

УДК 543

## ОБНАРУЖЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИНОИДА MDMB-4en-PINACA В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ ЖИДКОСТНОЙ И ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2025 г. И. В. Николаев<sup>a</sup>, А. М. Байкова<sup>a</sup>, Е. Х. Галеева<sup>a</sup>, А. М. Григорьев<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Республиканский наркологический диспансер № 1  
ул. Пушкина, 119, Уфа, 450057 Россия

<sup>b</sup>“27 Научный центр им. Н.Д. Зелинского” Министерства обороны Российской Федерации  
пр-д Энтузиастов, 19, Москва, Россия

\*E-mail: chrzond4250@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.08.2024 г.

После доработки 11.09.2024 г.

Принята к публикации 11.09.2024 г.

MDMB-4en-PINACA относится к новым синтетическим психоактивным соединениям, получившим распространение на территории России, по крайней мере с 2020 г., и обладает высокой активностью по отношению к каннабиноидному рецептору человека CB1. Его отличительной особенностью является присутствие редкого для этой группы соединений N-пентенового остатка. Значительная гидрофобность MDMB-4en-PINACA, как и большинства других синтетических, распространяемых на мировых рынках каннабимиметиков, обуславливает практически полную биотрансформацию исходного соединения и крайне низкое содержание его в моче. Отсюда следует необходимость выявления его метаболитов, обнаружение которых свидетельствовало бы об употреблении MDMB-4en-PINACA. Для решения этой задачи использовали методы газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии, включая высокоэффективную хромато-масс-спектрометрию с квадруполь-времяпролетным детектором и детектором типа трехмерная ионная ловушка, оснащенными источником электрораспылительной ионизации. Выявлен ряд предполагаемых метаболитов MDMB-4en-PINACA в моче человека, идентифицированных как продукты гидролиза, моно- и дигидроксирования, восстановления, образования дигидродиола, карбоксилирования, карбоксилирования с элиминированием метиленовой группы, N-деалкилирования и комбинаций этих процессов. Ряд метаболитов найден в форме глюкуронидов. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Для рутинного химико-токсикологического и судебно-химического анализа мочи методом газовой хромато-масс-спектрометрии оптимальным является поиск продуктов гидролиза, дигидроксирования и образования дигидродиола, в то время как при использовании жидкостной хромато-масс-спектрометрии также рекомендуется обнаружение глюкуронидов продуктов гидролиза и образования дигидродиола.

**Ключевые слова:** MDMB-4en-PINACA, синтетические каннабиноиды, метаболит, моча человека, ЖХ-МС/МС-ВР, ГХ-МС, ионная ловушка.

DOI: 10.31857/S0044450225020099 EDN: aemkmaq

Синтетические каннабиноиды (каннабимиметики, СК) — семейство соединений, фармакологическое действие которых включает активность по отношению к каннабиноидным рецепторам млекопитающих [1]. Ряд членов этого семейства синтезирован в конце прошлого века при исследовании каннабиноидной системы человека. Наблюдения за мировыми рынками наркотических средств позволяют

предположить, что по крайней мере с 2004 г. [2] сделанные наработки реализованы в виде изготовления и продаж новых наркотических средств — курительных смесей (“спайсов”), генерирующих психоактивные эффекты, сходные с действием тетрагидроканнабинола, активного компонента конопли. К настоящему времени СК (вместе с синтетическими катинонами) представляют собой одно из двух наиболее

многочисленных семейств новых психоактивных соединений [3]. Ввиду очевидной социальной опасности и возможного вреда для здоровья [4, 5] оборот большинства известных СК контролируется законодательством стран мира, включая Россию.

Особенности взаимодействия СК с каннабиноидными рецепторами допускают значительное структурное разнообразие лигандов, что позволяет модифицировать структуры продаваемых СК, обходя требования законодательства. По крайней мере с 2017 г. правоохранительные службы ряда стран сообщают об изъятии новых СК, необычной структурной особенностью которых является наличие концевой двойной связи на N-алкильной цепи (рис. 1). Эти соединения можно считать производными СК JWH-022, синтезированного в 1980-х гг. и продемонстрировавшего сравнительно малую аффинность к каннабиноидному рецептору CB1.

Согласно сообщению Европейского центра по наркотикам и наркопотреблению, новый СК MDMB-4en-PINACA (MDMB-PENINACA, метил 3,3-диметил-2-(1-(пент-4-енил)-1*H*-индазол-3-карбоксамидо)бутаноат) обнаружен в продуктах, изъятых полицией в 2017 г. в Германии [6]. В дальнейшем об изъятии MDMB-4en-PINACA сообщили США, Россия и ряд других европейских и азиатских государств [7, 8]. MDMB-4en-PINACA является полным агонистом каннабиноидного рецептора CB1 (константа аффинности  $K_i = 3.26$  нМ) [7], а его действенность (2.47 нМ) и эффективность (239%), измеренные при оценке активации CB1 через взаимодействие его с  $\beta$ -аррестином 2, превышают таковые для известного СК JWH-018 (25.3 нМ и 100% соответственно) [9].

Учитывая значительную молекулярную массу, низкое содержание и возможную температурную лабильность, наилучшим методом

обнаружения СК и их производных в биологических объектах признана жидкостная хромато-масс-спектрометрия, причем объектами анализа в большинстве случаев являются кровь и моча. Кротульский и соавт. [9] сообщают о многочисленных случаях обнаружения неизмененного MDMB-4en-PINACA в образцах посмертной крови и в крови водителей. Действительно, при проведении химико-токсикологических и судебно-химических исследований результаты анализа крови позволяют получить наиболее объективную информацию для вынесения заключений о причинах возможного отравления. Однако как цельная кровь, так и ее препараты (сыворотка или плазма) содержат значительное количество матричных соединений, вносящих затруднения на всех стадиях анализа от подготовки проб до интерпретации результатов. Присутствие аналитических количеств СК в крови в течение небольшого времени снижает возможный временной интервал отбора проб. В отличие от крови, отбор мочи не является инвазивным, а ее биологическая матрица сравнительно бедна, что позволяет значительно упростить пробоподготовку и снизить время проведения анализа. Тем не менее главный недостаток анализа мочи связан с возможностью биотрансформации исходных ксенобиотиков. Ввиду высокой гидрофобности почти все СК, регистрируемые на мировых рынках психоактивных соединений, подвержены экстенсивному метаболизму, приводящему к отсутствию (или малому содержанию) в моче исходного соединения и необходимости вынесения заключений на основании обнаружения биомаркеров — метаболитов [10]. Эта особенность требует проведения структурной идентификации мочевых метаболитов для каждого нового соединения.

Основным направлением метаболизма СК, являющихся метиловыми сложными эфирами,

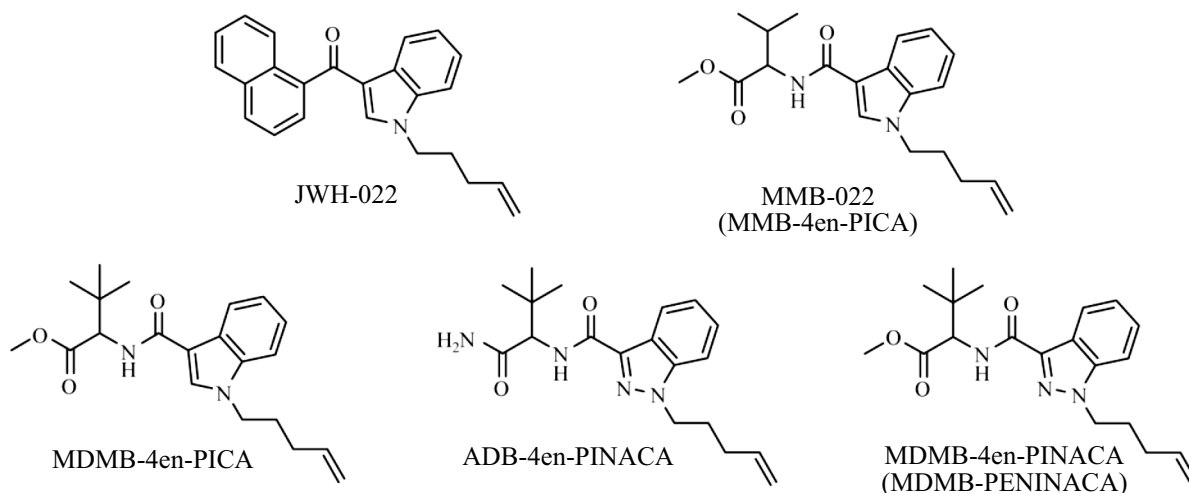


Рис. 1. Структурные формулы N-пентенильных синтетических каннабиноидов.

является гидролиз [11, 12]. Окислительные метаболические модификации исходного соединения преимущественно заключаются в гидроксировании алифатических остатков [13, 14]. Наличие двойной связи вблизи появляющейся гидроксильной группы может затруднять структурную идентификацию ввиду таутомерии и возможностей образования артефактов. Исследование метаболизма СК MMB-022 модельными методами *in vivo* (с использованием крыс) и *in vitro* (ферментация на печеночных микросомах) показали, что существенным направлением окисления боковой N-пентенильной цепи является моно- и полигидроксирование, а также образование дигидродиола [15, 16].

Ряд работ посвящен идентификации метаболитов MDMB-4en-PINACA. Ватанабе и соавт. [17] привели значительный перечень метаболитов, полученных ферментацией исходного соединения на печеночных микросомах и гепатоцитах, но ценность подобных работ ограничена отсутствием прямой корреляции между процессами биотрансформации ксенобиотика и возможностью экскреции образованных метаболитов с мочой. Этого недостатка лишена работа Озтурк и соавт. [18], использовавших для поиска метаболитов человеческую мочу. Однако в этом случае пробоподготовка мочи включала стадию деконъюгирования. Такой подход позволяет несколько повысить чувствительность определения, но значительно увеличивает продолжительность анализа и не дает возможность обнаружить метаболиты фазы II. Авторы работы [19] сосредоточились на анализе волос, в матрице которых возможно обнаружение очень ограниченного числа метаболитов. В публикации Кронстранд и соавт. [20] рассмотрен метаболизм *in vitro* амидного производного MDMB-4en-PINACA (ADB-4en-PINACA), но не приведено сравнение с метаболическим профилем мочи человека.

В настоящей работе учтена необходимость обнаружения мочевых метаболитов MDMB-4en-PINACA в ходе быстрого скринингового анализа методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Для решения задач структурной идентификации метаболитов в образцах человеческой мочи использовали жидкостную хроматографию с двумя типами детекторов: квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения (ЖХ-МС/МС-ВР) и трехмерной ионной ловушкой (ЖХ-МС<sup>n</sup>).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и материалы.** Метанол (HPLC grade) и ацетонитрил (HPLC gradient grade) приобретали у компании Sharlab (Испания), β-глюкуронидазу (тип HP-2), муравьиную кислоту и формиат аммония (HPLC grade) — у компании Merck

(Германия), N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид, содержащий 1% триметилхлорсилана (БСТФА + 1 % ТМХС) — у Acros Organics (Гил, Бельгия). Деионизованную воду (18.2 MΩ) получали с помощью системы очистки Milli-Q Advantage A10 (Merck, Германия). Остальные материалы и реактивы приобретали у компании “Химмед” (Россия).

**ЖХ-МС/МС.** Для жидкостного хромато-масс-спектрометрического анализа образцов мочи применяли две системы. Первая включала жидкостной хроматограф 1260 Infinity с колонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (100 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм), соединенный с тандемным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром 6520 (Agilent Technologies). Элюирование проводили двумя подвижными фазами: А (5 мМ формиата аммония, 0.17 об. % муравьиной кислоты, 1 об. % метанола) и В (метанол) при скорости потока 0.3 мл/мин. Для подтверждения идентификации карбоксильных групп в фазу А вместо муравьиной кислоты добавляли раствор аммиака до pH 8. Масс-спектрометр настраивали в режиме ионизации электрораспылением (ИЭР) при регистрации положительно заряженных ионов и следующих условиях: температура газа-осушителя (азот) 320 °С при потоке 8 л/мин, давление в распылителе (азот) 35 psi, напряжение на капилляре 3000 В, напряжение на фрагменторе 150 В, давление газа для индуцируемой соударениями диссоциации (ДИС) (азот) 23 psi, энергия диссоциации 20 эВ, частота измерений 2 ГГц, непрерывная калибровка шкалы масс по *m/z* протонированных молекул пурина (121.0509) и HP-0921 (гексакис(1Н, 1Н, 3Н-тетрафторпропокси)фосфазин, 922.0098). Примерное содержание аналитов оценивали по площади хроматографических пиков протонированных молекул (ПМ), отображаемых в диапазоне ±5 мДа. Степень глюкуронирования оценивали по отношению площади пика глюкуронида к сумме площадей пиков глюкуронидов и свободных форм. Данную систему использовали для структурной идентификации метаболитов и оценки их содержания. Следует отметить, что площади пиков не отражают действительной концентрации метаболитов в образцах ввиду разной чувствительности. Однако применяемый подход удобен для указания веществ, пригодных для практического обнаружения.

Вторая система состояла из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000RS (Thermo Fisher Scientific, США) и масс-спектрометра AmaZon Speed (трехмерная ионная ловушка, Bruker Daltonics, Германия). Для разделения применяли колонку Acclaim RSLC 120 C18 (100 мм × 2.1 мм, 2.2 мкм, Thermo Fisher Scientific, США) с предколонкой Acquity UPLC BEH C18 Van-Guard precolumn (5 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм, Waters Corporation, Ирландия). Пробы разделяли

**Таблица 1.** Программирование элюирования для ЖХ-МС<sup>n</sup> (№ 1 и 2) и ЖХ-МС/МС-ВР (№ 3)

Параметр	№ 1 (ЖХ-МС <sup>n</sup> )		№ 2 (ЖХ-МС <sup>n</sup> )		№ 3 (ЖХ-МС/МС-ВР)	
	В, %	время, мин	В, %	время, мин	В, %	время, мин
Стадия:						
начальные условия	1	1	1	1	1	2
градиент	99	7	21	3	100	18
	—	—	29	4	—	—
	—	—	64	5	—	—
	—	—	99	2	—	—
Изократический режим	99	1.1	99	2.1	100	2.1
Уравновешивание	1	1.9	1	1.9	1	3.9
Общее время, мин	11		19		26	
Скорость потока, мл/мин	0.5		0.5		0.3	

двумя фазами: А (1 об. % ацетонитрила в воде) и В (1% воды в ацетонитриле) при скорости потока 0.5 мл/мин. Обе фазы содержали 2 мМ формиата аммония и 0.1 об. % муравьиной кислоты. Масс-спектры получали с использованием ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов (UltraScan) при следующих условиях: регистрация спектров МС<sup>1</sup>, МС<sup>2</sup> и МС<sup>3</sup>, температура газа-осушителя (азот) 320 °С при потоке 10 л/мин, давление в распылителе (азот) 29 psi, напряжение на капилляре 4500 В, напряжение на выходе капилляра 140 В, напряжение смещения 500 В. Условия проведения ДИС: газ-мишень гелий, режим фрагментации стандартный, амплитуда напряжения 0.8 В (40–250%), время 40 мс, величина минимальной  $m/z$  – переменная (39 %). Данную систему использовали для подтверждения путей фрагментации и регистрации спектров для последующего рутинного автоматизированного обнаружения.

Для обеих систем температура колонки 40 °С, объем вводимой пробы 5 мкл. Программы элюирования приведены в табл. 1.

**Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС).** Для анализа образцов мочи применяли газовый хромато-масс-спектрометр GCMS-QP2020 с капиллярной колонкой Sh-Rtx-5ms размером 30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм (Shimadzu, Япония). Компоненты пробы элюировали согласно температурной программе: 70 °С (2 мин), увеличение до 290 °С со скоростью 30 °С/мин (задержка 6.67 мин), увеличение до 310 °С со скоростью 30 °С/мин (задержка 3.33 мин). Газ-носитель гелий (1 мл/мин). Температуры инжектора, интерфейса и ионного источника 280, 280 и 200 °С соответственно. Пробу (1 мкл) вводили в режиме без деления потока (splitless). Масс-спектры регистрировали в режиме электронной ионизации (70 эВ) при сканировании

в диапазоне 45–750 Да. Линейные индексы удерживания рассчитывали, пользуясь временами удерживания нормальных углеводородов с четным числом атомов углерода (C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>).

**Образцы мочи.** При проведении химико-токсикологических исследований собрали 23 образца мочи. Все они содержали гидролизованный метаболит MDMB-4en-PINACA (M1.1), обнаруженный при проведении рутинного ГХ-МС-скрининга. Кроме этого, в образцах обнаружили метаболиты СК (число образцов): ADB-BUTINACA (5), 4F-MDMB-BINACA (2), AB-CHMINACA (3), 5F-MDMB-PICA (1), XLR-11 (1); метаболит тетрагидроканнабинола (2); α-пирролидиновалерофенон (α-PVP) и его метаболиты (4); мефедрон и его метаболиты (1).

**Подготовка проб мочи. Без деконъюгирования (для ЖХ).** К образцу мочи (100 мкл) добавили охлажденный ацетонитрил (–20 °С, 500 мкл). Смесь перемешали и охлаждали в течение 10 мин (–20 °С). После центрифугирования отбирали водно-органическую фазу и упаривали ее досуха в токе воздуха при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяли в смеси ацетонитрила и воды (100 мкл, 1 : 1, по объему).

**С деконъюгированием (для ГХ и ЖХ).** К образцу мочи (1 мл) добавляли ацетатный буферный раствор (1 мл, 0.1 М, pH 4.8), β-глюкуронидазу (50 мкл) и инкубировали при 55 °С в течение 2 ч. После охлаждения смесь подкисляли ортофосфорной кислотой до pH 2–2.5 и экстрагировали этилацетатом (2 мл). Органическую фазу упаривали и сухой остаток растворяли в 100 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1, по объему, для ЖХ) или дериватизировали триметилсилилированием (ТМС, для ГХ). Дериватизацию проводили в 100 мкл смесью БСТФА + 1% ТМХС в этилацетате (50 об. % этилацетата) при 60 °С в течение 30 мин.

**Отбор ЖХ-фракций для ГХ-МС.** Обе ЖХ-системы использовали для разделения компонентов мочи на фракции (9–13 шт.), отбираемые в диапазоне удерживания метаболитов. К отобраным фракциям добавляли равный объем воды, ортофосфорную кислоту до pH 2–2.5 и экстрагировали этилацетатом (500 мкл). Органическую фазу упаривали и компоненты сухого остатка дериватизировали триметилсилилированием.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего в моче человека обнаружили 35 метаболитов MDMB-4en-PINACA, причем происхождение одного из них может иметь частично артефактный характер. Ниже рассмотрены только метаболиты с наибольшей относительной площадью пика.

Несмотря на то, что фрагментация ионов в условиях ЖХ-МС/МС-ВР и ЖХ-МС<sup>n</sup> достигается соударениями с нейтральными атомами или молекулами, получаемые спектры различны. Это объясняется резонансным возбуждением ионов-прекурсоров при ЖХ-МС<sup>n</sup>, следствиями которого являются: (1) их выборочная фрагментация и минимизация количества вторичных фрагментных ионов и (2) потери легких ионов-продуктов с массами менее ~1/3 от массы прекурсора [21]. Невозможность регистрации точных масс для МС типа “трехмерная ловушка” (Bruker) затрудняет структурную идентификацию неизвестных ранее соединений. Однако возможность проведения последовательной фрагментации (МС<sup>n</sup>) позволяет использовать эти инструменты для селективного и достоверного обнаружения как известных, так и неизвестных веществ в процессе скринингового анализа биологических образцов [22, 23]. В настоящей работе основной метод структурной идентификации – ЖХ-МС/МС-ВР, и полученные данные использованы для обнаружения метаболитов при ЖХ-МС<sup>n</sup>. Поскольку особенности окисления боковой N-пентенильной цепи не могут быть определены на основании масс-спектров, наличие карбоксильных групп, приобретаемых при биотрансформации исходного соединения, подтверждали по признаку их диссоциации. Последняя приводила к снижению времени удерживания при повышении pH элюента (около 3.5 и 6.8 мин для одной и двух групп соответственно). Предполагаемые структуры выявленных соединений приведены на рис. 2, а их характеристики (включая брутто-формулы, величины  $m/z$  протонированных молекул, отклонения  $m/z$ , времена удерживания при трех хроматографических условиях и индексы удерживания для ГХ-МС) перечислены в табл. 2. Ранг (распределение метаболитов по относительным площадям их

пиков) определяли согласно медианам относительных площадей их пиков для всех образцов. Относительные площади пиков получали нормировкой по сумме площадей гидролизного метаболита M1.1 и его глюкуронида M1.2 для каждого образца мочи.

ЖХ-МС/МС-ВР-спектры основных метаболитов MDMB-4en-PINACA приведены в публикации Озтурк и соавт. [18]. Однако авторы настоящей работы использовали МС типа орбитальная ловушка, а подобное оборудование, в отличие от ГХ-МС и МС типа трехмерная ионная ловушка, мало распространено в лабораториях судебно-химического и химико-токсикологического анализа в России. По этой причине в данной публикации основное внимание уделено обнаружению метаболитов MDMB-4en-PINACA в условиях ЖХ-МС<sup>n</sup> и ГХ-МС.

Фрагментация неизмененного MDMB-4en-PINACA заключается в последовательном распаде боковой цепи в положении 3 индольного цикла (рис. 3). При последовательном элиминировании метанола и СО образуется интенсивный ион с  $m/z$  298, присутствующий в спектре МС<sup>2</sup>. При дальнейшей фрагментации этого иона (МС<sup>3</sup>) происходит разрыв связей между атомом азота и неопентановым остатком или карбонильной группой, что приводит к образованию ионов с  $m/z$  230 и 213 соответственно. Интенсивные ионы с  $m/z$  298 и 213 (или их производные для метаболитов) наиболее удобны для определения вида метаболитических трансформаций исходной молекулы.

**Метаболиты – продукты гидролиза сложного эфира.** Фрагментация базового метаболита этой группы, M1.1, полностью аналогична фрагментации неизмененного MDMB-4en-PINACA, за исключением вида нейтральных потерь (вода вместо метанола). При фрагментации глюкуронированной формы (M1.2) образуется интенсивный ион с  $m/z$  344, соответствующей ПМ свободной формы, причем его спектр (МС<sup>3</sup>) подобен спектру МС<sup>2</sup> для M1.1. Этот путь фрагментации характерен и для других глюкуронидов. Наблюдаемое относительное содержание M1.1 в метаболитических смесях велико (табл. 1 и рис. 4), а степень его глюкуронирования (около 0.2) мала.

Метаболиты M2.1 и M2.2 моногидроксилированы по N-пентенильной цепи. Их спектры почти идентичны, а времена удерживания близки. Это позволяет предположить, что M2.1 и M2.2 являются диастереомерами. Подобно M1.1, при фрагментации ПМ M2.1 и M2.2 теряют воду и СО. Дальнейшая фрагментация протекает так же, как и для M1.1 при образовании ионов с  $m/z$  246 и 229 либо включает дегидратацию при участии приобретенной гидроксильной группы в боковой N-пентенильной цепи и образование иона с  $m/z$  296. Положение гидроксильной группы определяли по наличию иона с  $m/z$  145,

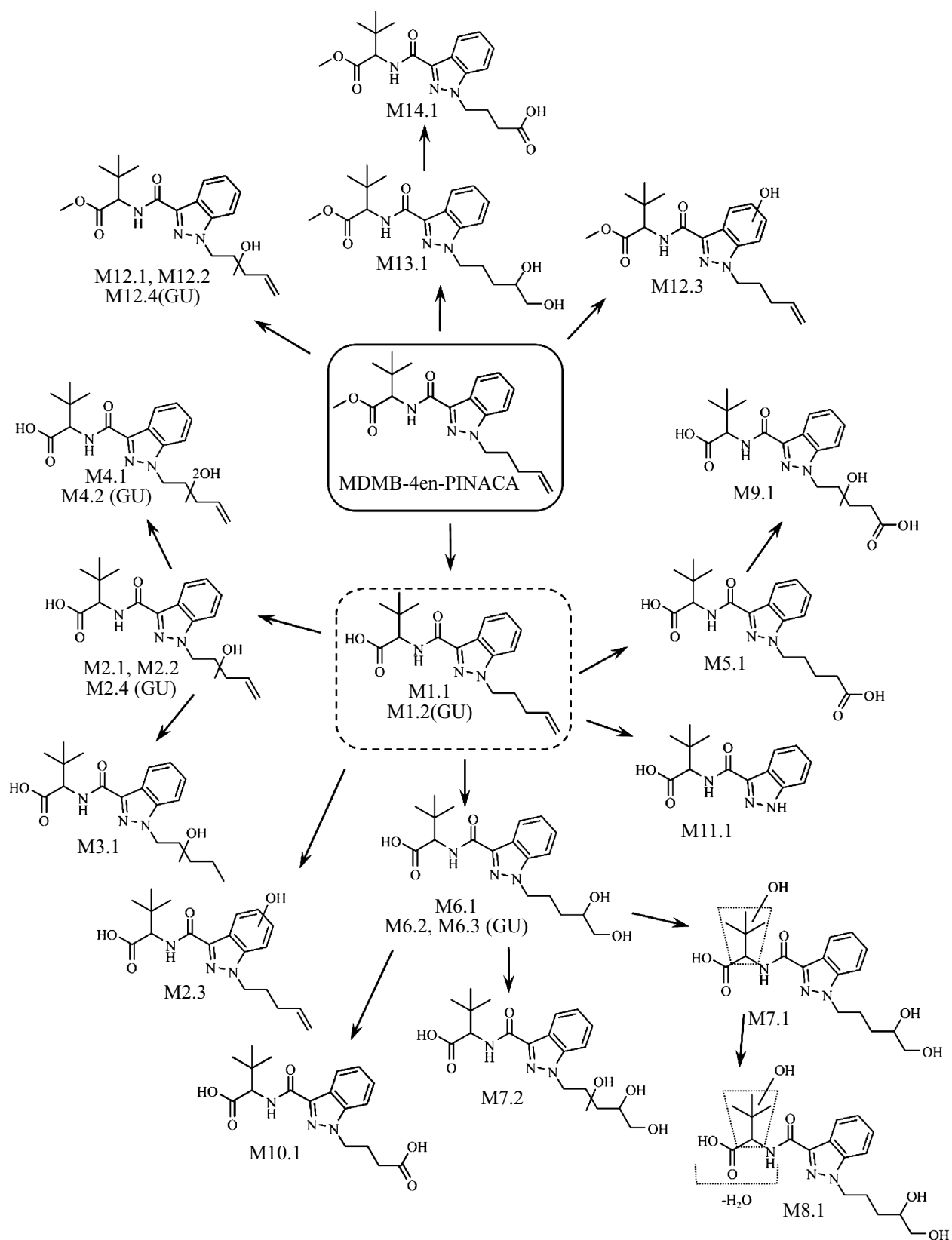


Рис. 2. Предполагаемые структуры и схема образования метаболитов MDMA-4en-PINACA (GU – глюкуронид).

Таблица 2. Характеристики MDMB-4en-PINACA и его метаболитов, найденных в моче

Соединение	Формальный процесс	Брутто-формула	Вычисленная моноизотопная масса, Да	Отклонение массы, ppm	Время удерживания, мин			Ранг	Индекс
					7.31	14.5	19.2		
MDMB-4en-PINACA	—	$C_{20}H_{28}N_3O_3^+$	358.2125	0.2	7.31	14.5	19.2	н.р.*	2665
Продукты гидролиза сложного эфира									
M1.1	—	$C_{19}H_{26}N_3O_3^+$	344.1969	1.8	6.42	13.1	18.4	2	2701
M1.2	Глюкуронирование	$C_{25}H_{34}N_3O_9^+$	520.2290	1.2	5.49	11.5	17.5	5	—
M2.1	Гидроксилирование (пентенил)	$C_{19}H_{26}N_3O_4^+$	360.1918	1.2	5.21	10.7	16.4	6	2870
M2.2	Гидроксилирование (пентенил)	$C_{19}H_{26}N_3O_4^+$	360.1918	0.6	5.26	10.8	16.5	12	—
M2.3	Гидроксилирование (индазол)	$C_{19}H_{26}N_3O_4^+$	360.1918	0.9	5.76	12.0	17.8	н.р.	2929
M2.4	Гидроксилирование + глюкуронирование	$C_{25}H_{34}N_3O_{10}^+$	536.2239	0.6	4.54	9.22	15.4	н.р.	—
M3.1	Гидроксилирование + восстановление	$C_{19}H_{28}N_3O_4^+$	362.2074	1.6	5.32	10.9	16.7	н.р.	—
M4.1	Дигидроксилирование	$C_{19}H_{26}N_3O_5^+$	376.1867	1.6	4.79	9.63	15.3	3	3124
M4.2	Дигидроксилирование + глюкуронирование	$C_{25}H_{34}N_3O_{11}^+$	552.2188	0.9	4.23	7.71	14.2	н.р.	—
M5.1	Карбоксилирование	$C_{19}H_{26}N_3O_5^+$	376.1867	2.4	5.06	10.5	16.1	н.р.	3089
M6.1	Образование дигидродиола	$C_{19}H_{28}N_3O_5^+$	378.2024	1.2	4.52	8.86	15.2	1	3122
M6.2	Образование дигидродиола + глюкуронирование	$C_{25}H_{36}N_3O_{11}^+$	554.2344	0.8	4.04	7.02	14.2	4	—
M6.3	Образование дигидродиола + глюкуронирование	$C_{25}H_{36}N_3O_{11}^+$	554.2344	0.5	4.20	7.68	14.7	11	—
M7.1	Образование дигидродиола + гидроксилирование	$C_{19}H_{28}N_3O_6^+$	394.1973	0.9	3.86	5.88	13	8	3293
M7.2	Образование дигидродиола + гидроксилирование	$C_{19}H_{28}N_3O_6^+$	394.1973	0.2	4.18	7.24	14.4	н.р.	—
M8.1	Образование дигидродиола + дегидрирование	$C_{19}H_{26}N_3O_5^+$	376.1867	1.9	4.38	7.80	13.5	13	—
M9.1	Карбоксилирование + гидроксилирование	$C_{19}H_{26}N_3O_6^+$	392.1816	0.2	4.6	9.22	15.3	10	3187
M10.1	Элиминирование метилена + карбоксилирование	$C_{18}H_{24}N_3O_5^+$	362.1721	1.5	4.89	9.98	15.7	9	2998
M11.1	Депентенилирование	$C_{14}H_{18}N_3O_3^+$	276.1343	0.1	4.76	9.25	15.1	7	2496
Сложные эфиры (метилаты)									
M12.1	Гидроксилирование (пентенил)	$C_{20}H_{28}N_3O_4^+$	374.2074	2.3		12.3	17.2	н.р.	—
M12.2	Гидроксилирование (пентенил)	$C_{20}H_{28}N_3O_4^+$	374.2074	2.3		12.4	17.3	н.р.	—
M12.3	Гидроксилирование (индазол)	$C_{20}H_{28}N_3O_4^+$	374.2074			13.6		н.р.	—
M13.1	Образование дигидродиола	$C_{20}H_{30}N_3O_5^+$	392.2180	4.3	5.15	10.6	16.0	14	—
M14.1	Элиминирование метилена + карбоксилирование	$C_{19}H_{26}N_3O_5^+$	376.1867	1.6	5.61	11.5	16.5	н.р.	—

\*н.р. — ранг более 14.

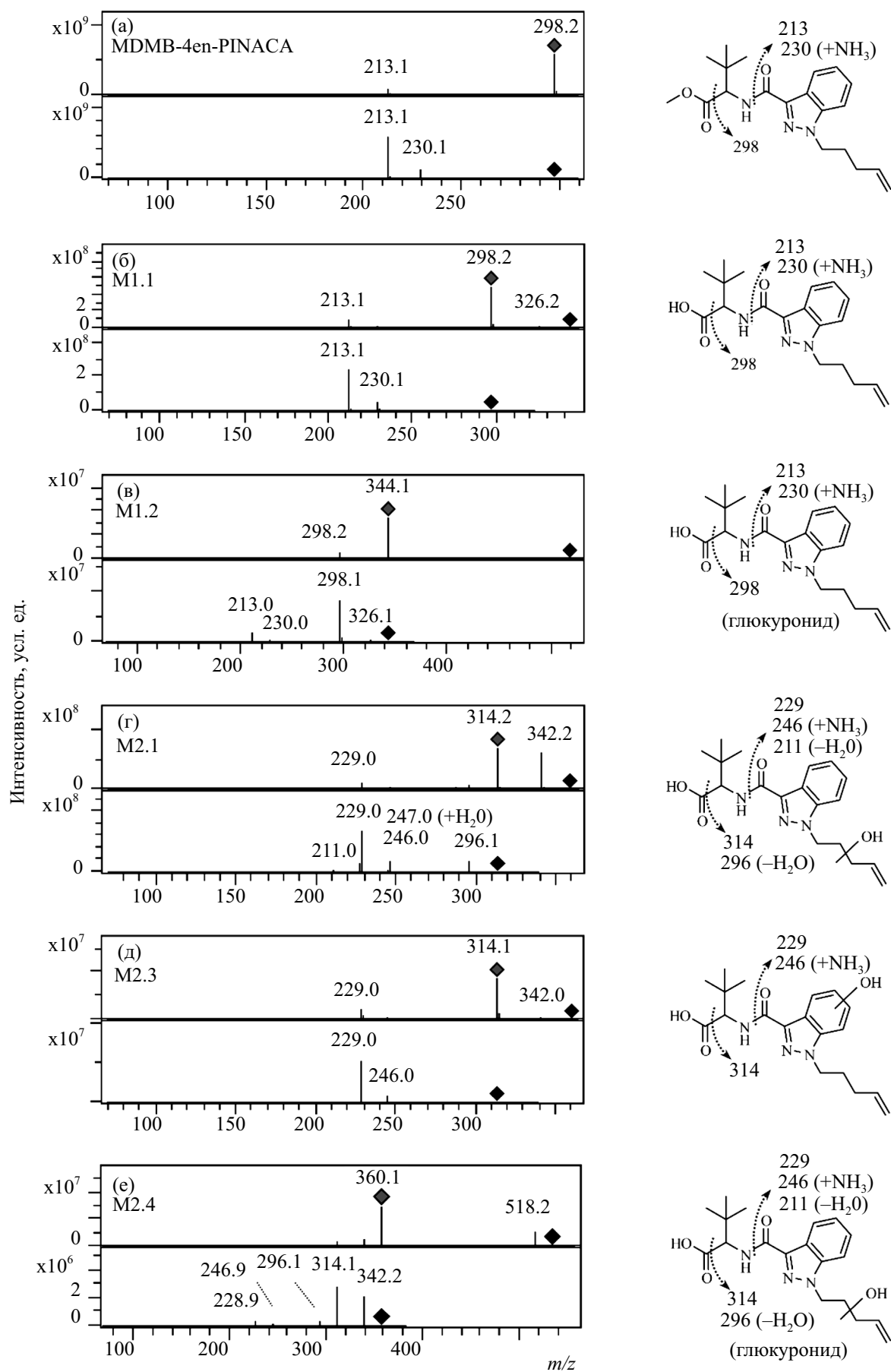


Рис. 3. ЖХ-МС<sup>n</sup>-спектры фрагментных ионов MDMB-4en-PINACA и его метаболитов (MC<sup>2</sup> и MC<sup>3</sup>).



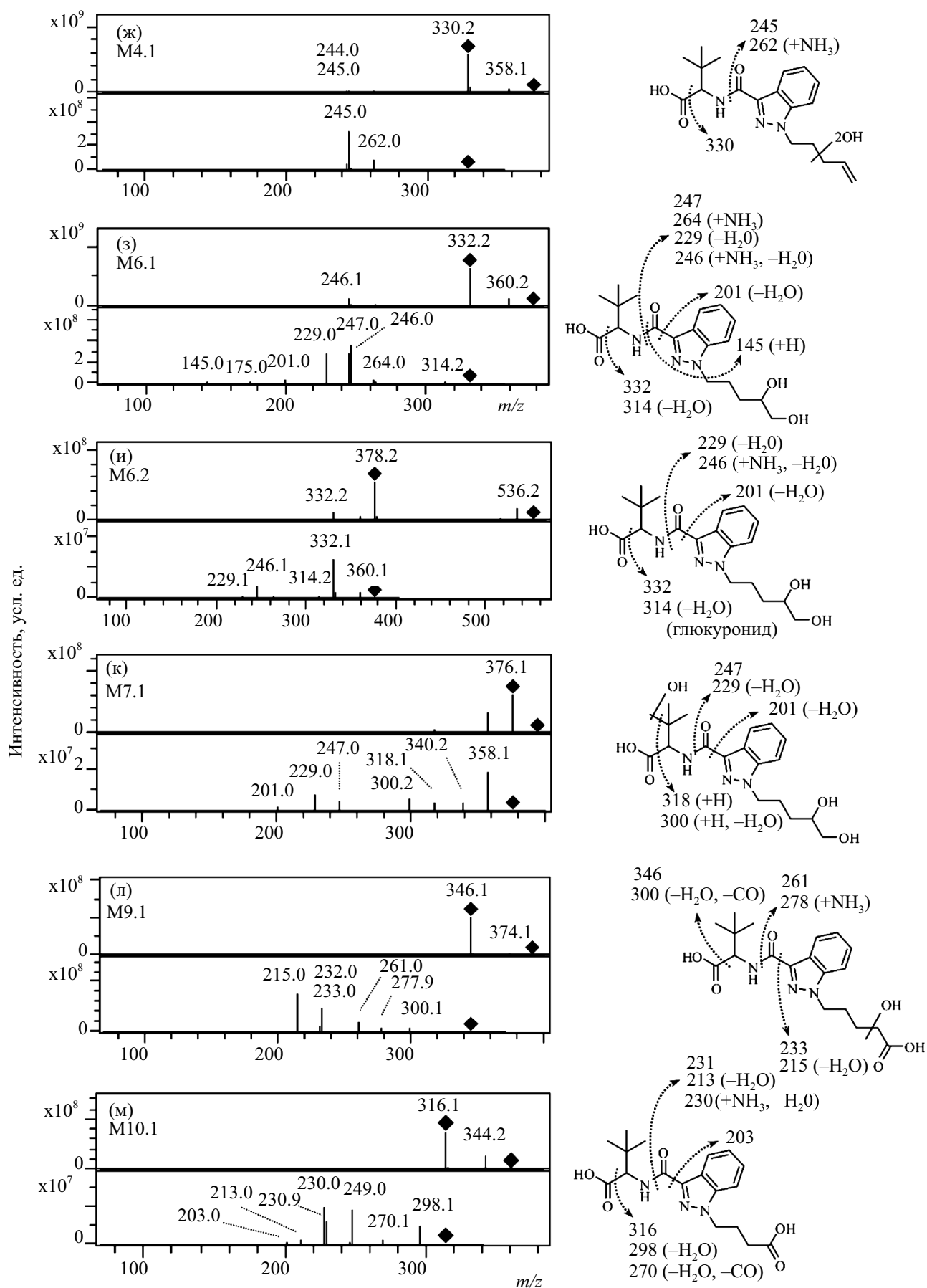
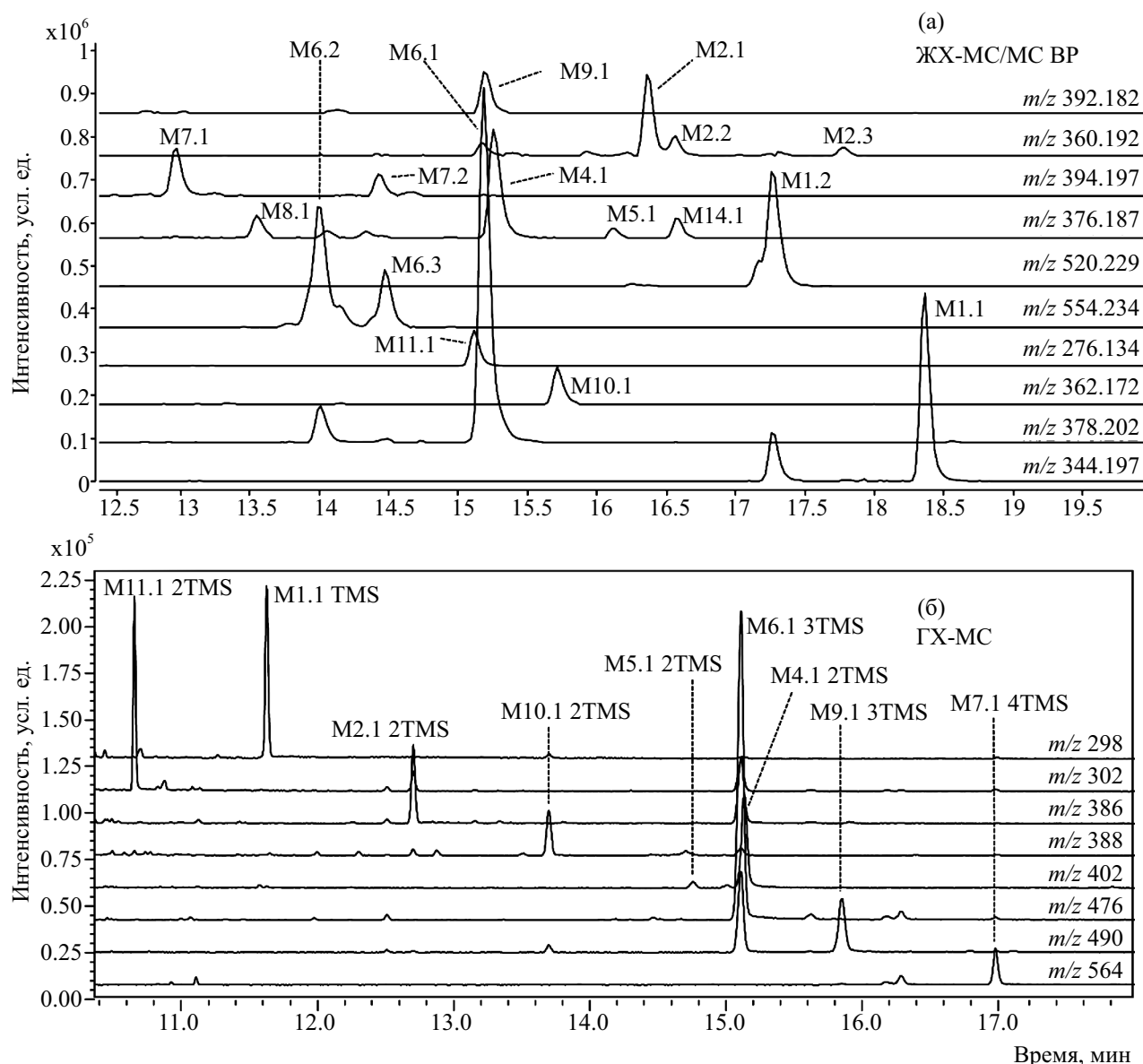


Рис. 3. (Окончание). ЖХ-МС<sup>n</sup>-спектры фрагментных ионов MDMB-4en-PINACA и его метаболитов (MC<sup>2</sup> и MC<sup>3</sup>).



**Рис. 4.** Масс-хроматограммы образца мочи, полученные в условиях (а) ЖХ-МС/МС-ВР и (б) ГХ-МС. Диапазон отображения хроматограмм ЖХ-МС/МС-ВР составляет  $\pm 5$  мДа.

свидетельствующего о наличии неизмененного индазольного цикла, в спектрах ЖХ-МС/МС-ВР и в спектре  $MC^4$  иона с  $m/z$  229 (ЖХ-МС<sup>n</sup>).

В спектре  $MC^3$  метаболита M2.1 (рис. 3г) можно отметить дополнительную особенность фрагментации ионов в условиях ЖХ-МС<sup>n</sup>: возможность образования аддуктов ионов-продуктов и воды; в данном случае это ион с  $m/z$  247, масса которого на 18 Да больше, чем у интенсивного иона с  $m/z$  229. Подобные ионы отсутствовали (или были крайне малоинтенсивны) в спектрах ЖХ-МС/МС-ВР, но были воспроизводимы по относительной интенсивности в спектрах ЖХ-МС<sup>n</sup>. У третьего моногидроксилированного метаболита M2.3 гидроксильная группа расположена в индазольном цикле, что определили по наличию иона с  $m/z$  161 (гидроксилированный катион

индазол-ацилиума) в спектрах ЖХ-МС/МС-ВР и в спектре  $MC^4$  иона с  $m/z$  229 (ЖХ-МС<sup>n</sup>). За исключением малой относительной интенсивности дегидратного иона с  $m/z$  342, иные признаки гидроксилирования индазольного цикла (вместо N-пентенильной цепи) в спектре M2.3 отсутствуют, хотя косвенным свидетельством можно считать большое время удерживания M2.3. В спектре  $MC^2$  глюкуронированного метаболита M2.4 присутствует интенсивный пик иона с  $m/z$  360, спектр которого соответствует спектру  $MC^2$  свободных форм M2.1 или M2.2. За исключением метаболита M2.1 (ранг 6), относительное содержание моногидроксилированных метаболитов невелико.

Метаболит M3.1 идентифицировали как продукт восстановления двойной связи и гидроксилирования N-пентенильной цепи, что следует

из наличия ионов с  $m/z$  316 и 231 в спектрах МС<sup>2</sup> и МС<sup>3</sup> соответственно. Относительное содержание М3.1 оценили как следовое.

Согласно  $m/z$  ПМ в молекуле метаболита М4.1 присутствуют два дополнительных атома кислорода. Этот метаболит не упоминается в публикации [18], хотя наши результаты указывают на его значительное относительное содержание (ранг 3). Наличие ионов с  $m/z$  145 и 101 в ЖХ-МС/МС-ВР-спектре М4.1 (рис. 5) прямо указывают на то, что оба атома кислорода находятся в N-пентенильной цепи, а изменение времени удерживания при изменении pH — на то, что они не включены в карбоксильную группу. Относительное содержание метаболита М4.2, являющегося глюкуронидом М4.1, очень мало.

Метаболит М5.1, являющийся молекулярным изобаром М4.1, идентифицировали как дикарбоновую кислоту. Основным отличием его путей фрагментации от М4.1 в условиях как ЖХ-МС/МС-ВР-, так и ЖХ-МС<sup>n</sup>-спектров можно считать дополнительную дегидратацию (ионы с  $m/z$  312 и 227) и разрыв связи между карбонильной группой и индазольным циклом (ион с  $m/z$  217). Глюкуронид метаболита М5.1 не обнаружили.

Относительная площадь пика метаболита М6.1 оказалась наибольшей почти во всех (кроме одного) образцах мочи. ПМ метаболита М6.1 имеет два дополнительных атома кислорода и два атома водорода по сравнению с М1.1, причем все они находятся в боковой N-пентенильной цепи. На это указывает существование ионов 332, 247 и 145 в спектрах ЖХ-МС<sup>n</sup> и ЖХ-МС/МС-ВР. При фрагментации ПМ метаболита М6.1 наблюдается двукратная дегидратация, приводящая к появлению ионов с  $m/z$  360 и 229. Образование подобных соединений

связано с эпексидированием двойной связи и последующим гидролизом [24], и об обнаружении подобного соединения в метаболическом профиле ММВ-022 у крыс сообщалось в нашей работе [15]. Дигидродиол М6.1 глюкуронирован в малой степени (~0.2). Спектр иона с  $m/z$  378, образованного элиминированием остатка глюкуроновой кислоты при фрагментации глюкуронированного метаболита М6.2 (рис. 3и), идентичен спектру свободной формы М6.1.

Дигидродиол М6.1 подвержен дополнительному гидроксильрованию по *трет*-лейциновому остатку с образованием метаболита М7.1 и по N-пентандиольной цепи (М7.2). При фрагментации ПМ М7.1 последовательно теряет три молекулы воды (ионы с  $m/z$  376, 358 и 340), причем две из них образуются при дегидратации *трет*-лейцинового и N-пентандиольного остатков. Признаком гидроксильрования *трет*-лейцинового остатка является элиминирование метанола и CO<sub>2</sub>, приводящее к образованию иона с  $m/z$  318. Этот ион и продукты его дальнейшей фрагментации, содержащие N-пентандиольный остаток, подвержены дегидратации ( $m/z$  318→300 и  $m/z$  247→229). Фрагментация метаболита М7.2, гидроксильрованного по N-пентандиольному остатку, подобна М6.1.

Удерживание метаболита М8.1, также являющегося дигидродиолом, не зависит от кислотности элюента, что свидетельствует об отсутствии карбоксильных групп. Такая структурная особенность позволяет предположить, что М8.1 является продуктом внутримолекулярной дегидратации и циклизации М7.1 по гидроксильрованному *трет*-лейциновому остатку с образованием лактона. Дополнительным подтверждением этого процесса служит

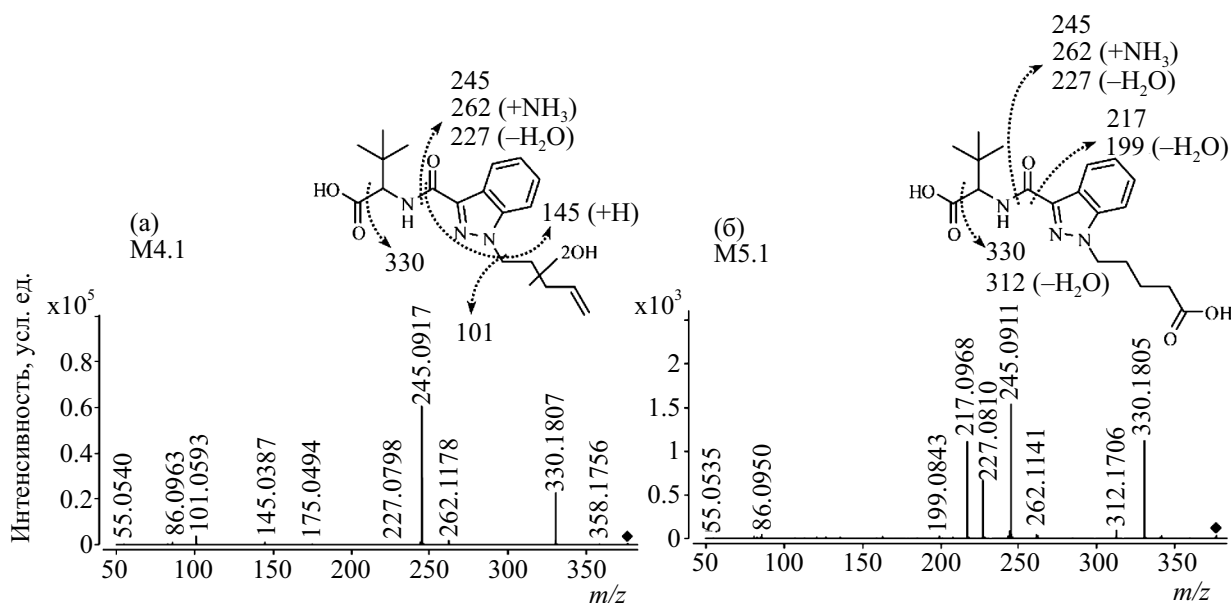


Рис. 5. ЖХ-МС/МС-ВР-спектры ионов-продуктов метаболитов — молекулярных изобаров (а) М4.1 и (б) М5.1.

существование иона с  $m/z$  113 ( $C_6H_9O_2^+$ ), соответствующего лактонному циклу в ЖХ-МС/МС-ВР-спектре метаболита М8.1. В спектрах ЖХ-МС<sup>n</sup> этот ион отсутствует вследствие малой массы. Относительное содержание метаболита М8.1 невелико (ранг 13), а происхождение, по-видимому, имеет частично артефактный характер. На это указывает увеличение относительного содержания М8.1 и снижение содержания его прекурсора (М7.1) при пробоподготовке, включающей экстракцию и упаривание [15].

Хроматографическое удерживание метаболита М9.1, имеющего три дополнительных атома кислорода по сравнению с М1.1, значительно снижается при увеличении рН элюента, что позволяет уверенно идентифицировать его как дикарбоновую кислоту. Третий атом кислорода также находится в боковой N-пентанкарбоновой цепи, что подтверждается наличием иона с  $m/z$  261, указывающего на присутствие трех атомов кислорода в N-пентениндазольном остатке и иона с  $m/z$  145 в спектре ЖХ-МС/МС-ВР, что соответствует неизменному индазольному циклу.

Метаболит М10.1 имеет укороченную (4 атома углерода) цепь в положении 1 индазольного цикла. Можно предположить, что его происхождение связано с окислением дигидродиола до карбоновой кислоты с последующим декарбоксилированием и дополнительным окислением. Фрагментация М10.1 подобна старшему гомологу М5.1.

N-деалкилированный метаболит М11.1 наименее специфичен вследствие потери значительной части структуры и связанной с этим возможности происхождения от разных СК. Его фрагментация заключается в основном в потере молекул воды и СО с последующим разрывом связей атома азота в боковой цепи.

**Метаболиты – сложные эфиры.** Обнаружение метаболитов, не прошедших стадию гидролиза и сохранивших структуру сложного эфира, позволяет делать уточненные заключения о виде принятого СК. К сожалению, их содержание в моче, как правило, очень невелико из-за интенсивного внепеченочного гидролиза. Общей особенностью фрагментации является элиминирование метанола и СО от ПМ.

Моногидроксилированные метаболиты, в структурах которых гидроксильная группа находится в N-пентенильной цепи (М12.1, М12.2) и в индазольном цикле (М12.3), обнаружены только после ферментативного деконъюгирования. Их фрагментация подобна гидролизованному моногидроксилированному метаболитам. Глюкуронид продуктов гидроксилирования N-пентенильной цепи присутствовал в некоторых образцах мочи в следовых концентрациях.

Фрагментация метаболита М13.1, идентифицированного как дигидродиол, подобна гидролизованному дигидродиолу М6.1. Относительная площадь пика М13.1 (ранг 13) оказалась наибольшей в группе сложных эфиров. Фрагментация метаболита с укороченной боковой цепью (М14.1) не отличается от его гидролизного производного М10.1 при учете сложноэфирной структуры.

**ГХ-МС метаболитов MDMB-4en-PINACA.** ГХ-МС идентификацию метаболитов MDMB-4en-PINACA проводили с помощью отбора ЖХ-фракций, получаемых в обеих хроматографических системах. Фрагментация неизменного MDMB-4en-PINACA и метаболита М1.1 (ТМС) сравнительно проста и подобна фрагментации других СК семейства алкилиндазолкарбоксамидов (рис. 6). Она заключается в основном в разрыве связей атома азота в боковой цепи в положении 3 индазольного цикла (ионы с  $m/z$  298 и 213), между карбонильной группой и индазольным циклом ( $m/z$  185) и элиминировании метилпропена ( $m/z$  301 и 359 для исходного соединения и М1.1 соответственно). Пик иона с  $m/z$  145, образующегося при разрыве амидной связи и элиминировании N-пентенильной цепи, обладает средней интенсивностью в спектре MDMB-4en-PINACA, однако малоинтенсивен в спектрах большинства метаболитов.

Фрагментация моногидроксилированного метаболита М2.1 (2ТМС) подобна М1.1 (ТМС), а в его спектре присутствуют интенсивные пики ионов с  $m/z$  386 и 301, отличающиеся от соответствующих ионов спектра М1.1 (ТМС) на 88 Да – добавка, принадлежащая гидроксильной группе (ТМС). Для метаболита М4.1 (2ТМС), имеющего два дополнительных атома кислорода в N-пентенильной цепи и интенсивные пики ионов с  $m/z$  402 и 317 в спектре, добавка равна 104, и ее составляют гидроксильная группа (ТМС) и атом кислорода. Это позволяет предположить, что второй атом кислорода образует кетогруппу, а метаболит М4.1 является продуктом окисления дигидродиола М6.1.

Хроматографический пик метаболита М6.1 (3ТМС) преобладает среди пиков остальных выявленных метаболитов при регистрации в общем ионном токе. Основные пути фрагментации М6.1 те же, что и для рассмотренных метаболитов. Ионы с  $m/z$  476 и 391 в его спектре соответствуют добавке 178 Да, которую составляют две гидроксильные группы (ТМС) и два атома водорода. Спектр М6.1 сложен из-за присутствия ионов, образованных элиминированием триметилсиланола (потеря 90 Да, ионы с  $m/z$  386, 301, 273) и метокситриметилсилана (потеря 104 Да, ионы с  $m/z$  372, 287, 259) от N-пентилдиольной цепи (2ТМС). Признаков термолиза дигидродиола М6.1 (3ТМС) в применяемых условиях ГХ-МС не обнаружили.

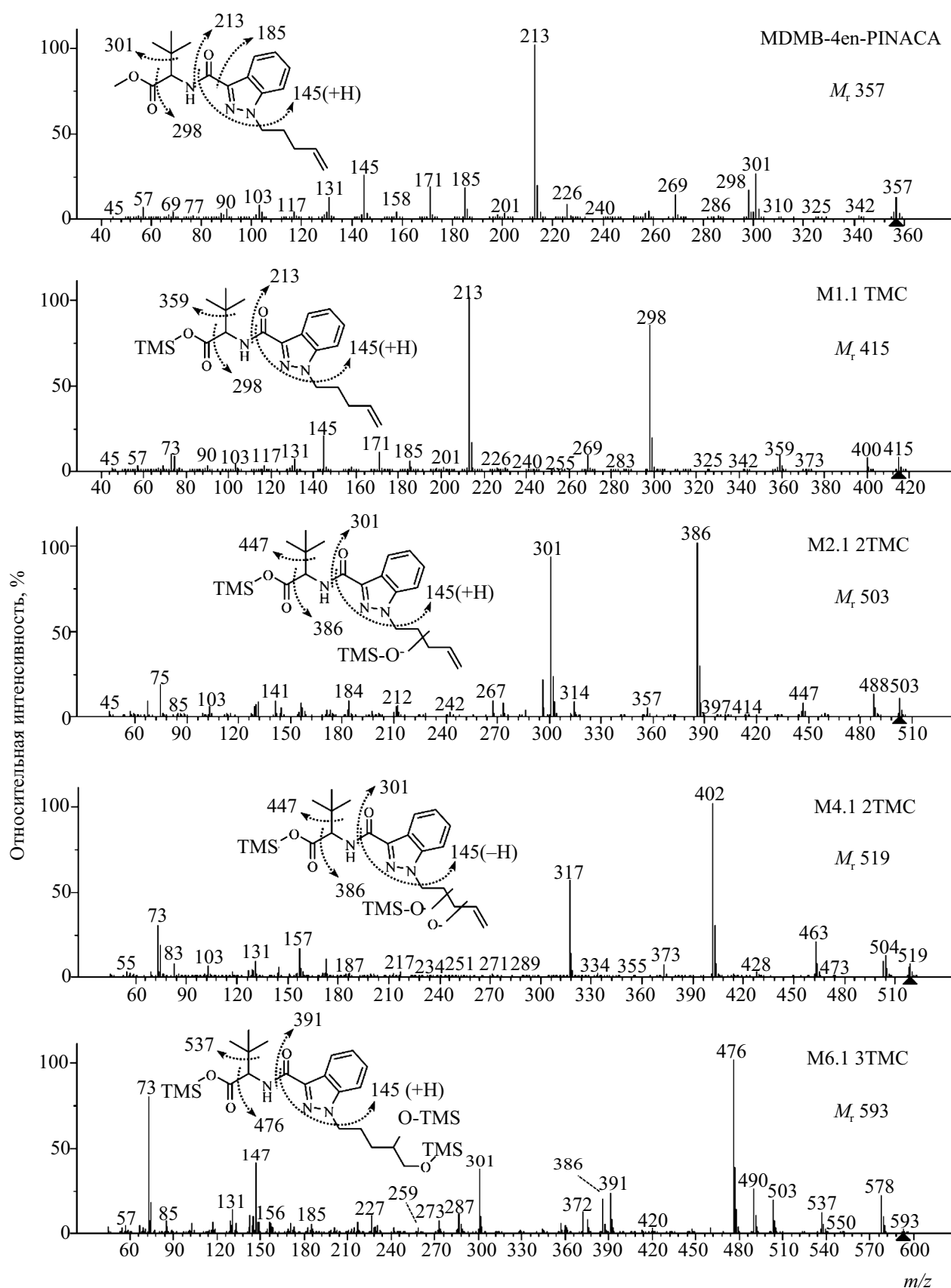


Рис. 6. ГХ-МС-спектры и фрагментация MDMB-4en-PINACA и его метаболитов (TMC).

\*\*\*

В моче человека методами жидкостной хромато-масс-спектрометрии с регистрацией точных масс и спектров МС<sup>n</sup>, а также газовой хромато-масс-спектрометрии обнаружили ряд метаболитов синтетического каннабимиметика MDMB-4en-PINACA. Обнаруженные соединения предположительно идентифицированы как продукты гидролиза сложного эфира, моно- и дигидроксилирования, восстановления, образования дигидродиола, карбоксилирования, карбоксилирования с элиминированием метиленовой группы, N-деалкилирования и комбинаций этих процессов. Для гидролизированных метаболитов степень глюкуронирования, определенная по отношению площадей хроматографических пиков, не превышала 0.22. Наибольшими относительной площадью хроматографических пиков обладали метаболиты, являющиеся продуктами гидролиза с образованием дигидродиола в свободной и глюкуронированной формах; гидролиза; гидролиза, совмещенного с дигидроксилированием N-пентенильного остатка. Обнаружение этих продуктов рекомендуется для рутинного химико-токсикологического и судебно-химического анализа мочи методом газовой хромато-масс-спектрометрии; в случае применения жидкостной хромато-масс-спектрометрии — также глюкуронидов продуктов гидролиза и образования дигидродиола.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Республиканского наркологического диспансера № 1, г. Уфа. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все биологические материалы, используемые в работе, являются обезличенными биологическими пробами. Пробы были предоставлены химико-токсикологической лабораторией перед их утилизацией и для своего использования не требуют разрешения этического комитета.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The cannabinoid receptors / Ed. Reggio P.H. New York: Humana Press, 2009. 396 p.

2. Mustata C., Torrens M., Pardo R., *The Psychonaut web mapping group*, Farre, M. Spice drugs: cannabinoids as a new designer drugs // *Adicciones*. 2009. V. 21. № 3. P. 181.
3. European Drug Report 2023: Trends and Developments. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2022. [https://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2022\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2022_en) (дата обращения 20.05.2024).
4. 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. V. 52. № 3. P. 237. <https://doi.org/10.1080/02791072.2020.1723748>
5. 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. V. 11. P. 464. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.00464>
6. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) initial report on the new psychoactive substance methyl 3,3-dimethyl-2-(1-(pent-4-enyl)-1H-indazole-3-carboxamido) butanoate (MDMB-4en-PINACA). Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2020. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13363/emcdda-initial-report-MDMB-4en-PINACA.pdf> (дата обращения 20.05.2024).
7. World Health Organization. Critical Review Report: MDMB-4en-PINACA. Geneva, 2020. [https://www.who.int/docs/default-source/controlled-substances/43rd-ecdd/mdmb-4en-pinaca-review-2020.pdf?sfvrsn=5cd6e97e\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/controlled-substances/43rd-ecdd/mdmb-4en-pinaca-review-2020.pdf?sfvrsn=5cd6e97e_4) (дата обращения 20.05.2024).
8. Norman C., Walker G., McKirdy B., McDonald C., Fletcher D., Antonides L.H. et al. Detection and quantitation of synthetic cannabinoid receptor agonists in infused papers from prisons in a constantly evolving illicit market // *Drug Test. Anal.* 2020. V. 12. № 4. P. 538. <https://doi.org/10.1002/dta.2767>
9. Krotulski A.J., Cannaert A., Stove C., Logan B.L. The next generation of synthetic cannabinoids: Detection, activity, and potential toxicity of pent-4en and but-3en analogues including MDMB-4en-PINACA // *Drug Test. Anal.* 2021. V. 13. № 2. P. 427. <https://doi.org/10.1002/dta.2935>
10. 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. V. 101. № 2. P. 239. <https://doi.org/10.1002/cpt.534>
11. Leong H.S., Watanabe S., Kuzhiumparambil U., Fong C.Y., Moy H.Y., Yao Y.J. et al. 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. V. 39. P. 198.  
<https://doi.org/10.1007/s11419-020-00562-7>
12. Franz F., Jechle H., Wilde M., Angerer V., Huppertz L.M., Longworth M. et al. Structure-metabolism relationships of valine and *tert*-leucine-derived synthetic cannabinoid receptor agonists: a systematic comparison of the in vitro phase I metabolism using pooled human liver microsomes and high-resolution mass spectrometry // *Forensic Toxicol.* 2019. V. 37. P. 316.  
<https://doi.org/10.1007/s11419-018-00462-x>
  13. Jang M., Yang W., Choi H., Chang H., Lee S., Kim E., Chung H. Monitoring of urinary metabolites of JWH-018 and JWH-073 in legal cases // *Forensic Sci. Int.* 2013. V. 231. P. 13.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.053>
  14. Mogler L., Franz F., Wilde M., Huppertz L.M., Halter S., Angerer V. et al. Phase I metabolism of the carbazole-derived synthetic cannabinoids EG-018, EG-2201, and MDMB-CHMCZCA and detection in human urine samples // *Drug Test. Anal.* 2018. V. 10. № 9. P. 1417.  
<https://doi.org/10.1016/10.1002/dta.2398>
  15. Григорьев А.М., Крупина Н.А., Никитин Е.В., Грибкова С.Е., Калашников В.А. Выявление метаболитов нового синтетического каннабиноида ММВ-022 в моделях in vivo и in vitro методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии // *Масс-спектрометрия.* 2020. Т. 17. № 3. С. 151.  
<https://doi.org/10.25703/MS.2020.17.33>
  16. Watanabe S., Wu X., Dahlen J., Konradsson P., Vikingsson S., Kronstrand R., Gréen H. Metabolism of MMB022 and identification of dihydrodiol formation in vitro using synthesised standards // *Drug Test. Anal.* 2020. V. 12. № 10. P. 1432.  
<https://doi.org/10.1002/dta.2888>
  17. Watanabe S., Vikingsson S., Åstrand A., Gréen H., Kronstrand R. Biotransformation of the New synthetic cannabinoid with an alkene, MDMB-4en-PINACA, by human hepatocytes, human liver microsomes, and human urine and blood // *AAPS J.* 2019. V. 22. № 1. P. 13.  
<https://doi.org/10.1208/s12248-019-0381-3>
  18. Ozturk Y.E., Yeter O. In vitro phase i metabolism of the recently emerged synthetic MDMB-4en-PINACA and its detection in human urine samples // *J. Anal. Toxicol.* 2020. V. 44. № 9. P. 976.  
<https://doi.org/10.1093/jat/bkaa017>
  19. Liying Z., Min S., Baohua S., Hang C., Xin W., Hongxiao D. et al. Application of a UPLC-MS/MS method for quantitative analysis of 29 synthetic cannabinoids and their metabolites, such as ADB-BUTINACA and MDMB-4en-PINACA in human hair in real cases // *Forensic Sci. Int.* 2022. V. 331. Article 111139.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.111139>
  20. Kronstrand R., Norman C., Vikingsson S., Biemans A., Crespo B.V., Edwards D. et al. The metabolism of the synthetic cannabinoids ADB-BUTINACA and ADB-4en-PINACA and their detection in forensic toxicology casework and infused papers seized in prisons // *Drug Test. Anal.* 2022. V. 14. № 4. P. 634.  
<https://doi.org/10.1002/dta.3203>
  21. March R.E. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 1997. V. 32. № 4. P. 351.
  22. Bruker Daltonics Toxtyper™ 2012.  
<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/ms-solutions/toxtyper.html> (дата обращения 20.05.2024).
  23. Wissenbach D.K., Meyer M.R., Remane D., Philipp A.A., Weber A.A., Maurer H.H. Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MSn screening concept // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. № 10. P. 3481.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-4398-9>
  24. Граник В.Г. Метаболизм экзогенных соединений. Лекарственные средства и другие ксенобиотики. М.: Вузовская книга, 2015. 526 с.

# DETECTION OF METABOLITES OF THE NEW SYNTHETIC CANNABINOID MDMB-4en-PINACA IN HUMAN URINE BY LIQUID AND GAS CHROMATO-MASS SPECTROMETRY METHODS

I. V. Nikolaev<sup>a</sup>, A. M. Bajkova<sup>a</sup>, E. H. Galeeva<sup>a</sup>, A. M. Grigoryev<sup>b</sup>, \*

<sup>a</sup>*Republican narcological dispensary № 1  
Ufa, Russia*

<sup>b</sup>*“27 Scientific Centre” of the Ministry of Defense of the Russian Federation  
Moscow, Russia*

*\*E-mail: chrzond4250@yandex.ru*

**Abstract.** MDMB-4en-PINACA belongs to the new synthetic psychoactive compounds that have been distributed in Russia since at least 2020 and is highly active against the human cannabinoid receptor CB1. Its distinctive feature is the presence of an N-pentene residue, which is rare for this group of compounds. The significant hydrophobicity of MDMB-4en-PINACA, like most other synthetic cannabimimetics on the world market, results in almost complete biotransformation of the parent compound and very low levels in urine. Hence the need to identify its metabolites, the detection of which would indicate the use of MDMB-4en-PINACA. To solve this problem we used gas and liquid chromatography-mass spectrometry methods, including high-performance chromatography-mass spectrometry with a quadrupole time-of-flight detector and a three-dimensional ion trap detector equipped with an electrospray ionization source. A number of putative metabolites of MDMB-4en-PINACA in human urine were identified as products of hydrolysis, mono- and dihydroxylation, reduction, dihydrodiol formation, carboxylation, carboxylation with elimination of methylene group, N-dealkylation and combinations of these processes. A number of metabolites were found in the form of glucuronides. The obtained results are in good agreement with literature data. For routine chemical-toxicological and forensic chemical analysis of urine by gas chromatography-mass spectrometry is optimal to search for products of hydrolysis, dihydroxylation and dihydrodiol formation, while when using liquid chromatography-mass spectrometry is also recommended detection of glucuronides of hydrolysis products and dihydrodiol formation.

**Keywords:** MDMB-4en-PINACA, synthetic cannabinoids, metabolite, human urine, LC-MS/MS-BP, GC-MS, ion trap.