

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業：H27-医薬 A-一般-002)
危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究

分担研究報告書

危険ドラッグの代謝物同定による代謝プロファイルの解析と 新規な危険ドラッグ解析技術の確立

分担研究者：	北市清幸	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	伊藤哲朗	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	古川諒一	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	川島英頌	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	首村菜月	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	曾田 翠	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	筑本貴郎	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	神山恵理奈	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	永井宏幸	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)

【研究要旨】

昨年度までに設定した LCMS-IT-TOF による合成カンナビノイド (SCs) の代謝物測定系を用い、複数の SCs について *in vitro* 代謝経路の解明を試みた。また、GC-MS を用いてインドール環 1 位にフルオロベンジル基を持つ指定薬物及び規制対象外である異性体 5 種を用いて、カラムによる分離と質量分析による識別法の開発を行った。

代謝経路の解明を目指した実験ではヒト肝ミクロソームによる代謝系を用いた。その結果、APP-CHMINACA は、第一相代謝反応物として、M1 (hydroxylation)、M2 (deamination、hydroxylation)、M3 (deamination)由来する質量電荷比を持つ代謝物を与える事が確認され、前二者については位置異性体の存在が示唆された。また、第二相代謝反応物として、M3-G とその位置異性体の生成が推定された。代謝生成物の経時的変化の結果より母化合物から M3、M2 への代謝が主代謝経路であることが推定された。ATHPINACA の代謝反応物からは、6 種の第一相代謝物及び 2 種の第二相代謝物由来する質量荷電比を持つイオンが検出され、母化合物への水酸基の導入による M6 (monohydroxylation)及び M5 (di-hydroxylation)の生成が主代謝経路であることが推定された。CUMYL-PINACA についても同様の代謝物検定を行い、4 種の第一相代謝物及び 2 種の第二相代謝物由来するイオンピークが検出された。なお、APP-CHMINACA、ATHPINACA、及び CUMYL-PINACA の消失半減期 $T_{1/2}$ は、それぞれ 7.7 ± 0.2 分、 7.2 ± 1.1 分及び 46.1 ± 0.6 分であり、置換基の差異による代謝抵抗性に関する情報が得られた。これらのデータから試験を行った合成カンナビノイドの代謝経路を推定した。

また、構造識別においては、カラムによる分離と GC-MS/MS によるプロダクトイオンスペクトルの強度比を用いることにより、指定薬物に指定されている合成カンナビノイドである FUB-JWH-018 といずれも規制対象外である位置異性体 5 種類との識別が可能であることを見出した。

A. 研究目的

危険ドラッグに含まれる成分にはカチノン類や合成カンナビノイド (SC) 等が知られている。国はこれらについて、指定薬物の指定による規制を行っているが、構造の一部を変えた指定対象外の新規化合物が出現する、いわゆる“イタチごっこ”が続いてきた。特に合成カンナビノイドは、未変化体が尿などの生体試料から検出困難であることが知られていることから、その代謝物を明らかにし、代謝プロファイルの情報を蓄積することは SC の摂取を裏付けるエビデンスとして有用であると考えられる。そこで我々は、海外において、電子タバコに装填する e-liquid 中に存在が確認され、今後日本にも流入する可能性が否定できないアミド型の SC である 5F-CUMYL-PINACA およびその類似物質 CUMYL-PINACA 等の合成カンナビノイド類を用いて、代謝物並びに代謝経路や半減期の解明を試みた。

また、規制薬物の構造類似化合物 (異性体等) は規制対象外であることがあるため、市場流通品及び使用者由来生体試料の検査においてそれらを識別することは喫緊の課題である。そこで昨年度に引き続き、危険ドラッグ成分をより確実に同定するための基礎研究の一環として、SC とその位置異性体との識別可能な方法の開発を試みた。また、開発した手法を実際のハーブ製品への適用を行うことを目指した。

B. 研究方法

1. 肝ミクロソーム画分を用いた危険ドラッグ成分の代謝反応

薬物の代謝反応は Erratico et al¹⁾の方法に一部改良を加えて行った。

氷上にて、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4) 900 μ L に、HLMs 終濃度 0.5 mg/mL (XenoTec, Kansas, USA)、NADPH Regeneration System Solution A 50 μ L、Solition B 10 μ L (Corning, USA)、UDPGA 終濃度 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)、alamethicin in DMSO 終濃度 10 μ g/mL (Sigma-

Aldrich, St. Louis, USA)を添加し、全量を 990 μ L とした。

この混液を、5 分間のプレインキュベートした後に、対象となる合成カンナビノイドを終濃度 10 μ M となるように 10 μ L 添加後、37 $^{\circ}$ C の水浴で 3 時間までインキュベートを行った。

1-1. 経時サンプルの作製

各タイムポイント(0、1、2、3時間)混液を 200 μ L 採取し、内部標準物質であるパパベリン 0.01 μ g/mL (日医工, 富山) を含有するアセトニトリル溶液 (4 $^{\circ}$ C) を 1,200 μ L 添加し、代謝反応を停止させた。得られたサンプルは、遠心 (12,000 rpm, 10 min) し、上清を、50 $^{\circ}$ C で窒素乾固し、超音波処理のもとで 100 μ L の 50%メタノールに再溶解した。その後、遠心 (12,000 rpm, 10 min) を行い、上清をフィルター濾過し、測定に用いた。

1-2. 半減期算出用試料の作製

代謝半減期が非常に短く、反応時間 0、1、2、3 時間のタイムポイントにおける測定で半減期を算出することができなかったものに関しては、別途 0、10、20、40、60 分のタイムポイントで混液を採取し、前出の前処理方法を行い、測定を行った。

1-3. 分析条件

それぞれの合成カンナビノイドおよびその代謝物の分析には、LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto)、LC カラムには ZORBAX Eclipse Plus C8 2.1 \times 150 mm、3.5 μ m を使用した。

移動相には、(A) 0.1% formic acid in water および(B) 0.1% formic acid in acetonitrile を用い、グラジエントの条件は、(B) 0-2 min : 10%、2-40 min: 10 \rightarrow 80%、40-48 min : 10%とし、測定時間は 48 分に設定した。また、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、流速は 0.18 mL/min とし、測定サンプルのインジェクト量は 10 μ L とし測定を行った。LCMS-IT-TOF は、イオン化法として positive/negative electrospray ionization (ESI) 法を用い、測定範囲を m/z 100-700 とし測定を行っ

た。なお、イオン蓄積時間は 50 msec.とした。また、各プリカーサーアイソレーション幅は 1 Da とし、周波数は 45.0 kHz、CID エネルギーは 50% で測定を行った。

1.4. データ解析

データ解析には MetID Solution 1.1 (Shimadzu, Kyoto) と Metabolizer (ChemAxon, Budapest, Hungary) を使用した。各合成カンナビノイドの化学構造を入力することにより MetID solution 1.1 あるいは Metabolizer によって予測された代謝物ライブラリの m/z を、実測されたピークの m/z と比較することにより、代謝物を確認した。さらに、推定された代謝物より得られた MS/MS フラグメントのデータより、その代謝物が合成カンナビノイド由来の化合物であることを確認した。なお、被検薬物を含まない HLMs 溶液 (ブランク) から検出される化学物質についてはこれを除外した。また、命名は Gandhi らの報告¹⁾に従い、ESI (+)で得られた代謝物はリテンションタイム順に命名、ESI (-)で得られたグルクロン酸抱合代謝物は、先の代謝物に G を付して命名した。

2. SC とその異性体の合成と識別

Fig. 5 に示す合成スキームにより FUB-JWH-018 及びその異性体 5 種 (Fig. 6) を合成し、各々の化学構造を核磁気共鳴分光法により得られた情報を元に決定した後、GC-MS 等を用いて識別可能な条件開発を行った。

GC-MS 装置と条件：TRACE 1310GC/ISQ LT (Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA)、カラム：DB-5MS (0.25 mm i.d.×30 m、膜厚 0.25 μm 、Agilent Technologies, Santa Clara, USA)、カラム温度：80°C (1 分保持)–10°C/分–310°C (12 分保持)、キャリアガス：He (1.0 mL/分)、試料注入量：1 μL 、試料注入：スプリットレス、注入口温度：250°C、トランスファーライン温度：280°C、イオン源温度：250°C、イオン化法：EI、CI、ポジティブ、試薬ガス：メタン、測定モード：スキャン

GC-MS/MS 装置：7890A/7000 GC/MS Triple Quad

(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)、カラム：DB-5MS+DG (0.25 mm i.d.×30 m+10 m、膜厚 0.25 μm 、Agilent Technologies, Santa Clara, USA)、測定モード：プロダクトイオンスキャン、コリジョンガス：N₂、コリジョンエネルギー (CE)：5, 15, 25, 35 V、その他の条件は GC-MS と同一とした。

GC-MS/MS においては電子イオン化 (EI) 及び化学イオン化におけるプロダクトイオンスキャン分析を行った。数種のプリカーサーイオンを設定し、種々のコリジョンエネルギー条件において得られたプロダクトイオンスペクトルの差異から異性体を識別することとした。

C. 研究結果

1. 各代謝物の同定

1-1. APP-CHMINACA 代謝物の同定

APP-CHMINACA は AB-CHMINACA のイソプロピル基をベンジル基に変化させた構造を持つ化合物である (Fig.4)。HLMs を用いた *in vitro* 試験によって第一相代謝反応物として 3 種、第二相代謝物 1 種が確認された。反応 3 時間後の主要な代謝物は M2 (deamination, hydroxylation)であった (Fig.1)。なお、M1 は反応時間 1 時間までにおいてのみ確認されており (Fig.4)、末端のアミド構造における hydroxylation が非常に早い速度で起こることが確認された (Fig.1)。

1-2. ATHPINACA 代謝物の同定

ATHPINACA は、アダマンチル基を持つ合成カンナビノイドである (Fig.4)、HLMs を用いた *in vitro* 試験において ATHPINACA は、6 種の第一相代謝物、2 種の第二相代謝物が確認された。第一相代謝物に関しては、アダマンチル基の水酸化が早期に起こることが判明し、1 水酸化体の M6 と 2 水酸化体の M5 を与える事が確認された (Fig.2)。しかし、3 水酸化体 M2 の生成量は M5 比較して微量であった。反応 3 時間後の主代謝物は M5 であった (Fig.4)。

1-3. CUMYL-PINACA 代謝物の同定

CUMYL-PINACA は、5F-CUMYL-PINACA や

CUMYL-THPINACA と類似の構造を持つ合成カンナビノイドである (Fig.4)。HLMs を用いた *in vitro* 試験では第一相代謝物 4 種並びに、第二相代謝物 2 種が確認された。反応 3 時間後の主代謝物は、1 水酸化体の M3 であった (Fig.3)。

2. 各種合成カンナビノイドの半減期

当研究ではこれまでに合成カンナビノイドの半減期が、1 分から 123 分と多岐に渡ることを明らかにしている。APP-CHMINACA、ATHPINACA、CUMYL-PINACA の代謝半減期はそれぞれ、 7.7 ± 0.2 分、 7.2 ± 1.1 分、 46.1 ± 0.6 分であった (Fig.4)。

3. FUB-JWH-018 とその異性体の合成と識別

合成した FUB-JWH-018 (3) およびその異性体 5 種 (1, 2, 4-6) の混合溶液を GC-MS で分析したところ、1 と 2、4 と 5 の保持時間がそれぞれ重なって検出された。このことから、2-フルオロベンジル基を有する異性体と 3-フルオロベンジル基を有する異性体の保持特性に差がないことが明らかとなった。EI マススペクトルは、1-ナフチル基を有する 3 化合物 (1-3) には特徴的なフラグメントイオンが観測され、2-ナフチル基を有する 3 化合物 (4-6) との識別は可能であったが、フッ素の結合位置の違いは識別できなかった。また、CI マススペクトルは、6 化合物とも非常に類似しており、識別不能であった。

GC-MS/MS により m/z 378 をプリカーサーイオンとして CE 5–35 V においてプロダクトイオンスペクトルを測定したところ、主要なプロダクトイオンである m/z 109, m/z 269 とプリカーサーイオンである m/z 378 の相対強度に違いが認められ、異性体間の識別が可能であることが明らかとなった (Fig. 7)。

本識別法の有用性を確認するため、FUB-JWH-018 を含有するハーブ形態の危険ドラッグ製品を GC-MS/MS で分析したところ、FUB-JWH-018 標準品と一致するプロダクトイオンスペクトルが確認された。

D. 考察

危険ドラッグ成分の中でも、合成カンナビノイドは代謝を受けやすく、未変化体が血液や尿から検出されにくい事が知られている。よって、代謝物を検出することにより、摂取された合成カンナビノイドを類推する技術の確立が求められているが、合成カンナビノイドを用いた代謝研究はあまり進展しておらず、代謝物に関する情報は不足している。本研究では、複数の合成カンナビノイド類の代謝物、代謝経路や *in vitro* での半減期が明らかとなった。

今回選定した薬物に関しては非常に速度の速い代謝反応が見られた。それらの詳細について以下に示す。

APP-CHMINACA の代謝においては、末端のアミド構造における水酸化が、代謝半減期に大きく寄与する反応速度の早い反応であると考えられる。この反応は、同様に末端にアミド構造を持つ AB-CHMINACA においても確認されており¹⁾、この部分構造に特有の代謝挙動であると考えられる。

ATHPINACA の代謝挙動からは、アダマンチル基への水酸化が速度の速い代謝反応であり代謝半減期への寄与が大きいことが示された。同官能基への水酸化が他の被代謝部位と比較して優先的に進行することは、5F-AKB-48 を用いた代謝物実験においても確認されていることから²⁾、本反応はアダマンチル基を持つ合成カンナビノイドに特有の代謝挙動であると考えられる。

CUMYL-PINACA の半減期 (46.1 ± 0.6 分)は、5F-CUMYL-PINACA, CUMYL-THPINACA の代謝半減期(65.1 ± 3.6 分), (92.8 ± 7.2 分) よりも短い。その理由として、ペンチル鎖の 5 位 (□位)へのフッ素の導入やテトラヒドロピラン鎖の導入により代謝抵抗性が増大したものと考えられた。これは今後も新規に出現する合成カンナビノイドの作用の長短を位置づける上で重要な情報であることが示唆される。今後は同様な構造的関係性を持つ、AKB48、5F-AKB48、ATHPINACA の代謝挙動を明らかにし、相関性を確認したいと考えている。

さらに、今回の研究では、FUB-JWH-018 とその異性体を用い、GC-MS/MS より得られるプロダクトイオンスペクトルから、これらを識別することに成功した。危険ドラッグの異性体分析において、インドール環 3 位にカルボニル基を持つ SCs の構造識別は、従来から複数の研究者により活発に行われてきたが、本例のように置換基にフッ素官能基が導入された誘導体の置換位置異性体の識別研究は皆無であった。指定薬物全体を見渡すと、一部のカチノン系化合物について GC-CI-MS/MS 法を用いたフッ素位置異性体の識別法、インダゾール環を持つ SC について、GC-EI-MS/MS を用いた識別法が報告されているものの、後者においては、十分なフラグメントイオンの差異が観察されておらず、計算化学的考察を踏まえた方法が提唱されてきた。一方我々が達成した構造識別では、複数のプリカーサーイオンから明確な差異を示す、MS/MS 情報を得ることに成功したことに加え、ハーブ製品を用いた検証にも耐えうることを実証した。薬物検査に最も汎用される GC-MS/MS 装置を用いた本法は、実用性が高く、臨床検査機関、公的検査機関及び捜査機関における薬物検査において、誤同定の防止に資するものといえる。

E. 結論

今回の研究により、合成カンナビノイドの代謝プロファイルをさらに蓄積することが出来た。今後は、HLMs を用いた評価系によって、多様な合成カンナビノイドの代謝様式を明らかにし、新規な合成カンナビノイドの活性やマーカー化合物となりうる代謝物を予測し、素早い危険ドラッグの法的規制や使用者の摘発に資するための研究を進める予定である。また、生体由来試料測定時の誤同定防止に資するための基礎研究として、引き続き新規出現合成カンナビノイドの異性体識別を行うとともに、国内で流通が確認されている未規制薬物 (モルフォリン誘導体等) 異性体の識別を行う予定である。

危険ドラッグの成分分析では異性体等の構造類似化合物の可能性を考慮しつつ化合物同定する必要がある。FUB-JWH-018 とフルオロベンジル基のフッ素の結合位置が異なる異性体との誤同定防止には GC-MS/MS 分析が有効であった。複数の分析機器及び複数の測定条件で保持時間及びスペクトルの一致を確認することが誤同定の防止につながると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Erratico C, Neqreira N, Norouzizadeh H, Covaci A, Neels H, Maudens K, van Nuijs AL: In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB - CHMINACA. *Drug Test Anal.* 7: 866-876, 2015.
- 2) Holm NB, Pedersen AJ, Dalsgaard PW and Linnet K, Metabolites of 5F-AKB-48, a synthetic cannabinoid receptor agonist, identified in human urine and liver microsomal preparations using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry *Drug Testing and Analysis* 7: 199-206, 2015.
- 3) Wohlfarth A, Castaneto MS, Zhu M, Pang S, Scheidweiler KB, Kronstrand R, Huestis MA: Pentylindole/pentylindazole synthetic cannabinoids and their 5-fluoro analogs produce different primary metabolites: metabolite profiling for AB-PINACA and 5F-AB-PINACA. *AAPS J.* 17: 660-677, 2015.
- 4) Diao X, Scheidweiler KB, Wohlfarth A, Zhu M, Pang S, Huestis MA. Strategies to distinguish new synthetic cannabinoid FUBIMINA (BIM-2201) intake from its isomer THJ-2201: metabolism of FUBIMINA in human hepatocytes. *Forensic Toxicology* 2016.
- 5) Kusano M, Yamanaka M, Zaitso K, Nakayama H, Nakajima J, Moriyasu T, Tsuchihashi H, Ishii A. Regioisomeric differentiation of the alkyl-substituted

synthetic cannabinoids JWH-122 and JWH-210 by GC-EI-MS/MS. *Forensic Toxicology* 34: 304–315, 2016.

- 6) Kusano M, Zaitzu K, Nakayama H, Nakajima J, Hisatsune K, Moriyasu T, Matsuta S, Katagi M, Tsuchihashi H, Ishii A. Positional isomer differentiation of synthetic cannabinoid JWH-081 by GC-MS/MS. *J Mass Spectrom* 50: 586–591, 2015.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kohyama E, Chikumoto T, Furukawa R, Suenami K, Kawashima H, Tada H, Nagai H, Soda M, Kitaichi K, Ito T. Regioisomeric Differentiation of Synthetic Cannabinoids with an N-fluorobenzyl Indole Core by Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Forensic Chemistry*, 6: 28-35, 2018.
- 2) 伊藤哲朗, 古川諒一, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 川島英頌, 曾田翠, 多田裕之, 永井宏幸, 船田正彦, 北市清幸. 危険ドラッグ蔓延防止に向けた岐阜県における取り組み: 官学連携による依存性薬物の代謝物分析と異性体の構造識別. *日本アルコール薬物医学会誌*, 52: 205-214, 2017.

2. 学会発表

- 1) 神山恵理奈, 筑本貴郎, 古川諒一, 末次耕一, 川島英頌, 多田裕之, 永井宏幸, 曾田翠, 北市清幸, 伊藤哲朗. GC-MS/MS による合成カンナビノイド FUB-JWH-018 及びその異性体の識別. 第 63 回日本薬学会東海支部 総会・大会, 岐阜, 2017 年 7 月 8 日.
- 2) 伊藤哲朗, 古川諒一, 神山恵理奈, 末次耕一, 川島英頌, 曾田翠, 筑本貴郎, 永井宏幸, 多田裕之, 船田正彦, 北市清幸. 官学連携による危険ドラッグ蔓延防止への取り組み: 質量分析を用いた合成カンナビノイ

ドの異性体識別と代謝物解析. 第 44 回 BMS コンファレンス, 長浜, 2017 年 7 月 10 日-12 日.

- 3) 伊藤哲朗, 古川諒一, 神山恵理奈, 川島英頌, 首村菜月, 曾田翠, 筑本貴郎, 永井宏幸, 多田裕之, 船田正彦, 北市清幸. 危険ドラッグ蔓延防止に向けた岐阜県における取り組み(2): 合成カンナビノイド代謝物の同定と異性体の構造識別. 第 52 回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 横浜, 2017 年 9 月 8-9 日.
- 4) 神山恵理奈, 古川諒一, 川島英頌, 首村菜月, 曾田翠, 筑本貴郎, 永井宏幸, 北市清幸, 伊藤哲朗. 質量分析によるハーブ形態製品中の規制薬物の検出と構造識別法の開発. 日本生薬学会第 64 回年会, 船橋, 2017 年 9 月 9-10 日.
- 5) Kawashima H, Furukawa R, Soda M, Kohyama E, Chikumoto T, Tada H, Ito T, Kitaichi K. *In vitro* human metabolism of the synthetic cannabinoid 5F-PY-PINACA. *Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology* 15th, Kyoto, Sep. 24-27th, 2017.
- 6) 神山恵理奈, 筑本貴郎, 古川諒一, 末次耕一, 川島英頌, 多田裕之, 永井宏幸, 曾田翠, 北市清幸, 伊藤哲朗. GC-MS/MS によるフルオロベンジル基を有する合成カンナビノイドの位置異性体識別. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会, 奈良, 2017 年 11 月 21-22 日.
- 7) 古川諒一, 川島英頌, 首村菜月, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 永井宏幸, 多田裕之, 曾田翠, 北市清幸, 伊藤哲朗. インドール環 1 位にフルオロベンジル基を持つ合成カンナビノイドの異性体識別. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017, 鈴鹿, 2017 年 11 月 26 日.
- 8) 伊藤哲朗, 神山恵理奈, 古川諒一, 川島英頌, 首村菜月, 曾田翠, 永井宏幸, 松永俊之, 原英彰, 北市清幸. 岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会の取り組みについて (第二報). 第 50 回東海薬剤師学術会, 名古屋, 2017 年 12 月 3 日.

- 9) 伊藤哲朗, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 永井宏幸, 古川諒一, 川島英頌, 首村菜月, 曾田翠, 北市清幸. 指定薬物異性体の構造識別について. 平成 29 年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部衛生化学部会, 金沢, 2018 年 2 月 1-2 日.
- 10) 神山恵理奈, 筑本貴郎, 古川諒一, 川島英頌, 首村菜月, 多田裕之, 曾田翠, 北市清幸, 伊藤哲朗. 合成カンナビノイドの位置異性体識別 FUBJWH-018 について. 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018 年 3 月 26-28 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし。

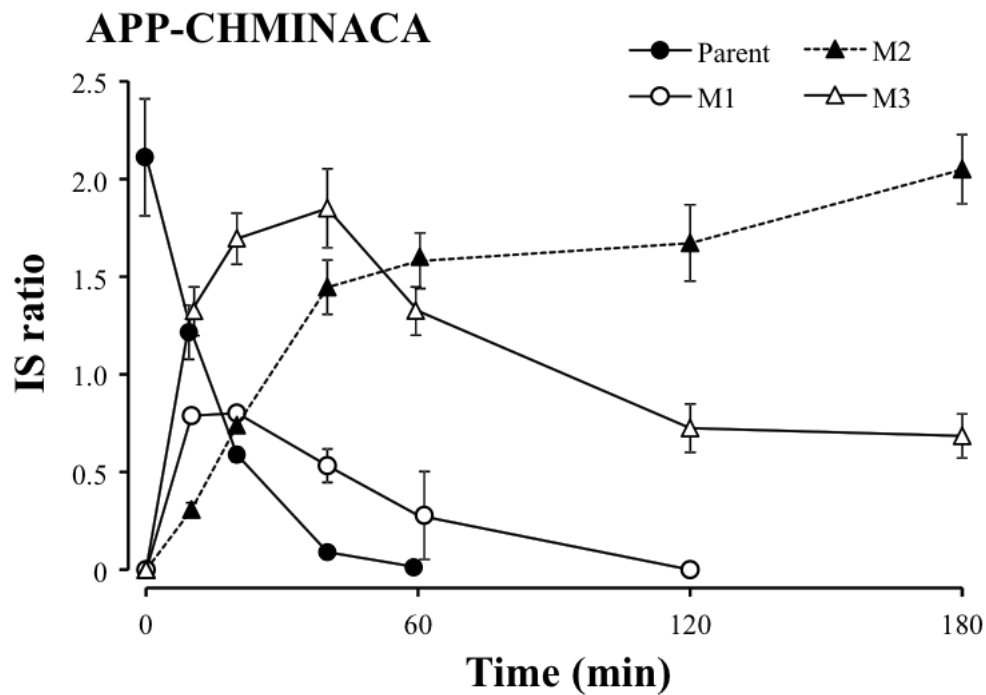


Fig. 1 Time-course changes of the amounts of APP-CHMINACA and its Phase I metabolites in HLMs preparation Data represents mean \pm SD (N=3 to 6). Parents (APP-CHMINACA), mono-hydroxylated M1, mono-hydroxylated and deaminated M2 and deaminated M3 were detected.

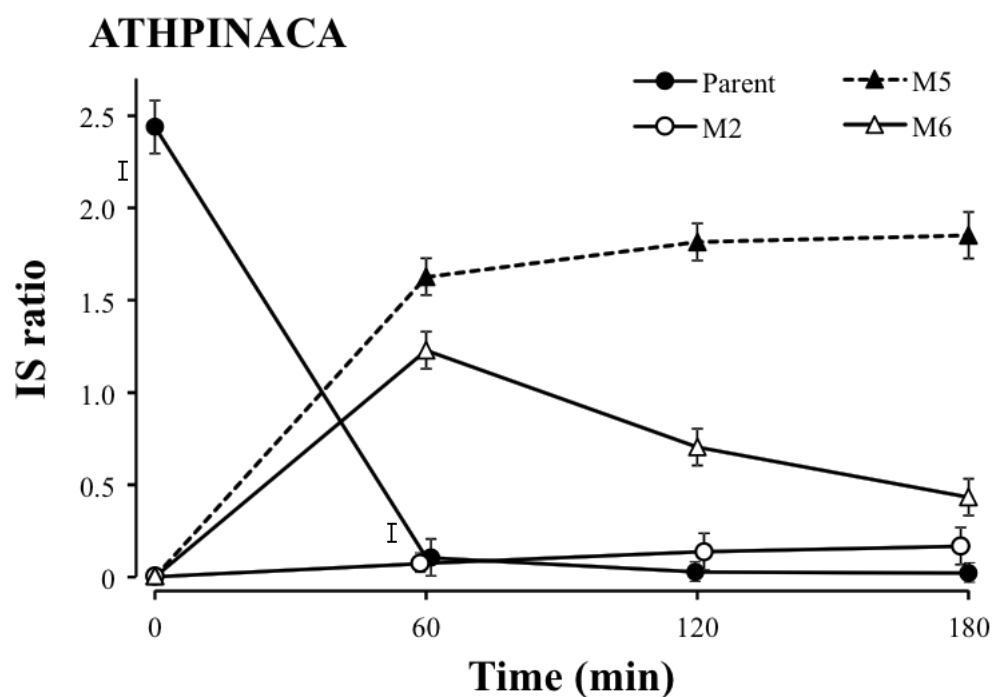


Fig. 2 Time-course changes of the amounts of ATHPINACA and its Phase I metabolites in HLMS preparation Data represents mean \pm SD (N=3). Parent (ATHPINACA), tri-hydroxylated M2, di-hydroxylated M5 and mono-hydroxylated M6 were detected.

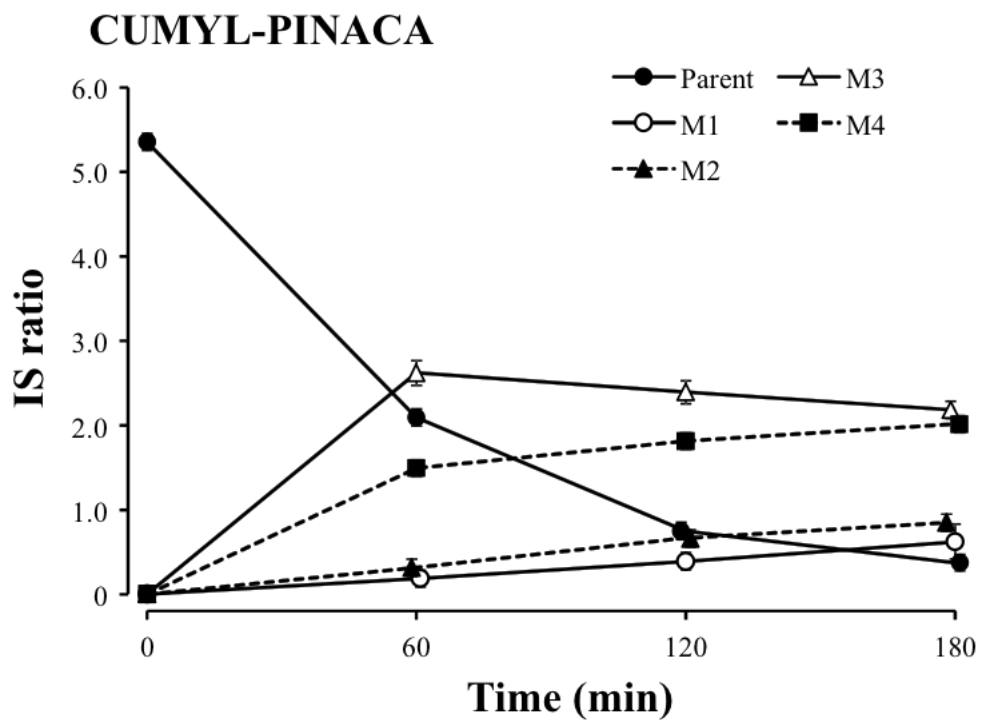


Fig. 3 Time-course changes of CUMYL-PINACA and its Phase I metabolites in HLMs preparation Data represents mean \pm SD (N=3). Parents (CUMYL-PINACA), oxydated and hydroxylated M1, di-hydroxylated M2, mono-hydroxylated M3 and oxydated M4 were detected.

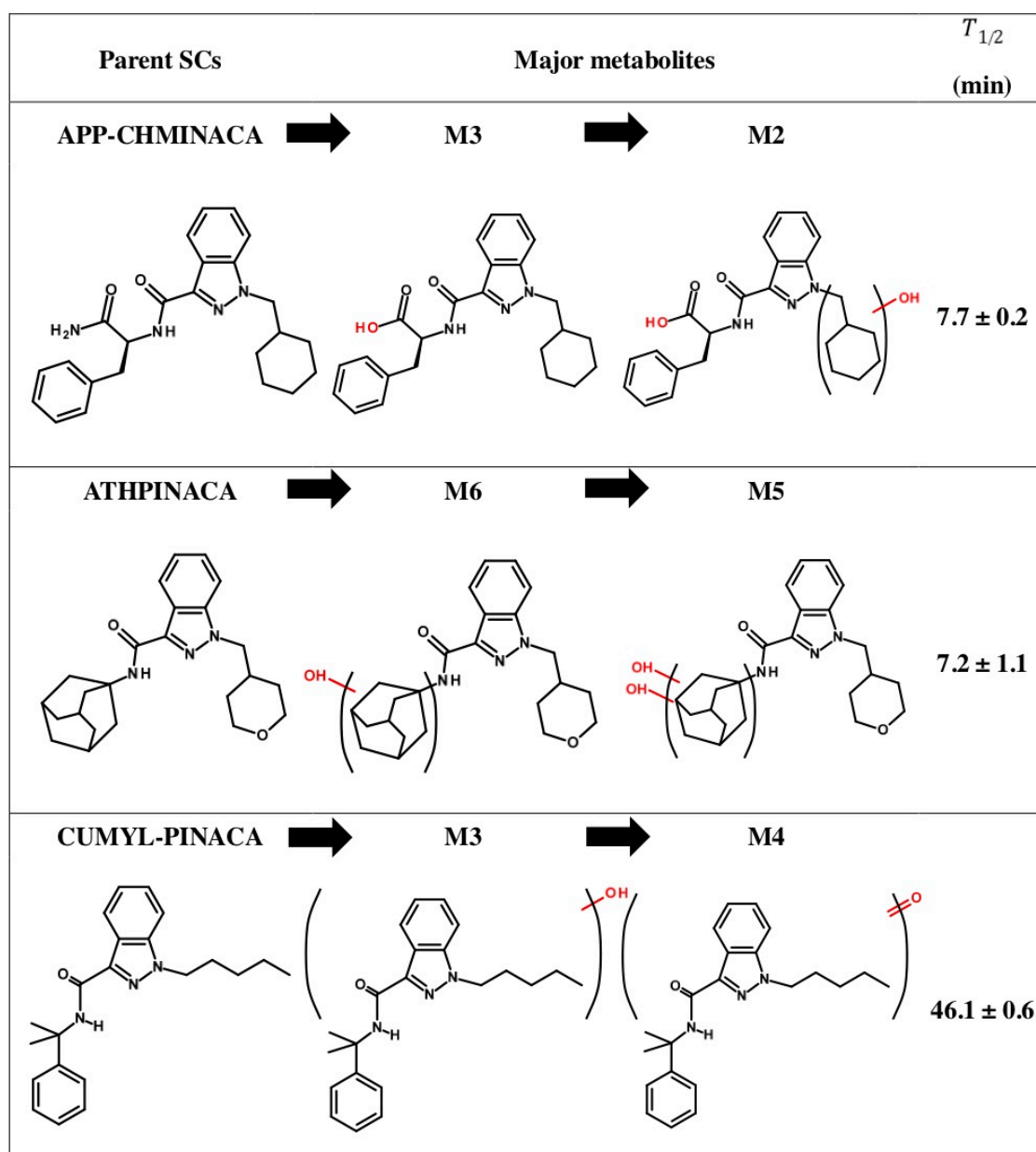


Fig. 4 Major metabolic pathways and half-lives of APP-CHMINACA, ATHPINACA and CUMYL-PINACA in HLMs preparation Arrows indicates the proposed way of metabolisms. $T_{1/2}$: elimination half-life of SCs.

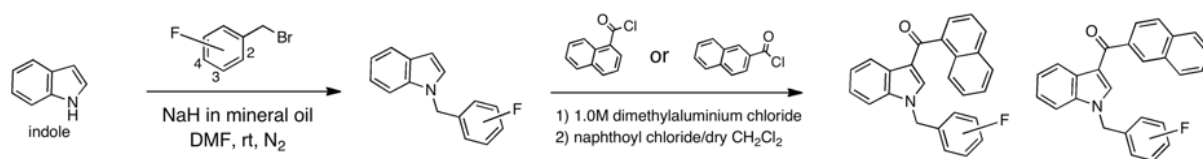


Fig. 5 Synthetic scheme of SCs

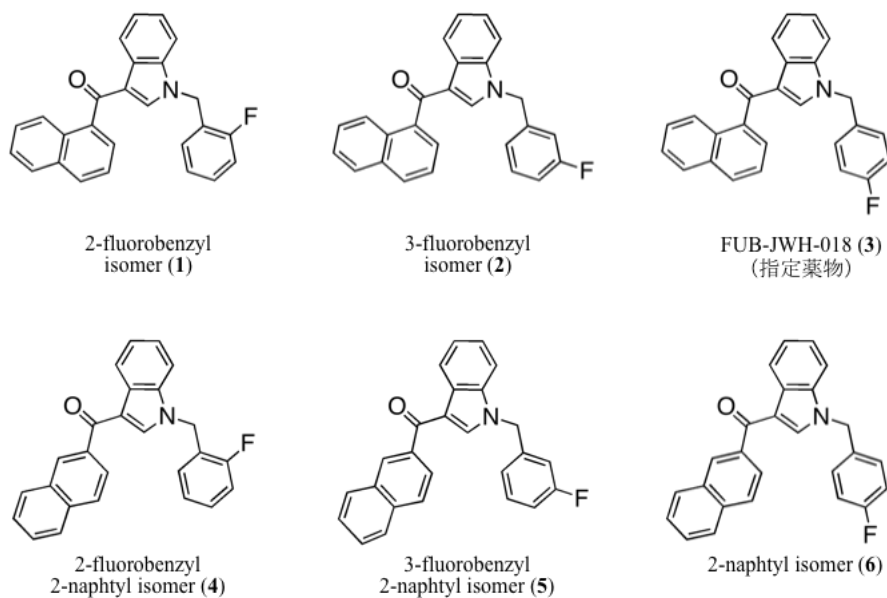


Fig. 6 Chemical structures of FUB-JWH-018 and its regioisomers

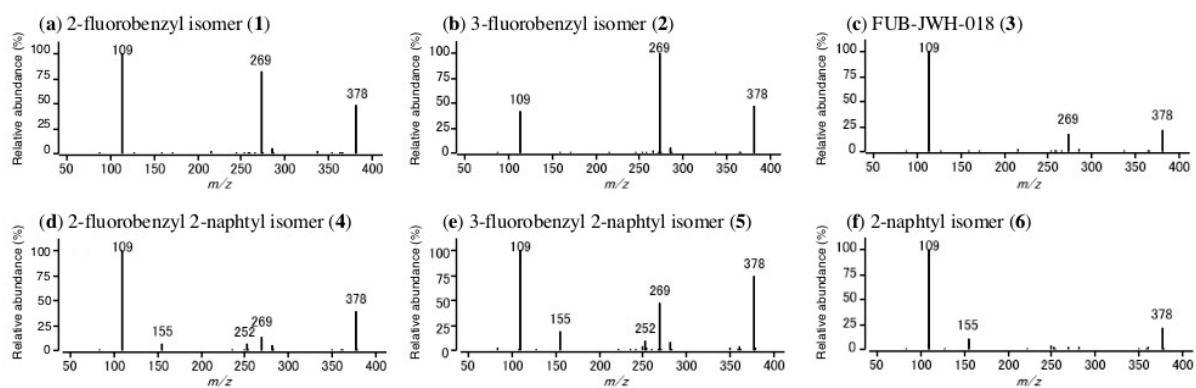


Fig. 7 Product ion spectra of FUB-JWH-018 and its regioisomers detected by GC-MS/MS at precursor ion m/z 387 with 5V CE