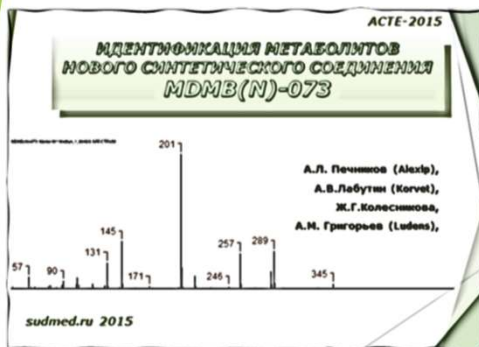


Уважаемые Коллеги!  
Уважаемый Президиум!

В докладе описан практический случай идентификации выделенного из образца мочи нового соединения и его метаболитов, структурно схожих с актуальными синтетическими каннабимиметиками.

2015 год ...



Исследование нового синтетического наркотика –  
метилового эфира алкилиндзола (MDMB(N)-073),  
поиск и идентификация его метаболитов  
методом ВЭЖХ МС/МС

Грибова С.Е. k.k.k., сотрудник, e-mail: s2g8kova@gmail.com  
Калашников В.А. сотрудник, e-mail: v1101197@yandex.ru  
Никитин Е.В. сотрудник, e-mail: nikitn.com@mail.ru

Впервые в нашей стране появление бутил-индазольного карбоксиамида в виде метилового эфира было зафиксировано весной 2015 года в Салехарде и в столичном регионе.

Однако в дальнейшем эти новые психоактивные соединения не получили распространения, но первичная работа по поиску и идентификации метаболитов-маркеров употребления была проведена двумя независимыми группами исследователей методами ГХМС и ВЭЖХ-МСМС. Результаты были доложены и опубликованы в том же году.

Осенью 2019 года в разных регионах начались изъятия новых, неизвестных до сей поры курительных смесей, изучение масс-спектров которых позволило предположить в них наличие аналогичных структур, но уже в виде амидов, и работа была продолжена.



## ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ:

- ▶ Оперативное пополнение библиотеки SUDMED-MS масс-спектрами нового синтетического соединения и его метаболитов-маркеров для целей рутинного ГХ-МС скрининга синтетических каннабимиметиков в моче:
  - а) Получить MS-EI спектры и доказательно идентифицировать новое синтетическое соединение и его метаболиты, выделенные из образца мочи;
  - б) Выделить практически значимые характерные метаболиты-маркеры, позволяющие дифференцировать MMBA(N)-073 от MDMA(N)-073 путем ГХМС исследования недериватизированных нативных экстрактов из мочи по общему ходу СХИ

### ЦЕЛЮЮ РАБОТЫ СТАЛО:

Оперативное пополнение библиотеки SUDMED-MS масс-спектрами нового синтетического соединения и его метаболитов-маркеров для целей рутинного ГХ-МС скрининга синтетических каннабимиметиков в моче:

### ЗАДАЧИ РАБОТЫ:

Получить масс-спектры электронной ионизации и доказательно идентифицировать новое синтетическое соединения и его метаболиты выделенные из образца мочи;

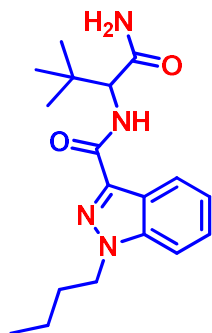
Выделить практически значимые характерные метаболиты-маркеры, позволяющие дифференцировать MMBA(N)-073 от MDMA(N)-073 путем ГХМС исследования недериватизированных нативных экстрактов из мочи по общему ходу СХИ



НОВОЕ СИНТЕТИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ

## ММВА(N)-073

Группа алкилиндазол-3-карбоксамидов, амидов диметилбутановой кислоты  
Позиция списка 1: «2-(1-Бутил-1Н-индазол-3-карбоксамидо)уксусная кислота и ее производные» (П.П. от 12 октября 2015 г. № 1097)



***N*-(1-амино-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)-1-бутил-1Н-индазол-3-карбоксамид**

Синонимы: **ADB-BINACA**  
**ADB-ButINACA**

Брутто формула: **C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>**

Молекулярная масса: **330.2056 Da**

СОБСТВЕННО ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ: НОВОЕ  
СИНТЕТИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ ММВА(N)-073

Группа алкилиндазол-3-карбоксамидов, амидов  
диметилбутановой кислоты

Позиция списка 1: «2-(1-Бутил-1Н-индазол-3-  
карбоксамидо)уксусная кислота и ее производные»

***N*-(1-амино-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)-1-бутил-  
1Н-индазол-3-карбоксамид**

Синонимы: **ADB-BINACA** и **ADB-ButINACA**

Брутто формула: **C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>** Молекулярная масса:  
**330.2056 Da**



## ОБОРУДОВАНИЕ И ПРОБОПОДГОТОВКА

### GC-MS:

- ▶ Хроматограф: **Agilent 7890A**, колонка HP-5MS, 30 м
- ▶ Масс-спектрометр: **Agilent 5975C**, EI
- ▶ 3 мл мочи: PH 7-8 ЖЖЭ ДХМ:ДХЭ:Гептан:Пропанол (1:1:2:0.5)

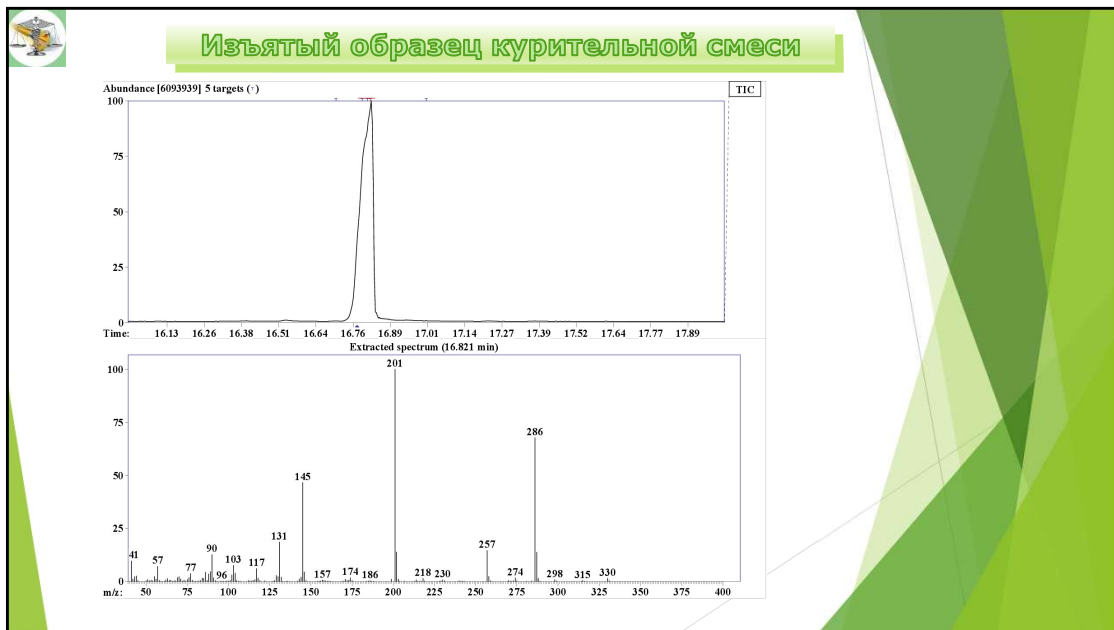
### HPLC-QTOF:

- ▶ Хроматограф: **Agilent 1260 Infinity**, «**Zorbax Eclipse Plus C18**»,
- ▶ Масс-спектрометр: **Agilent 6520 - QTOF, ESI**
- ▶ Экстракт из подкисленной мочи (концентрирование 10:1)
- ▶ Экстракт из ферментативного гидролизата мочи (концентрирование 10:1)

**Эксперимент.** Идентификацию метаболитов выполняли:

- Методом капиллярной высокоэффективной газожидкостной хроматографии - масс-спектрометрии: колонка HP-5MS, моноквадрупольный масс-спектрометр, режим электронной ионизации (EI);
- методом высокоэффективной обращённо-фазовой хроматографии - тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения: колонка «**Zorbax Eclipse Plus C18**», масс-спектрометр тандемный квадруполь-времяпролётный (МСВР), режим электрораспылительной ионизации (ESI).

Исследовались экстракты из подщелоченной и подкисленной мочи, а также экстракт из ферментативного гидролизата.

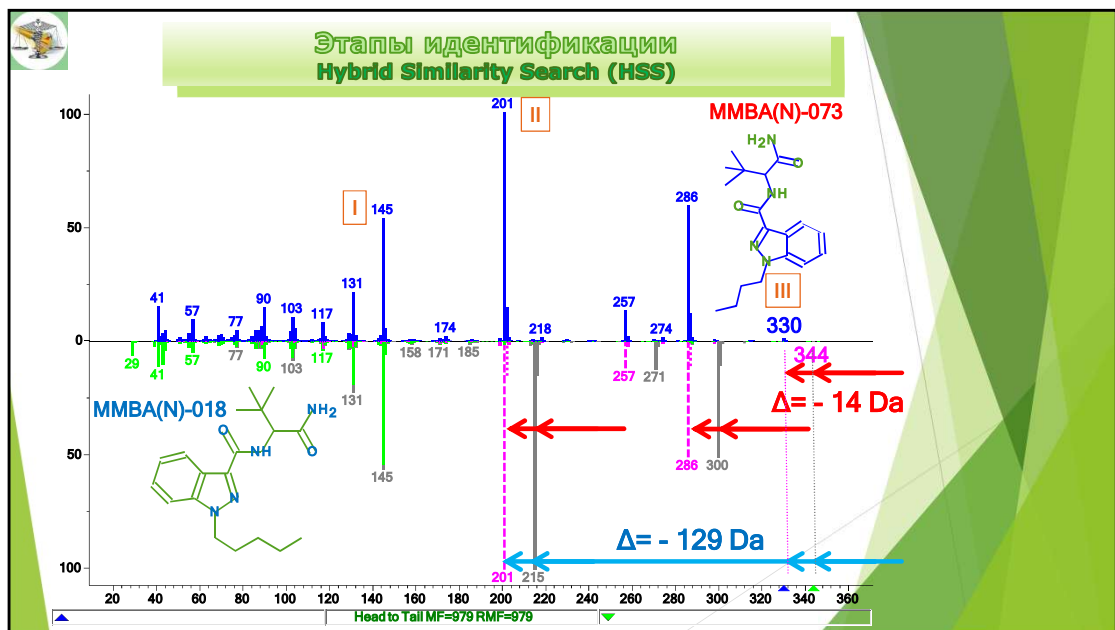


## ФАБУЛА СЛУЧАЯ:

В экспертно-криминалистическом подразделении Курганской области производилось исследование изъятой у гражданина курительной смеси. Было выявлено неидентифицируемое по имеющимся библиотекам соединение.

Хроматограмма и масс-спектр электронной ионизации нативного соединения, выделенного из вещественных доказательств представлен на слайде.

Нами были изучены и проанализированы эти ГХ-МС спектры с целью идентификации структуры нового, неизвестного соединения и выявления его возможных метаболитов.



На этом слайде вы видите этапы идентификации спектра нового неизвестного соединения. Рисунок составлен с помощью нового, мощного средства пакета NIST MS Search – Hybrid Similarity Search (HSS). В нижнем спектре зеленым цветом обозначены совпадающие ионы-фрагменты, пурпурным и серым цветами – различающиеся.

В масс-спектре выделили три характерных группы ионов-фрагментов:

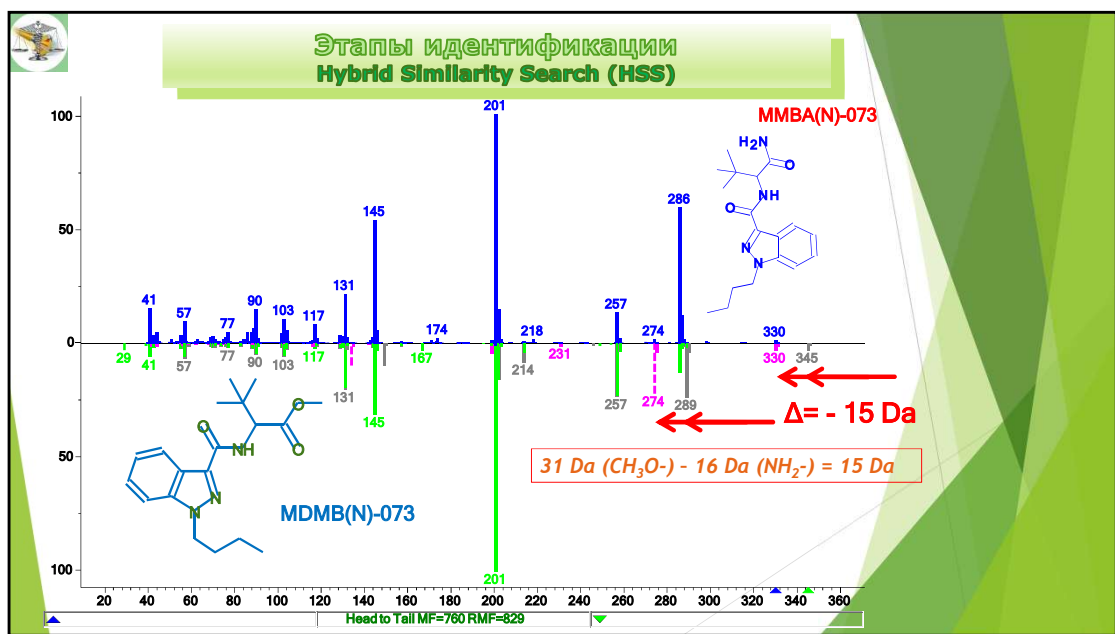
1. Фрагмент-ионы с  $m/z$  131 и 145, характерные для структур содержащих индазол-3-карбонил;
2. Наиболее интенсивные ионы-фрагменты с  $m/z$  201 и 286.
3. Предполагаемый молекулярный ион-радикал с  $m/z$  330; В соответствии с азотным правилом можно было предположить наличие в структуре четного числа атомов азота;

Разность масс между молекулярным ионом-радикалом и наиболее интенсивным ионом-фрагментом с  $m/z$  201 составила 129 Da, что позволило предположить наличие в этой молекуле остатка амида диметилбутановой кислоты. Аналогичное смещение характерно для изученных амидов, например для

ММВА(N)-018, спектр которого на этом слайде использован для сравнения, т.к. он показал большое сходство с изучаемым спектром по алгоритму HSS (MF=979)

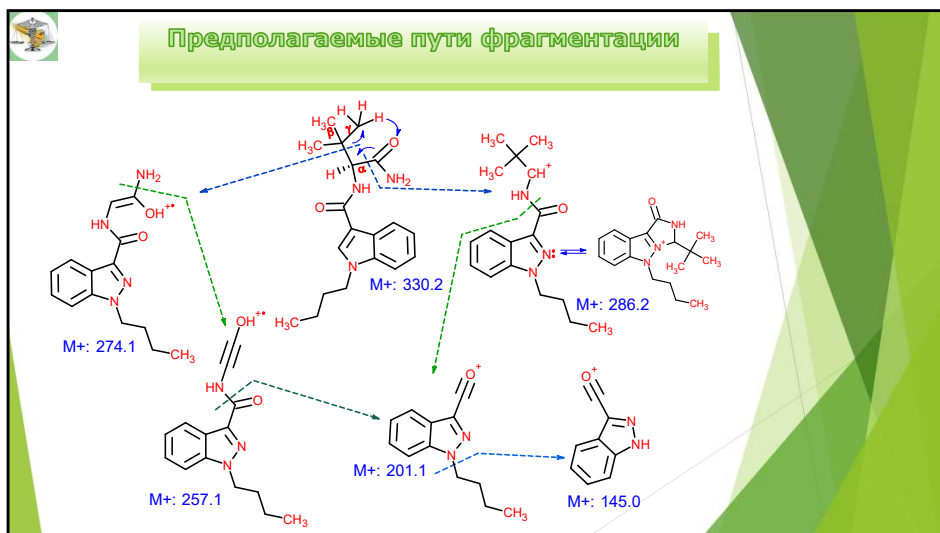
Разность масс между молекулярными ионами-радикалами в спектрах ММВА(N)-018 и спектре неизвестного соединения составила 14 Da, что характерно для потери метиленовой группы. Такое же смещение на 14 Da наблюдается и у других наиболее интенсивных ионов-фрагментов в спектрах.





Изучая спектр неизвестного соединения в сравнении со спектром MDMB (N)-073 отмечали, что разность масс между молекулярными ионами-радикалами в спектрах составила 15 Da, что характерно для замены метокси-группы на аминогруппу ( $31 \text{ Da} - 16 \text{ Da} = 15 \text{ Da}$ ).

Такое же смещение на 15 Да наблюдается и у ионов-фрагментов с  $m/z$  289 и 274, образующихся после потери третбутильного радикала.



Таким образом, в результате анализа масс-спектра, была выдвинута гипотеза, что неизвестное соединение содержит в своем составе остатки:

1. индазол-3-карбонила
2. Амида диметилбутановой кислоты
3. Бутана

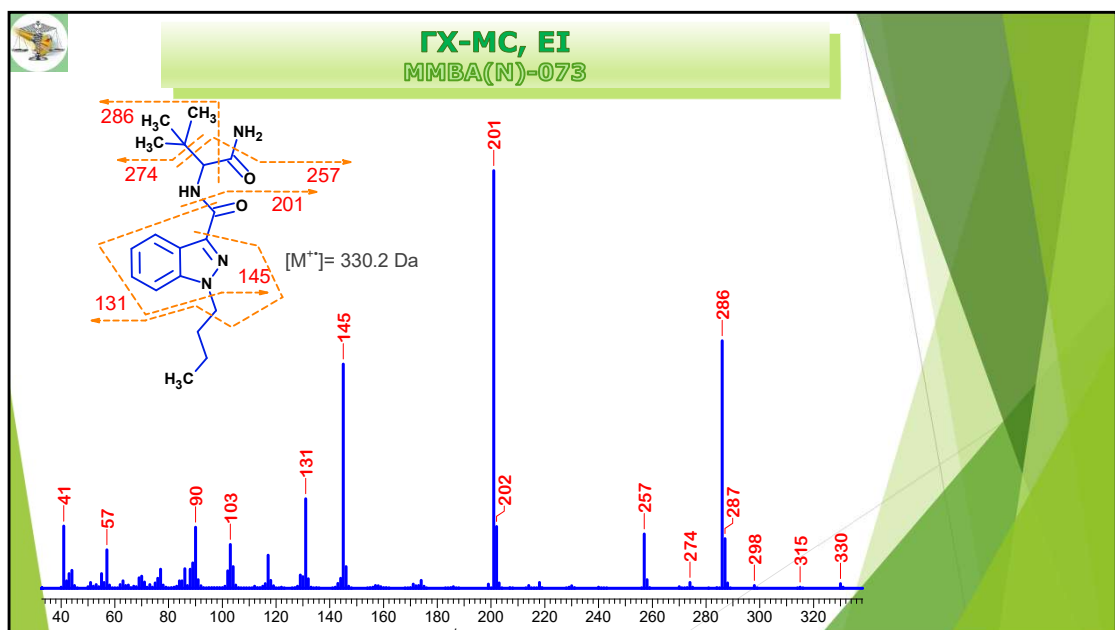
На данном слайде показаны предполагаемые пути фрагментации при ионизации электронным ударом (70 эВ).

Такие же цепочки фрагментаций характерны и для соединений группы индазольных карбоксамидов диметилбутаноатов, и идут по двум альтернативным путям:

1. Потеря третбутильного фрагмента через перегруппировку Мак-Лафферти - переход 330 m/z -> 274 m/z
2. Потеря карбоксамидного фрагмента – переход 330 m/z -> 286 m/z. (Есть гипотеза, что этот фрагмент стабилизируется образованием внутренней связи с неподеленной парой индазольного азота, чем объясняется отсутствие такого фрагмента у индольных структур такого рода).

Дальнейшая цепь последовательных фрагментаций приводит к появлению общего иона-фрагмента с m/z 201, а затем к появлению иона-фрагмента с m/z 145.

Предполагаемая модель фрагментации была проверена с помощью программы MS Interpreter – противоречий не выявлено.



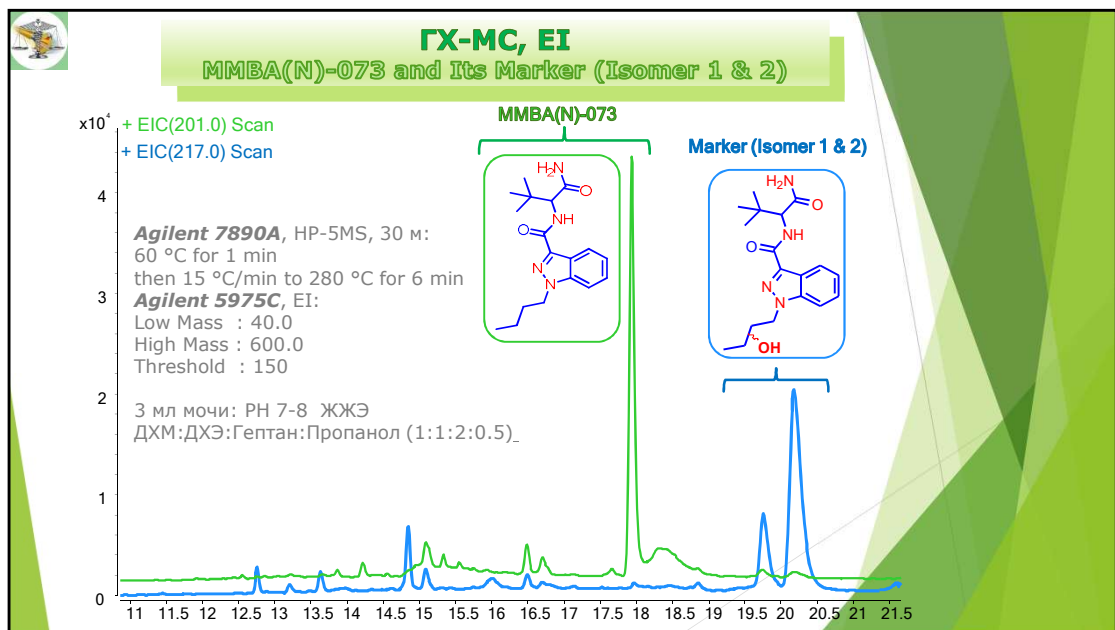
Оценка в совокупности:

- практически полной идентичности спектральной группы ионов-фрагментов, характерной для бутил-индазол-карбонила и характерных смещений от замены метокси-группы на аминогруппу в спектре неизвестного соединения и в спектре MDMB (N)-073,
- а так же характерных смещений на потерю метиленовой группы в спектре неизвестного соединения и в спектре MMBA (N)-018,
- принимая во внимание непротиворечивость модели фрагментации

позволила предположить, что исследуемое соединение является **амидом 2-(1-бутил-1Н-индазол-3-карбоксамида)-3,3-диметилбутановой кислоты (Брутто формула: C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)**.

В соответствии с правилами образования тривиально-систематических наименований каннабимиметиков идентифицированная нативная структура может называться:

- **MMBA(N)-073** или
- **ADB-BINACA** (выходит из употребления) или
- **ADB-ButINACA**



4 сентября 2019 года спектр **MMBA(N)-073** внесен в черновую сборку SUDMED-MS\_2277\_NIGHTLY и стал доступен группе «КОЛЛЕГИ» на сайте sudmed-ms.ru.

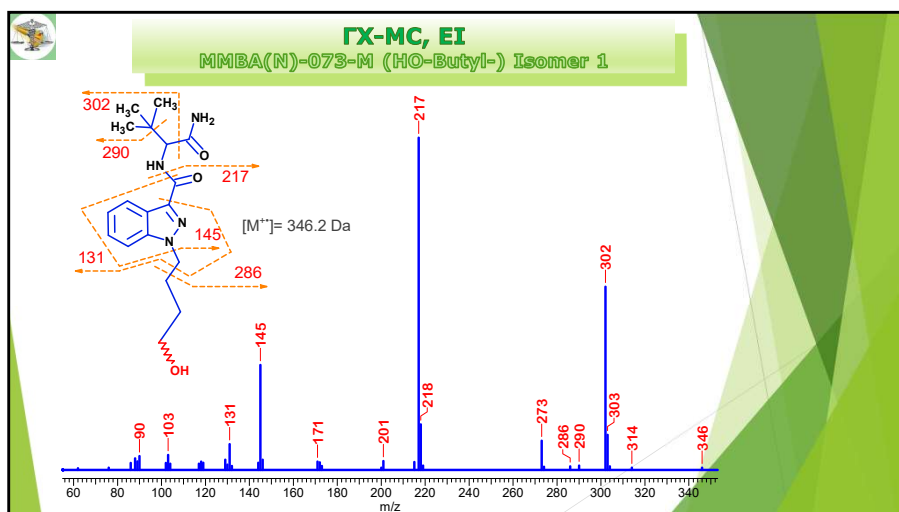
Менее чем через 2 недели, 16 сентября, в Красноярске, на освидетельствование был доставлен молодой человек 1999 г.р. с клиникой опьянения, который употреблял некую субстанцию, которую он и другие освидетельствуемые называли «ТВ» или «ШОКОЛАД».

В ходе ХТИ в гидролизате мочи были идентифицированы известные метаболиты MDMA(N)-073 на основании которых было выдано заключение.

В недериватизированном экстракте из подщелоченной нативной мочи с помощью черновой сборки библиотеки SUDMED-MS\_2277 был идентифицирован нативный MMBA(N)-073 и выявлены пики двух его возможных нативных метаболитов.

В дальнейшем, в сентябре-октябре, еще у двух освидетельствуемых были выявлены эти же метаболиты.

Экстрагированные ионные хроматограммы по фрагментам с m/z 201 и 217 представлены на этом слайде.



На следующем этапе необходимо было выявить и идентифицировать метаболиты нового соединения, которые сохранили амидную группу. Именно это позволит производить дифференциальную идентификацию амидов от метиловых эфиров.

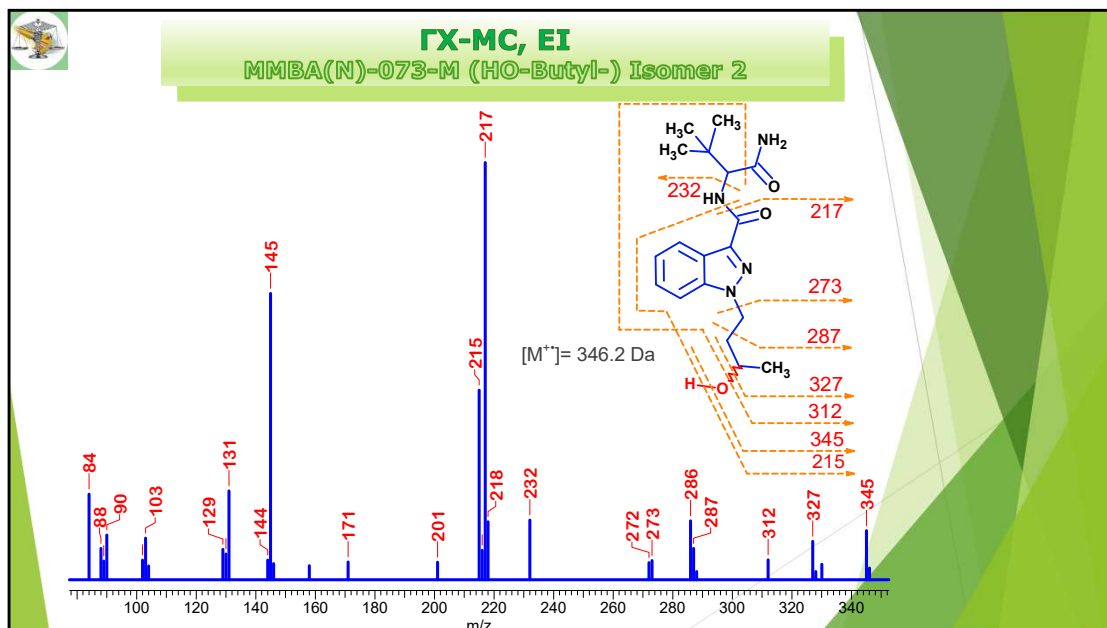
Как известно, основным возможным направлением метаболизма фазы I для алкилиндазольных карбоксамидов амидов бутановой кислоты являются:

1. Окисление N-алкильных цепей с образованием гидроксильированных метаболитов;
2. Гидроксильирование индазольного ядра;
3. Гидролитическое дезаминирование с образованием карбокси-метаболита
4. N-деалкилирование.

Как показал опыт изучения метаболизма амидов гидролитическое дезаминирование не является единственным приоритетным путем биотрансформации. Алкильные цепи так же активно окисляются.

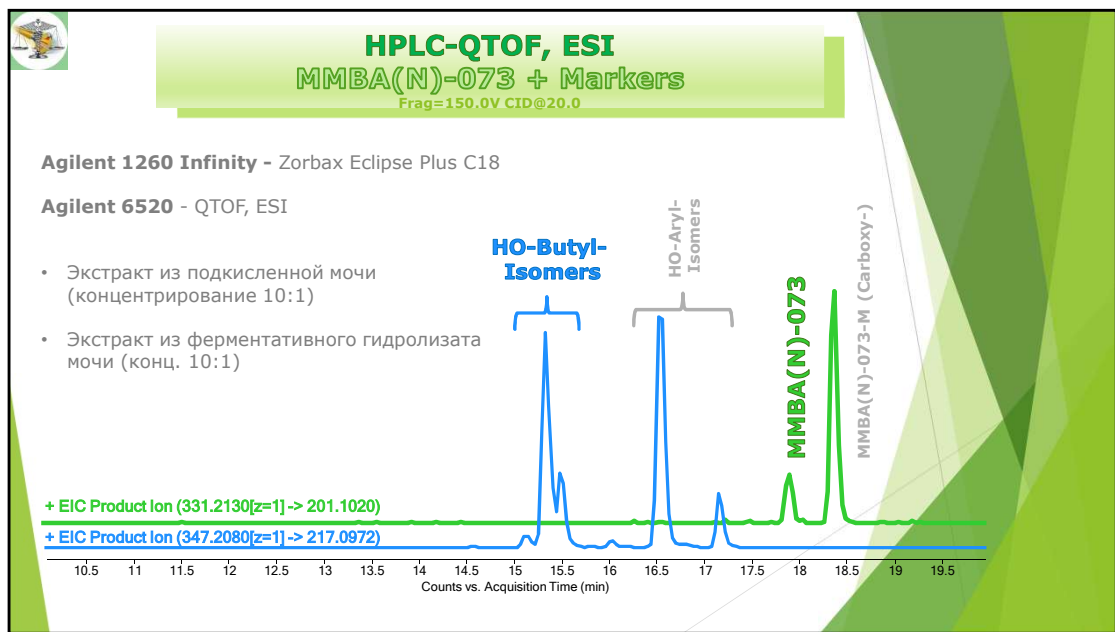
В описываемом случае эта особенность так же проявилась: нами были идентифицированы метаболиты гидроксильированные по N-бутильной цепи MMBA(N)-073, предположительно в положении омега-1 и омега-2 .

Масс-спектры двух изомеров метаболитов и вероятные схемы фрагментации, не противоречащие предполагаемой структуре соединений, изображены на этих слайдах.



Наличие гидроксильной функциональной группы устанавливали на основании анализа фрагментации и анализа спектров дериватов, а ее положение было предположительно установлено исходя из закономерностей зависимости хроматографического удерживания от структуры соединения, рассчитанного с помощью средств NIST MS Search.

Для подтверждения предложенных путей фрагментации предстоит дополнительно провести исследование методом ГХ-МСМС структур ионов-фрагментов.



Третьим этапом наших экспериментов стало проведение исследования экстрактов из мочи и из ферментативного гидролизата методом жидкостной хроматографии.

На этом слайде представлены экстрагированные ионные хроматограммы по переходам

**347.2080 -> 217.0972** для гидроксиметаболитов и по переходам

**331.2130 -> 201.1020** для нативного MMBA(N)-073

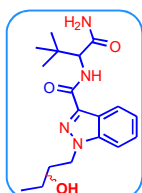
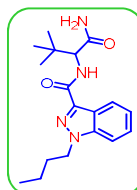
Вы можете видеть на хроматограмме три группы пиков:

1. гидроксильные по N-бутильной цепи метаболиты,
2. гидроксильные в индазольное ядро метаболиты,
3. Натив и карбокси-метаболит.



## HPLC-QTOF, ESI MMBA(N)-073 + HO-Butyl- Isomers

Брутто-формула	Измеренная точная масса, Да	Рассчитанная точная масса, Да	Точность измерения $\Delta m$ [ppm]
$[C_{18}H_{24}N_4O_2+H]^+$	331.2136	331.2129	7.0
$C_{17}H_{24}N_3O^+$	286.1904	286.1919	-1,5
$C_{12}H_{13}N_2O^+$	201.1020	201,1028	0,8
$C_8H_5N_2O^+$	145.0395	145,0396	-0,1



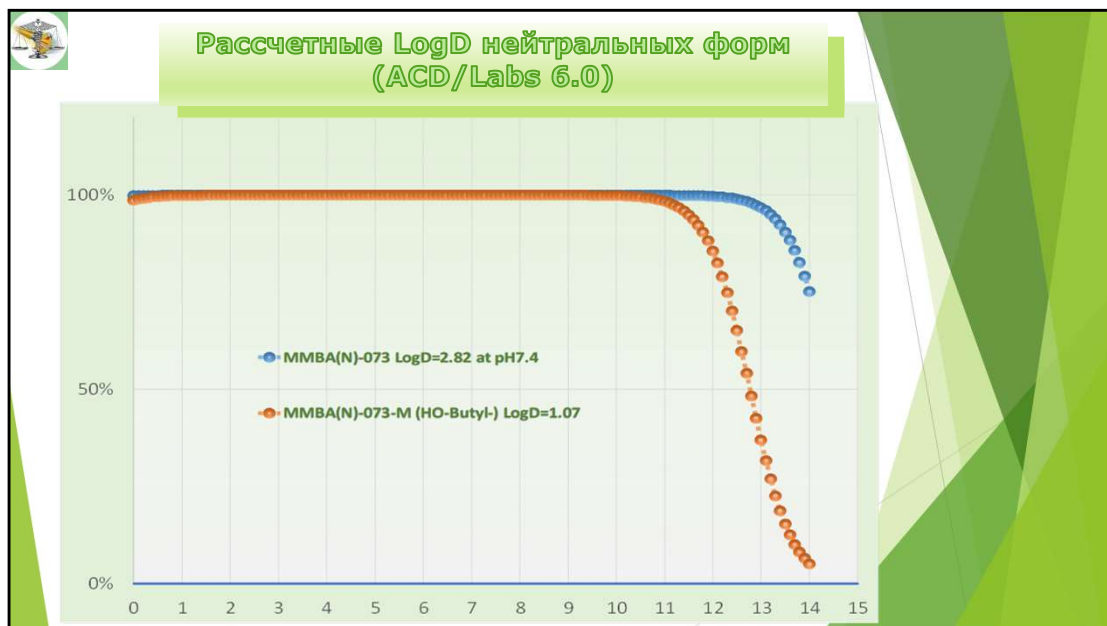
Брутто-формула	Измеренная точная масса, Да	Рассчитанная точная масса, Да	Точность измерения $\Delta m$ [ppm]
$[C_{18}H_{26}N_4O_3+H]^+$	347.2077	347.2078	-0,1
$C_{17}H_{24}N_3O_2^+$	302.1856	302,1863	-0,7
$C_{12}H_{13}N_2O_2^+$	217.0965	217,0972	-0,7
$C_8H_5N_2O^+$	145.0389	145,0396	-7,0

Предложенная структура изомеров 1 и 2 метаболитов нативного MMBA(N)-073 была подтверждена методом жидкостной хроматографии - tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения.

Ошибка измеренной точной массы псевдомолекулярного протонированного иона гидроксилированных метаболитов составила 0,1 ppm, нативного MMBA(N)-073 – 7.0 ppm

Ошибки измеренной точной массы ионов-фрагментов с  $m/z$  145, 201, 217, 302 и 286 составили от 0,1 до 1,5 ppm.





На заключительном этапе с помощью программы ACD/Labs были проведены расчеты logD рассматриваемых соединений и построены профили распределения неионизированных и ионизированных форм в водных растворах при различных значениях pH.

Полученные графики представлены на этом слайде.

Из них вы можете видеть, что нативный MMBA(N)-073 и его N-бутил гидроксिलированные метаболиты могут быть экстрагированы из водных растворов в широком диапазоне pH, что позволяет изолировать их по общему ходу скринингового исследования в щелочной экстракт из нативной мочи.

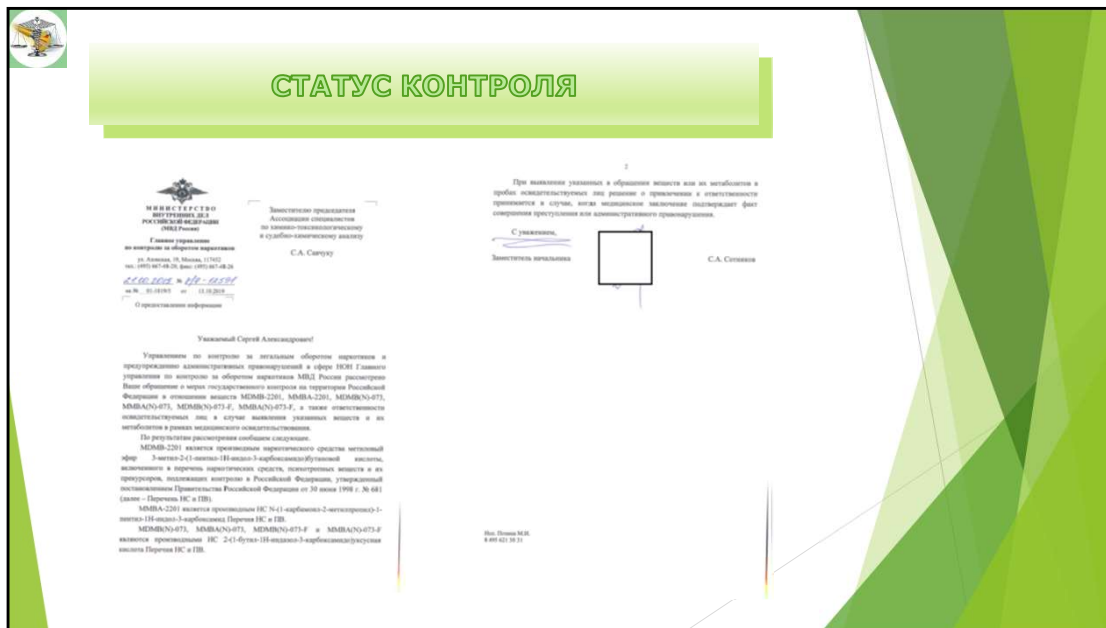


## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ:

- ✓ Новые синтетические соединения, выделенные из образца мочи, идентифицированы как **ММВА(N)-073** и его характерные метаболиты методами **ГХМС** и **HPLC-QTOF**, предложены возможные пути метаболизма и EI-фрагментации;
- ✓ Найдены 2 изомера практически значимого характерного метаболита-маркера, позволяющие дифференцировать ММВА(N)-073 от МДМВ(N)-073 при ГХМС исследовании экстрактов из мочи по общему ходу исследования с положительным ХТЗ;
- ✓ Библиотека **SUDMED MASS SPECTRA** оперативно пополнена масс-спектрами нового синтетического соединения **ММВА(N)-073** и его метаболитов-маркеров

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ:

- ✓ Новые синтетические соединения, выделенные из образца мочи, доказательно идентифицированы как ММВА(N)-073 и его N-бутил гидроксильированные метаболиты методами ГХМС и HPLC-QTOF, предложены возможные пути метаболизма и EI-фрагментации;
- ✓ Найдены 2 изомера практически значимого характерного метаболита-маркера, позволяющие дифференцировать ММВА(N)-073 от МДМВ(N)-073 при ГХМС исследовании недериватизированных экстрактов из нативной мочи по общему ходу исследования с положительным ХТЗ;
- ✓ Библиотека SUDMED MASS SPECTRA оперативно пополнена масс-спектрами нового синтетического соединения ММВА(N)-073 и его метаболитов-маркеров.



## СТАТУС КОНТРОЛЯ

Согласно разъяснениям Главного Управления по контролю за оборотом наркотиков от 21 октября 2019 года МДМВ(Н)-073, ММВА(Н)-073 и их фторпроизводные относятся к Положению списка номер 1: «2-(1-Бутил-1Н-индазол-3- карбоксамидо)уксусная кислота и ее производные», подлежат контролю в Российской Федерации и выявление этих веществ и их метаболитов в пробах освидетельствуемых может служить основанием для привлечения к ответственности.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!