 Identification of 5F-AMB metabolites after 1 h incubation with human liver microsomes. NA: Not applicable

Peak ID	Metabolic reaction	RT /min	Exact mass [M+H] ⁺ (m/z)	Accurate mass [M+H] ⁺ (m/z)	Mass error /ppm	Chemical formula	Fragment ion	Area	Rank
5F-AMB	NA	8.24	364.203 1	364.202 5	-1.7	C ₁₉ H ₂₆ FN ₃ O ₃	251, 304, 233, 213, 145, 177, 163	9.9×10 ⁶	
M1	Hydroxylation (pentyl)	5.84	380.198 0	380.197 9	-0.4	C ₁₉ H ₂₆ FN ₃ O ₄	251, 362, 145, 213, 330, 163	8.5×10 ⁵	9
M2	Ester hydrolysis + hydroxylation (pentyl)	3.49	366.182 4	366.181 7	-1.9	C ₁₈ H ₂₄ FN ₃ O ₄	267, 145, 320	5.7×10 ⁷	3
M3	Ester hydrolysis + hydroxylation (butane moiety)	3.90	366.182 4	366.181 9	-1.3	C ₁₈ H ₂₄ FN ₃ O ₄	251, 145, 233, 348	7.9×10 ⁶	7
M4		4.25	366.182 4	366.181 9	-1.3	C ₁₈ H ₂₄ FN ₃ O ₄	251, 348, 145, 233, 213, 330, 177	1.2×10 ⁷	5
M5	Ester hydrolysis + hydroxylation (indazole)	4.84	366.182 4	366.182 4	0	C ₁₈ H ₂₄ FN ₃ O ₄	267, 161, 320, 249, 229, 193	4.0×10 ⁷	4
M6	ester hydrolysis	6.29	350.187 5	350.186 8	-2.0	C ₁₈ H ₂₄ FN ₃ O ₃	233, 304, 251, 145, 213, 177	3.1×10 ⁹	1
M7	Ester hydrolysis + oxidative defluorination	3.56	348.191 8	348.191 3	-1.4	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₄	213, 302, 231, 145	9.9×10 ⁷	2
M8	Ester hydrolysis + oxidative defluorination + carboxylation	3.49	362.171 1	362.170 5	-1.7	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₅	217, 316, 227, 245	8.6×10 ⁶	6
M9	Oxidative defluorination to pentanoic acid	5.19	376.186 7	376.186 3	-1.1	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₅	217, 227, 316, 245, 358	7.1×10 ⁶	8

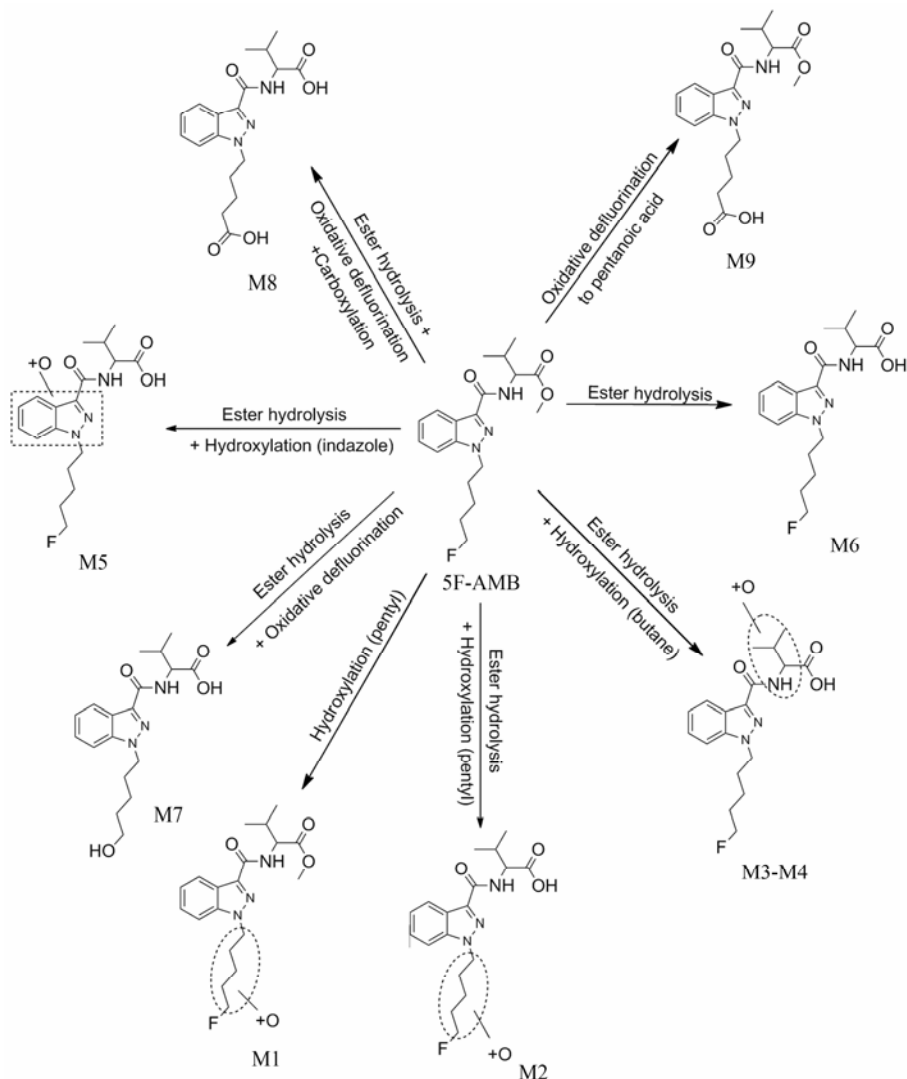


Figure 4 Proposed metabolic pathways of 5F-AMB in human liver microsomes. Unassigned metabolic positions are depicted as Markush structures

讨论

5F-AMB 的代谢稳定性研究结果显示其半衰期短清除率高, 表明其代谢稳定性低, 在体内会被迅速代谢^[10]。从代谢产物的提取离子色谱图峰面积得知, 5F-AMB 以酯键水解、酯键水解合并脱氟氧化、酯键水解合并戊烷基链羟化和酯键水解合并吡啶环羟化代谢物为主, 其中酯水解代谢物 M6 是最主要的代谢产物, 拟下一步制备该代谢物的对照品加以证实。本实验发现孵育时间为 1 h 时, 肝微粒体体外模型生成了未在肝细胞体外模型中发现的 F6 (其对应 M3 前的小峰, 经进一步通过二级质谱确认 M3 前的小峰其质谱碎裂规律同 M2, 故证实羟化位点也发生在了戊烷基链)、F10 及 F15, 但并未发现文献^[10]中报道的结合葡萄糖醛酸的 II 相代谢产物 (F1~F3、F8、F11、F12)。本研究建立了有效的肝微粒体体外代谢模型基质中新型毒品 5F-AMB 代谢物的 LC-MS/MS 检测方法, 并发现了体外实验中肝微粒体和肝细胞代谢模型的差异性。该方法简便快捷, 但仍需进一步收集分析真实尿样并与其中的代谢物加以对比筛查后确定最终代谢标志物, 为临床和法庭案例中滥用此新精神活性物质的检测提供尿液标志物。

References

- [1] Shevyrin V, Melkozerov V, Nevero A, et al. Identification and analytical characteristics of synthetic cannabinoids with an indazole-3-carboxamide structure bearing a *N*-1-methoxycarbonylalkyl group [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 6301–6315.
- [2] Wohlfarth A, Castaneto MS, Zhu M, et al. Pentylindole/pentylindazole synthetic cannabinoids and their 5-fluoro analogs produce different primary metabolites: metabolite profiling for AB-PINACA and 5F-AB-PINACA [J]. *AAPS J*, 2015, 17: 660–677.
- [3] Uchiyama N, Shimokawa Y, Kawamura M, et al. Chemical analysis of a benzofuran derivative, 2-(2-ethylaminopropyl) benzofuran (2-EAPB), eight synthetic cannabinoids, five cathinone derivatives, and five other designer drugs newly detected in illegal products [J]. *Forensic Toxicol*, 2014, 32: 266–281.
- [4] Hasegawa K, Wurita A, Minakata K, et al. Postmortem distribution of AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB, and diphenidine in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case: usefulness of adipose tissue for detection of the drugs in unchanged forms [J]. *Forensic Toxicol*, 2015, 33: 45–53.
- [5] Hess C, Stockhausen S, Kernbach-Wighton G, et al. Death due to diabetic ketoacidosis: induction by the consumption of synthetic cannabinoids? [J]. *Forensic Sci Int*, 2015, 257: e6–11.
- [6] Sobolevsky T, Prasolov I, Rodchenkov G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post administration urine [J]. *Forensic Sci Int*, 2010, 200: 141–147.
- [7] Scheidweiler KB, Jarvis MJ, Huestis MA. Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 883–897.
- [8] Castaneto MS, Wohlfarth A, Pang SK, et al. Identification of AB-FUBINACA metabolites in human hepatocytes and urine using high-resolution mass spectrometry [J]. *Forensic Toxicol*, 2015, 33: 295–310.
- [9] Chimalakonda KC, Seely KA, Bratton SM, et al. Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40: 2174–2184.
- [10] Andersson M, Diao X, Wohlfarth A, et al. Metabolic profiling of new synthetic cannabinoids AMB and 5F-AMB by human hepatocyte and liver microsome incubations and high-resolution mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30: 1067–1078.