

令和2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)
総括研究報告書 (H30-医薬-一般-004)
危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究

分担研究報告書

危険ドラッグの生体内挙動とその有害性の相関に関する研究

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： 田中宏幸 (岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者： 松久貴哉 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者： 木下智絵 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者： 伊藤宏輔 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者： 森川美空 (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)

*現所属：岐阜医療科学大学 生薬学研究室

【研究要旨】

昨年度、ラットを用いた *in vivo* 代謝実験を行い、5F-CUMYL-PINACA および CUMYL-PINACA の代謝物が胆汁中に排出されたことを受け、今年度は糞便中からの代謝物の同定を試みた。各 SCs はラットに i.v.投与され、糞便サンプルは、各 SCs 投与時点から 24, 48, 72 時間経過した段階で採集した。採集した糞便にサンプル処理を行い、測定には LCMS-IT-TOF を使用した。

またこれまで、生体内での代謝挙動解明のため、ヒトサンプルに代わるものとしてラットを用いた *in vivo* 代謝実験を行ってきた。そこで、ヒトとラットの薬物代謝に関する種差を確認するため、ヒト肝ミクロソーム (HLMs) とラット肝ミクロソーム (RLMs) を用いた 5F-CUMYL-PINACA と CUMYL-PINACA の *in vitro* 代謝実験を行い、代謝挙動の解明と比較を試みた。

In vivo 代謝実験の結果より、両 SCs とともに胆汁で最も多く検出された代謝物 (一水酸化体) が、糞便からも検出できることが明らかとなった。また、糞便からの代謝物の検出は最長で 48 時間経過サンプルまで可能であり、ヒトにおいても糞便の採取により使用薬物を特定できる可能性が示唆された。

HLMs または RLMs を用いた *In vitro* 代謝実験では、各 SCs とともに半減期に違いが確認され、5F-CUMYL-PINACA では $t_{1/2}(\text{RLMs}) < t_{1/2}(\text{HLMs})$ であり、CUMYL-PINACA では $t_{1/2}(\text{RLMs}) > t_{1/2}(\text{HLMs})$ であった。一方で、代謝物の経時変化の傾向と、その結果より推定される代謝経路の違いは見られず、推定された主要代謝物は HLMs、RLMs とともに同じものであった。

In vivo 代謝実験と RLMs を用いた *in vitro* 代謝実験の結果の比較について、ラット胆汁中に排出された主要代謝物と、*in vitro* 代謝実験の主要代謝物は共に各 SCs の一水酸化体であった。しかし、*vivo* と *vitro* でピーク形状に違いが確認され、さらに、*in vitro* 代謝実験で算出した肝クリアランス (CL_H) よりも *in vivo* 代謝実験から算出したクリアランス (CL_{tot}) の方が大きいという結果になった。これまでの研究より、血中と尿中から代謝物が検出されないことが明らかとなっており、クリアランスの差異についてさらなる検討が必要である。

以上のことより、5F-CUMYL-PINACA、CUMYL-PINACA について、*in vitro* 代謝実験の結果から *in vivo* サンプルで検出される主要代謝物を特定すること、また、ヒトにおける代謝挙動の推定においてラットを用いた *in vivo* 代謝実験を行うことが有用であることが示唆された。

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 (SCs) 等が知られている。国はこれらについて法律による規制を行っているが、その構造の一部を変えた指定薬物対象外の新規化合物が次々と出現する、いわゆる“イタチごっこ”の状況が続いてきた¹⁾。また、SCs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おり²⁾、既報のSCs代謝実験において、*in vitro*代謝と*in vivo*代謝の結果は完全には一致しないことも指摘されている³⁾。従って、*in vivo*動物実験モデルは、実際の生体内におけるSCs代謝をより正確に予測するために重要である。そして、両者の実験における代謝物を明らかにし、その代謝プロファイルの情報を蓄積することは、SCs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。現在、SCsの使用は下火になってきたと言われているが、海外において電子タバコに装填するe-liquid中にアミド型のSCsの存在が確認されている。本研究では、これらアミド型SCsの中で、5F-CUMYL-PINACAとその構造類似物質CUMYL-PINACAを用いた*in vivo*代謝実験における、未変化体および代謝物の検出技術の確立並びに、ヒト肝ミクロソーム (HLMs) とラット肝ミクロソーム (RLMs) を用いた*in vitro*代謝実験によるヒトとラットの代謝挙動の違いについての解明を試みた。

SCsに代表される危険ドラッグは、ビルディングブロックの置換により、規制対象外且つ有害作用が同等の誘導体へと容易に導かれ、それらの代謝物は多岐に渡る¹⁾。代謝物の化学構造と作用の相関解析は危険ドラッグ代謝物の有害作用を解釈する基礎となるため、指定対象外とされる指定薬物の異性体由来の代謝物解析と親化合物の同定は、本研究課題の基盤となる。そこで本研究では、代謝物の物理化学的特性を考慮し、分析系に高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC/MS) を使い、合成カンナビノイドの代謝物測定系(*in vitro*, *in vivo*)の開発に資することを目指した。

B. 研究方法

1. ラットを用いた *in vivo* 代謝実験

糞便採取について、頸静脈をカテーテル処理した10週齢の雄のWistar/STラット (SLC、日本) を使い、薬物投与直後から頸静脈カニューレより採血を行った (time point : 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min)。その後は個別にガラスゲージに入れ、自由摂食下で3日間飼育し、薬物投与後24, 48, 72時間に糞便を採集した。

胆汁採取について、頸静脈と胆管をカテーテル処理した10週齢の雄のWistar/STラット (SLC、日本) を用いた。採血は前述の通りに行い、胆汁は薬物投与から1時間ごとにエッペンチューブを交換した。サンプル採取は薬物投与4時間後まで行った。

1-1. *in vivo* サンプルの作製

胆汁は、薬物投与前10分間のサンプルを収集し、ブランクサンプルとした。

胆汁サンプルの処理について、胆汁300 μ Lに対して、 β -グルクロニダーゼ52.8 μ Lを加え、加水分解処理を行った。その後、アセトニトリル1200 μ Lを加えて除タンパクし、遠心 (12000 rpm, 10 min) したのち、上清をQuEChERS処理した⁴⁾。処理後、遠心分離 (12000 rpm, 10 min) し、上清を45°Cで遠心乾固した。測定前に50%アセトニトリルで再溶解しフィルターろ過したものを測定に用いた。

糞便サンプルの処理について、糞便0.25 \pm 0.01 gに対して80%アセトニトリル1800 μ Lを添加し、24時間室温で放置して抽出を行った⁵⁾。抽出物はろ過し、ろ液を遠心分離 (12000 rpm, 10 min) した後、上清900 μ Lを遠心乾固した。乾固したのち、100 mMリン酸buffer (pH 7.40) 300 μ Lと β -グルクロニダーゼ52.8 μ Lを添加し、加水分解処理を行った。その後、アセトニトリル1200 μ Lを加えて除タンパクし、遠心 (12000 rpm, 10 min) したのち、上清をQuEChERS処理した。処理後、遠心分離 (12000 rpm, 10 min) し、上清を45°Cで遠心乾固した。測定前に50%アセトニトリルで再溶解しフィルターろ過したものを測定に用いた。

2. 肝ミクロソーム画分を用いた *in vitro* 代謝実験

薬物の代謝反応はErraticoらの方法⁶⁾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 または RLMs 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 分間プレインキュベートした後に、対象となる SCs を終濃度 10 μ M となるように 10 μ L 添加後、37°C の水浴で 3 時間までインキュベートを行った。

2-1. 経時サンプルの作製

各タイムポイント(0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180 分) の混液を 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°C) を 1200 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 1100 μ L を 45°C で遠心乾固し、超音波処理のもとで 100 μ L の 50% アセトニトリルに再溶解した。その後、フィルター濾過したものを測定に用いた。

3. 代謝実験からの PK パラメーター算出と比較

ミクロソーム固有クリアランス ($CL_{int,micr}$) と半減期は *in vitro* 代謝実験の経時変化の結果をもとに算出した。予測肝固有クリアランス (CL_{int}) は $CL_{int,micr}$ を用いて算出した。肝血流量と算出した CL_{int} を用い、肝クリアランス (CL_H) を算出した。計算は Kevin らの方法³⁾と Baranczewski らの方法⁷⁾を参考に行い、使用した公式については Table. 1 に記載した。

In vivo 代謝実験について、各 SCs の血中濃度は検量線を作成して測定した。その後、PK 解析ソフトを用い、2-コンパートメントモデルに当てはめて PK パラメーターを算出した。胆汁クリアランス (CL_{bile}) は検量線を作成して胆汁中排出量を算出し、血中薬物濃度の AUC_{0-240} で除すことで求めた。

4. 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 90%、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 °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 5 μ L として測定を行った。LCMS-IT-TOF は、イオン化法として positive electrospray ionization (ESI) 法を用い、測定範囲を m/z 100-700 として測定を行った。なお、イオン蓄積時間は 40 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 100 % で測定を行った。

5. データ解析

代謝物と考えられる溶出ピークから得られた MS² スペクトルのデータより、その構造を推定した。また、代謝物は溶出時間の早いものから順に命名した。最終的にすべての代謝物は以下の基準を満たすことを確認した。

- ① ブランクサンプル中に存在しない。
- ② 他の代謝物の同位体ではない。
- ③ プリカーサーイオンの精密質量が理論値から 5 ppm 範囲内である。
- ④ プロダクトイオンがプリカーサーイオンの部分構造として推定可能である。

C. 研究結果

1. *in vivo* 代謝実験における代謝挙動の解析

以前までの報告で胆汁サンプルより数種類の代謝物が検出されることが分かっている (Fig. 1 and Table. 2)。この結果と糞便サンプルから検出された代謝物を比較すると、胆汁で多く検出されていた代謝物 (各 SCs の一水酸化体) を確認することができた。これらの代謝物は最大で薬物投与後 48 時間まで検出することが可能であった。

2. HLMs と RLMs を用いた *in vitro* 代謝実験における代謝挙動の解析

ヒトとラットの代謝挙動の種差を確認するた

め、HLMs または RLMs を用いた *in vitro* 代謝実験を行い代謝挙動の比較を行った。

5F-CUMYL-PINACA について、代謝物の経時変化より推定される代謝経路に種差は確認されず、主要代謝経路は一水酸化体形成と酸化的脱フッ素に続くカルボキシ体形成であった。しかし、各タイムポイントにおける代謝物量に違いが確認された(Figs. 2)。また、確認された代謝物ピークの数にも違いが確認された (Fig. 3 and Table. 4)。

CUMYL-PINACA について、代謝物の経時変化より推定される代謝経路に種差は確認されず、主要代謝経路は一水酸化に続く抱合化またはカルボキシ体形成であった。しかし、各タイムポイントにおける代謝物量に違いが確認された(Figs. 4)。HLMs と RLMs で確認されたピークに違いは見られなかった (Fig. 3 and Table. 4)。

3. PK パラメーター算出と比較

算出した PK パラメーターについては Table. 5 に記載した。半減期 ($t_{1/2}$) について RLMs と HLMs の比較を行うと、5F-CUMYL-PINACA では $t_{1/2}$ (RLMs) < $t_{1/2}$ (HLMs) であり、CUMYL-PINACA では $t_{1/2}$ (RLMs) > $t_{1/2}$ (HLMs) であった。5F-CUMYL-PINACA と CUMYL-PINACA の比較では HLMs・RLMs とともに、5F-CUMYL-PINACA の半減期が長く、代謝抵抗性を示している可能性がある。

In vitro 代謝実験と *in vivo* 代謝実験の比較では、 CL_H が CL_{tot} よりも小さな値となった。胆汁クリアランスの値は CL_{tot} に比して小さく、胆汁中に代謝物が排出されるものの、その割合は全体として低いことが明らかとなった。

D. 考 察

糞便サンプルについて、胆汁で多く検出された代謝物 (一水酸化体) は糞便抽出液からも検出可能であることが明らかとなった。しかし、糞便サンプル処理に関して、採集の時間間隔が 24 時間と長く、その間に代謝物が減衰している恐れや、抽出が足りない恐れ等があるため、今後検討を行っていく必要がある。一方で、最長 48 時間サンプルまで検出可能であったことから、ヒトにおいても薬物摂取から 48 時間後まで摂取薬物の特定ができる可能性が示唆された。

In vitro 代謝実験による種差の確認について、HLMs と RLMs で主要代謝経路の違いは見られず、また主要代謝物についても、5F-CUMYL-PINACA では一水酸化体、CUMYL-PINACA では一水酸化に続いて形成されるカルボキシ体であり、違いは確認されなかった。これらのことより、ラットを用いた *in vivo* 代謝実験の結果から代謝経路と主要代謝物を推定し、それをヒトに外挿できる可能性が示唆された。

一方で、各タイムポイントにおける代謝物量について違いが確認された (Figs. 2 and 4)。この要因として、RLMs と HLMs における酵素活性の違いが考えられる。強く影響が考えられるのは、5F-CUMYL-PINACA では酸化的脱フッ素からケトン体形成時と、未変化体から一水酸化体形成時であり、CUMYL-PINACA では一水酸化体からケトン体形成時である。ラットにおいて、前述の代謝反応がヒトよりも進みやすいと考えられ、この種差によって、RLMs と HLMs の半減期についても違いが生じたと考えられる (Table. 5)。これらの代謝反応に関わる酵素種の特長については、今後さらなる検討が必要である。

PK パラメーターの比較について *in vitro* 代謝実験 (RLMs) と *in vivo* 代謝実験で、クリアランスの違いが確認された。以前までの研究より、ラットの血中と尿中から代謝物がほとんど検出されないこと、胆汁から代謝物が検出されたことから、肝代謝が主要であると考えられた。また、今回使用した SCs は組織移行性があり、2-コンパートメントモデルに従って血中から薬物が排出されると考えられている。今回行ったクリアランスの比較では、*in vitro* 代謝実験から算出した CL_H と、PK 解析ソフトにより算出された CL_{tot} の比較を行い、 CL_H が CL_{tot} よりも小さい値を示すことが明らかとなった。今回、 CL_H の算出の際に血中薬物遊離率 (f_u) を 1 として算出し、血中タンパク質との結合や脂溶性を考慮していないため、このような差異が生じたと考えられる。

E. 結 論

In vivo 代謝実験より、5F-CUMYL-PINACA、CUMYL-PINACA とともに胆汁から検出された主要代謝物が、糞便でも検出できることが明らかとな

った。また、糞便からの代謝物検出は最長で48時間経過サンプルまで可能であり、ヒトでも、糞便の採取により使用薬物を特定できる可能性が示唆された。

In vitro 代謝実験より、ラット肝ミクロソームとヒト肝ミクロソームともに、主要代謝経路と主要代謝物は同じであった。*In vivo* クリアランスは *in vitro* 予測クリアランスよりも大きな値を示し、これは *in vitro* からクリアランスを算出する際に、血中タンパク結合や脂溶性を考慮しなかったためであると考えられる。*In vitro* 代謝実験の結果から *in vivo* サンプルで検出される主要代謝物を特定すること、また、ヒトにおける代謝挙動の推定においてラットを用いた *in vivo* 代謝実験を行うことが有用であることが示唆された。

F. 参考文献

- 1) Kikura-hanajiri R 危険ドラッグの法規制と流通実態変化. 日本薬理学雑誌 150:129–134, 2017
- 2) Diao X, Huestis MA New synthetic cannabinoids metabolism and strategies to best identify optimal marker metabolites. Front Chem 7:1–15, 2019
- 3) Kevin RC, Lefever TW, Snyder RW, et al In vitro and in vivo pharmacokinetics and metabolism of synthetic cannabinoids CUMYL-PICA and 5F-CUMYL-PICA. Forensic Toxicol 35:333–347, 2017
- 4) Hasegawa K, Minakata K, Gonmori K, et al Identification and quantification of predominant metabolites of synthetic cannabinoid MAB-CHMINACA in an authentic human urine specimen. Drug Test Anal 10:365–371, 2018
- 5) Gray TR, Huestis MA Effect of hydrolysis on identifying prenatal cannabis exposure. 397:2335–2347, 2011
- 6) Erratico C, Negreira N, Norouzizadeh H, et al In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. Drug Test Anal 7:866–876, 2015
- 7) Baranczewski P, Stańczak A, Sundberg K, et al Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. Pharmacol Reports 58:453–472, 2006

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kadomura N, Ito T, Kawashima H, Matsuhisa T, Kinoshita T, Soda M, Kohyama E, Iwaki T, Nagai H, Kitaichi K. *In vitro* metabolic profiles of adamantyl positional isomers of synthetic cannabinoids. Forensic Toxicology 39:26-44, 2021

2. 学会発表

- 1) Kinoshita T, Matsuhisa T, Morikawa M, Ito K, Soda M, Tsukamoto K, Iwaki T, Tanaka H, Ito T, Kitaichi K. Evaluation of *in vitro* metabolism and extrapolation approaches between different species for synthetic cannabinoids. CINP 2021 VIRTUAL WORLD CONGRESS, 2021年2月26日-2月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

$t_{1/2} = \ln 2/k$	$t_{1/2} : \text{in vitro half-life}$
$CL_{\text{int.micr}} = k(\text{min}^{-1}) \times \frac{[V]_{\text{incubation}}(\mu\text{L})}{[P]_{\text{incubation}}(\text{mg})} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}(\text{min})} \times \frac{[V]_{\text{incubation}}(\mu\text{L})}{[P]_{\text{incubation}}(\text{mg})}$	$k : \text{elimination rate constant}$
$CL_{\text{int}} = k(\text{min}^{-1}) \times \frac{[V]_{\text{incubation}}(\mu\text{L})}{[P]_{\text{incubation}}(\text{mg})} \times \frac{[Liver](\text{g})}{[BW](\text{kg})} \times SF(\text{mg/g})$	$[V]_{\text{incubation}} : \text{incubation volume}$
$CL_{\text{H}} = \frac{Q \times f_u \times CL_{\text{int}}}{Q + (f_u \times CL_{\text{int}})}$	$[P]_{\text{incubation}} : \text{amount of microsomal protein in the incubation}$
$ER = \frac{CL_{\text{H}}}{Q}$	$[Liver] : \text{liver size}$
	$[BW] : \text{body size}$
	$SF : \text{scaling factor}$
	$Q : \text{hepatic blood flow}$
	$f_u : \text{free fraction in blood}$

Table. 1 Equations to calculate pharmacokinetic parameters in vitro

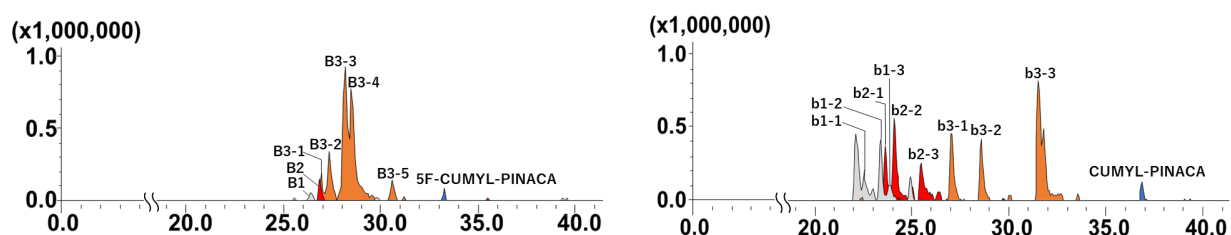


Fig. 1 Combined extracted ion chromatograms of metabolites of 5F-CUMYL-PINACA and CUMYL-PINACA detected from rat bile

Parent compound and Metabolites	Proposed metabolic pathway	Precursor ion		Product ions	bile	feces
		Measured m/z [M+H] ⁺	RT(min)	Measured m/z [M+H] ⁺		
B1	Defluorination+Monohydroxylation + ketone formation	380.1988	26.409	244 262	✓	
B2	Defluorination+Monohydroxylation	366.2166	26.827	248	✓	
B3-1	Monohydroxylation	384.2090	26.931	266	✓	
B3-2	Monohydroxylation	384.2075	27.348	249 266	✓	
B3-3	Monohydroxylation	384.2075	28.184	233 250	✓	✓
B3-4	Monohydroxylation	384.2069	28.497	233 250	✓	
B3-5	Monohydroxylation	384.2086	30.584	266	✓	
5F-CUMYL-PINACA	Parent	368.2142	33.194	233 250	✓	

Parent compound and Metabolites	Proposed metabolic pathway	Precursor ion		Product ions	bile	feces
		Measured m/z [M+H] ⁺	RT(min)	Measured m/z [M+H] ⁺		
b1-1	Dihydroxylation	382.2120	22.529	248	✓	
b1-2	Dihydroxylation	382.2122	23.402	231 248	✓	
b1-3	Dihydroxylation	382.2120	23.838	248	✓	
b2-1	Monohydroxylation + ketone formation	380.1953	23.620	229 246	✓	
b2-2	Monohydroxylation + ketone formation	380.1968	24.057	229 246	✓	
b2-3	Monohydroxylation + ketone formation	380.1985	25.475	246 262	✓	
b3-1	Monohydroxylation	366.2176	27.002	248	✓	
b3-2	Monohydroxylation	366.2166	28.584	248	✓	
b3-3	Monohydroxylation	366.2182	31.530	215 232	✓	✓
CUMYL-PINACA	Parent	350.2218	36.876	232	✓	

Table. 2 Metabolites of 5F-CUMYL-PINACA and CUMYL-PINACA detected from rat bile and their presence in rat bile and feces

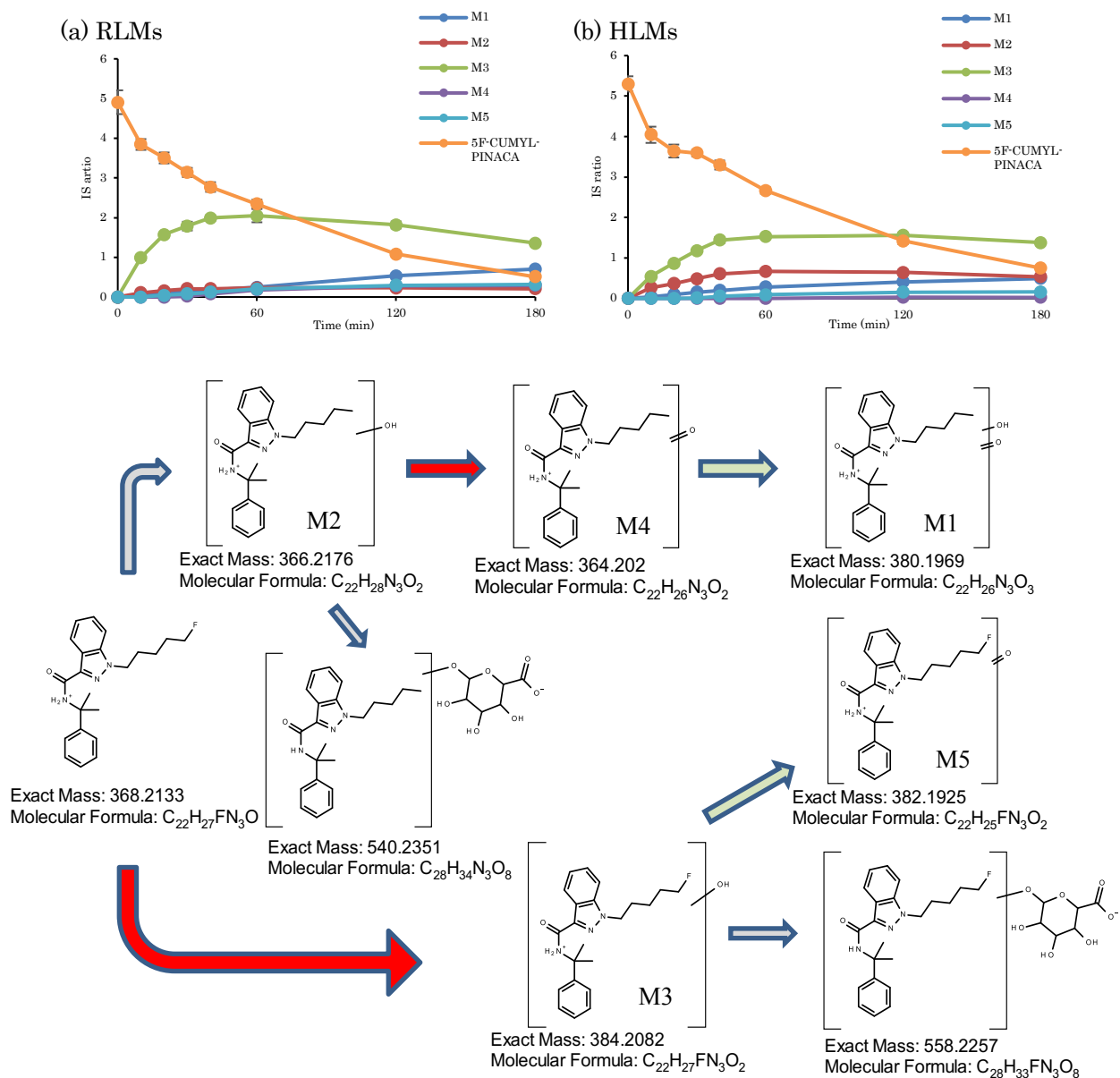


Fig. 2 Production of the metabolites of 5F-CUMYL-PINACA (a: using rat liver microsomes, b: using human liver microsomes) and proposed metabolic pathways

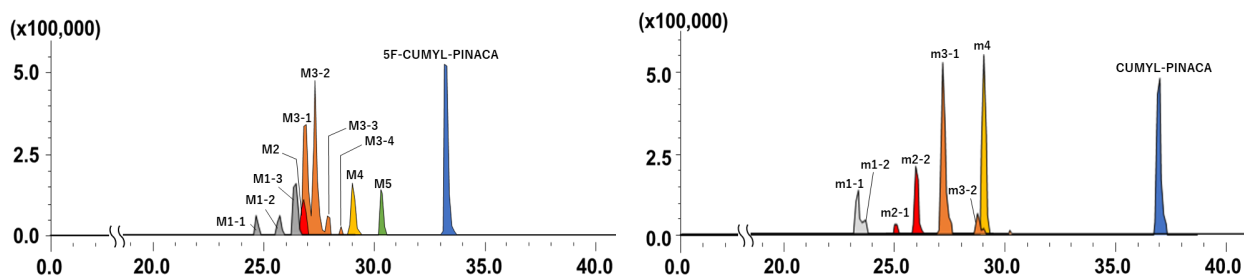


Fig. 3 Combined extracted ion chromatograms of metabolites of 5F-CUMYL-PINACA and CUMYL-PINACA after 4-h incubation with rat liver microsomes

Parent compound and Metabolites	Proposed metabolic pathway	Precursor ion		Product ions	rat liver microsomes	human liver microsomes
		Measured m/z [M+H] ⁺	RT(min)	Measured m/z [M+H] ⁺		
M1-1	Defluorination+Monohydroxylation + ketone formation	380.1966	24.634	262	✓	
M1-2	Defluorination+Monohydroxylation + ketone formation	380.1960	25.678	262	✓	
M1-3	Defluorination+Monohydroxylation + ketone formation	380.1973	26.409	244 262 324	✓	✓
M2	Defluorination+Monohydroxylation	366.2184	26.827	248	✓	✓
M3-1	Monohydroxylation	384.2071	26.931	249 266	✓	✓
M3-2	Monohydroxylation	384.2064	27.348	249 266	✓	✓
M3-3	Monohydroxylation	384.2097	27.870	266	✓	✓
M3-4	Monohydroxylation	384.2077	28.497	250	✓	✓
M4	Defluorination+ketone formation	364.2013	30.271	246	✓	✓
M5	Defluorination+Dihydroxylation	382.1926	29.019	264	✓	✓
5F-CUMYL-PINACA	Parent	368.2117	33.194	233 250	✓	✓

Parent compound and Metabolites	Proposed metabolic pathway	Precursor ion		Product ions	rat liver microsomes	human liver microsomes
		Measured m/z [M+H] ⁺	RT(min)	Measured m/z [M+H] ⁺		
m1-1	Dihydroxylation	382.2141	23.103	264	✓	✓
m1-2	Dihydroxylation	382.2128	23.474	264	✓	✓
m2-1	Monohydroxylation + ketone formation	380.1970	25.052	245 262	✓	✓
m2-2	Monohydroxylation + ketone formation	380.1979	25.887	245 262	✓	✓
m3-1	Monohydroxylation	366.2165	27.186	248	✓	✓
m3-2	Monohydroxylation	366.2167	28.763	248	✓	✓
m4	Ketone formation	364.2003	29.041	229 246	✓	✓
CUMYL-PINACA	Parent	350.2210	37.021	215 232	✓	✓

Table. 4 Metabolites of 5F-CUMYL-PINACA and CUMYL-PINACA following incubation with rat and human liver microsomes

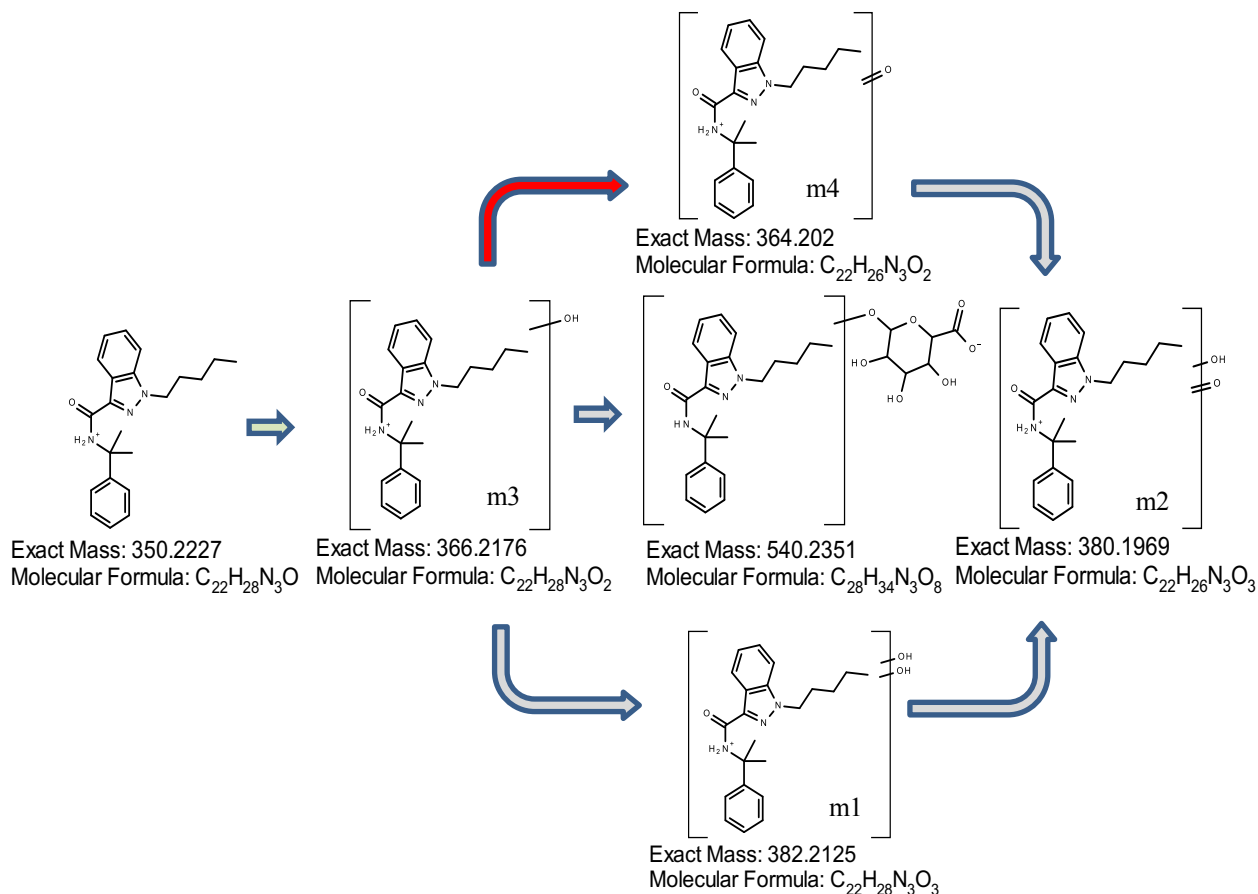
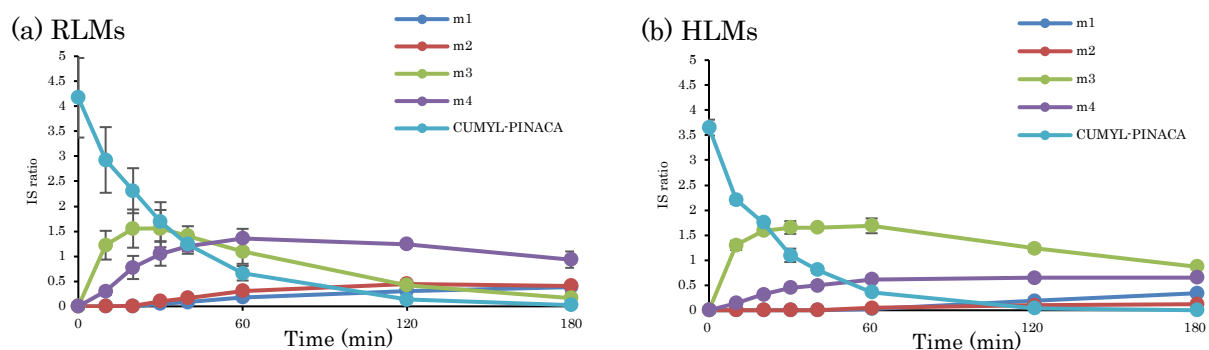


Fig. 4 Production of the metabolites of CUMYL-PINACA (a: using rat liver microsomes, b: using human liver microsomes) and proposed metabolic pathways

Pharmacokinetic parameter	rat liver microsomes	human liver microsomes
5F-CUMYL-PINACA		
Half-life (min)	56.82	67.30
CL_{int} (mL/min/kg body wt.)	19036.70	16071.97
CL_H (mL/min/kg body wt.)	19.98	19.98
CUMYL-PINACA		
Half-life (min)	24.41	18.39
CL_{int} (mL/min/kg body wt.)	44314.94	58826.53
CL_H (mL/min/kg body wt.)	19.99	19.99

Pharmacokinetic parameter	5F-CUMYL-PINACA	CUMYL-PINACA
Rat plasma		
Alpha Half-life (min)	3.88	4.40
Beta Half-life (min)	78.68	79.96
CL_{tot} (mL/min/kg body wt.)	73.61	33.23
$AUC_{0-\infty}$ (min*ng/mL)	7148.76	9774.95
AUC_{0-240} (min*ng/mL)	6292.17	8708.03
Rat bile		
CL_{bile} (mL/min/kg body wt.)	0.92	0.56

Table. 5 Pharmacokinetic parameters of 5F-CUMYL-PINACA and CUMYL-PINACA incubated in rat and human liver microsomes in vitro and rat plasma in vivo