

Metabolism and urine analysis of the new synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA

Florian Franz^{1,2,*}, Nadja Schwörer¹, Verena Angerer^{1,2}, Bjoern Moosmann¹, Volker Auwärter¹

¹Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, D-79104 Freiburg

²Universität Freiburg, Hermanstaudinger Graduiertenschule, Albertstraße 21, D-79104 Freiburg; *corresponding author: florian.franz@uniklinik-freiburg.de

Aim: The new synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA (often misleadingly sold as ‘MMB-CHMINACA’) is structurally related to AB-CHMINACA and was first seized in Europe by the Hungarian police in August 2014. From a clinical perspective these substances seem to be particularly problematic due to serious, sometimes life-threatening side effects. In our institute, in October 2014 the substance has been detected in several authentic serum samples and in November also in different herbal blends offered as a legal cannabis alternative. Because of the rapid spread of the drug we aimed to develop a robust method for the detection of this compound and its metabolites in urine samples. **Methods:** For identification of the main metabolites of MDMB-CHMICA an assay using pooled human liver microsomes (pHLM) was applied and the metabolic profile was compared to the profiles detected in authentic urine samples of patients who used the drug as proven by detection of MDMB-CHMICA in paired serum samples. Analytical methods applied for these studies comprised LC-ESI-MS/MS. **Results:** As main metabolites in the urine samples a cyclohexyl-methyl hydroxylated metabolite and the product of the methylester cleavage as well as the cyclohexyl-methyl hydroxylated metabolite of the ester cleavage product were identified. The corresponding ion transitions were integrated into an existing LC-MS/MS based screening method and the method was already successfully applied for the qualitative detection of the metabolites in authentic urine samples. The cyclohexyl-methyl hydroxylated metabolite is specific for MDMB-CHMICA. In contrast, the metabolites obtained after ester hydrolysis are likely to be also metabolites of the carboxamid analogue ADB-CHMICA. **Conclusion:** Metabolism of MDMB-CHMICA is very similar to AB-CHMINACA metabolism and is dominated by ester cleavage and hydroxylation. Increasing knowledge on metabolism of single compounds enables more reliable prediction of metabolic profiles of new compounds.

1. Einleitung

Seit dem Beginn des „Spice-Phänomens“ 2008 stieg die Anzahl neuer synthetischer Cannabinoide in „Legal High“-Produkten stark an [1,2]. Dabei wurden der Europäischen Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA) allein im vergangenen Jahr 30 neue synthetische Cannabinoide gemeldet [3]. Meist unterscheiden sich neue Verbindungen nur durch kleine strukturelle Modifikationen von bereits bekannten Substanzen. Die Strukturklasse der synthetischen Cannabinoide mit der derzeit höchsten Prävalenz auf dem deutschen und europäischen Markt zeichnet sich durch eine Valinderivat-Teilstruktur aus, die peptidartig mit dem obligatorischen Heteroaromaten verbunden ist. Substanzen dieser Klasse weisen oft extrem hohe Potenzen auf und führen nicht selten durch versehentliche Überdosierungen zu schweren Intoxikationen [4]. Eine diesbezüglich besonders kritische Substanz wurde erstmals im August 2014 nach einer Beschlagnahmung durch die ungarische Polizei-

behörde der EMCDDA gemeldet und verbreitete sich seit dem unter dem Namen „MDMB-CHMICA“ schnell auf dem deutschen und europäischen Markt [4]. Strukturell ähnelt MDMB-CHMICA dem ebenfalls weit verbreiteten synthetischen Cannabinoid AB-CHMINACA (Abb. 1). Über Internetanbieter ist MDMB-CHMICA oft auch unter der im Sinne der semisystematischen Underground-Nomenklatur falschen Bezeichnung „MMB-CHMINACA“ erhältlich. In der Fachliteratur sollte diese Bezeichnung nicht verwendet werden, da das „INA“ in „CHMINACA“ auf einen in der Molekülstruktur enthaltenen Indazol-Ring hinweist, wohingegen bei MDMB-CHMICA das „I“ für einen „Indol“ steht.

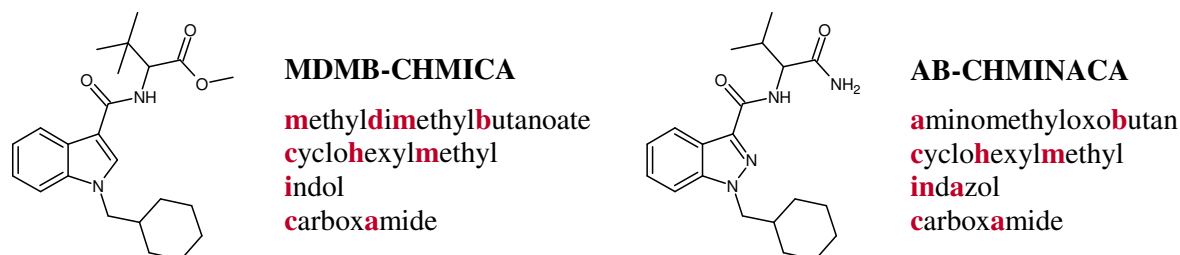


Abb. 1. Strukturen von MDMB-CHMICA und AB-CHMINACA mit Ableitung der Substanzkurzbezeichnung aus der jeweiligen IUPAC-Nomenklatur.

Im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg wurde MDMB-CHMICA erstmals im Oktober 2014 in mehreren Serumproben detektiert und im November auch in Räuchermischungen, die im Rahmen des EU-Projekts „SPICE II Plus“ durchgeführten Produkt-Monitorings erworben wurden (Abb. 2 und 3). Aufgrund der schnellen Verbreitung dieses Stoffs war es notwendig eine robuste Nachweismethode für MDMB-CHMICA beziehungsweise dessen Hauptmetaboliten in Urinproben zu entwickeln.



Abb. 2. MDMB-CHMICA-enthaltende Produkte (Analysen IRM Freiburg).

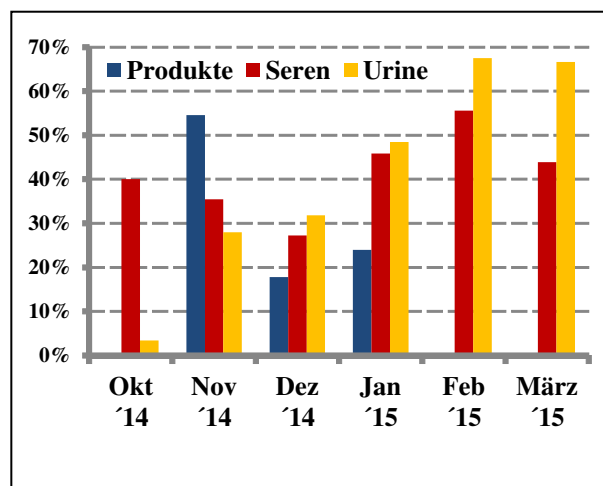


Abb. 3. MDMB-CHMICA-positive Proben im Verhältnis zu allen positiv getesteten Proben.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Ameisensäure (Rotipuran® $\geq 98\%$, p.a.), Kaliumhydrogenphosphat ($\geq 99\%$, p.a.) und 2-Propanol (Rotisolv® $\geq 99,95\%$, LC-MS grade) wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Acetonitril (LC-MS grade), Ammoniumformiat 10 M (99,995%), Kaliumhydroxid (puriss. p.a. $\geq 86\%$ (T) Pellets) und Superoxiddismutase (aus Rindererythrozyten) von

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) erworben. Gepoolte humane Lebermikrosomen (50 Spender) wurden ebenso wie die verwendeten NADPH-regenerierenden Lösungen A/B und Kaliumphosphatpuffer 0,5 M von Corning (New York, USA) bezogen. Der Referenzstandard MDMB-CHMICA wurde von Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA) gekauft. Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) produzierte die verwendete β -Gucuronidase (*E. coli* K 12). Deionisiertes Wasser wurde mittels eines Kartuschen-Entionisierers von Memtech (Moorenweis, Deutschland) aufbereitet. Leerurin eines freiwilligen Probanden wurde vor der Studie auf Abwesenheit von Metaboliten synthetischer Cannabinoide getestet.

Für die Analyse wurden die Fließmittel A (1 % ACN, 0.1 % HCOOH, 2 mM $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$ in Wasser) und B (ACN mit 0.1 % HCOOH, 2 mM $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$) verwendet.

2.2. Authentische Urinproben

Es wurden zwei Urinproben zur Metaboliten-Aufklärung verwendet, die Personen zuzuordnen waren, von denen zeitgleich abgenommene Serumproben positiv auf MDMB-CHMICA getestet wurden. Die Analysen wurden im Rahmen des Untersuchungsauftrags durchgeführt.

2.3. Aufarbeitung der Urinproben

Zur Probenaufarbeitung wurden 0,5 ml Urin aliquotiert. Zur Spaltung der Glucuronide wurden 0,5 ml Phosphatpuffer pH 6 und 30 μl β -Gucuronidase zugegeben und bei 45 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden je Probe 1,5 ml Acetonitril und 0,5 ml Ammoniumacetat-Lösung 10 M zupipettiert. Nach Schütteln und Zentrifugation wurde 1 ml der Acetonitril-Phase abgenommen und unter leichtem Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Die Rekonstitution erfolgte unmittelbar vor der Analyse in 200 μl Fließmittelgemisch A/B (70/30, v/v). Als Negativkontrolle wurden 0,5 ml eines Leerurins auf identische Weise aufgearbeitet.

2.4. Aufarbeitung der Referenzprobe (pHLM-Ansatz)

Als Referenzprobe zur Bestätigung der *in vivo* gefundenen Hauptmetaboliten wurde eine wässrige Lösung von MDMB-CHMICA (20 μM) mit gepoolten humanen Lebermikrosomen (pHLM) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von kaltem Acetonitril gestoppt und der Überstand nach Zentrifugation und Verdünnung (1:10) zur Analyse eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein pHLM-Ansatz ohne Substrat auf identische Weise aufgearbeitet.

2.4. Identifizierung der Hauptmetaboliten

Für die Untersuchung der Urinproben und pHLM-Ansätze wurde eine Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) gekoppelt mit einem QTRAPTM 5500 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle (SCIEX, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Kinetex[®] C₁₈ Säule (2,6 μm , 100 Å, 100×2.1 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) durch Gradientenelution mit den Fließmitteln A und B (Tab. 1) bei einer Gesamtflussrate von 0,5 ml/min. Für die Temperatur des Autosamplers wurde 10 °C gewählt, der Säulenofen wurde auf 40 °C temperiert. Nach der chromatographischen Trennung wurde Isopropanol mit einem Fluss von 0,2 ml/min zugeführt.

Das MS wurde im positiven Ionisationsmodus verwendet. Die Energieparameter für die charakteristischen Massenübergänge der Muttersubstanz wurden einzeln optimiert (Tab. 2) und in die Messmethoden aufgenommen.

Tab. 1. Fließmittelgradient der LC-Methode.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Gesamt-Flussrate [ml/min]
0,0	70	30	0,5
2,5	60	40	0,5
5,0	50	50	0,5
6,0	40	60	0,5
7,0	25	75	0,5
8,0	10	90	0,5
11,8	10	90	0,5
12,8	70	30	0,5
15,0	70	30	0,5

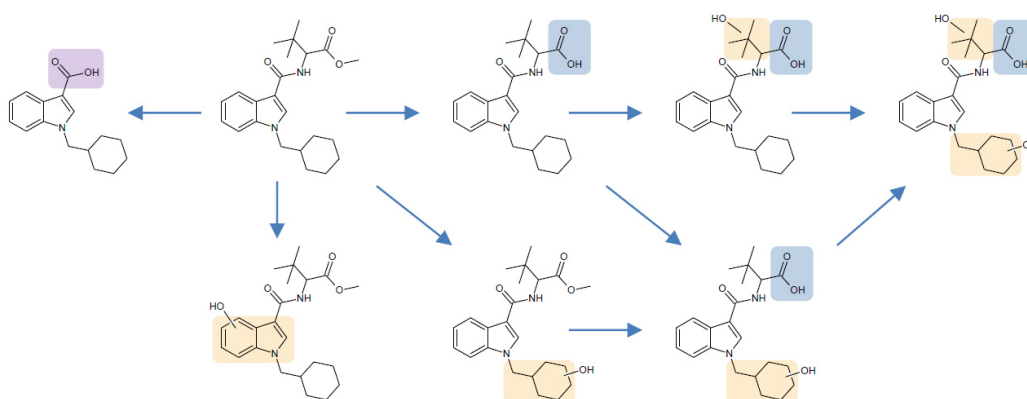
Tab. 2. Optimierte Energieparameter der charakteristischen Massenübergänge von MDMB-CHMICA.

Q1 [Da]	Q3 [Da]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
385	325	75	12	18	6
385	240	75	12	25	8
385	144	75	12	55	16

Zur Identifizierung der Metaboliten wurden Enhanced Product Ion (EPI) Spektren der zu erwartenden Massen aufgenommen und mit dem EPI-Spektrum der Muttersubstanz abgeglichen. Um auch unerwartete Metaboliten zu erfassen, wurden Precursor-Messungen (Prec) des charakteristischen zentralen Fragmentions mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) von 144 und seiner potentiell metabolisch modifizierten Äquivalente m/z 160 (monohydroxyliert), m/z 176 (dihydroxyliert) und m/z 179 (Dihydrodiol) aufgenommen. Detektierte Precursor-Ionen wurden über deren Produktions-Spektren charakterisiert. Das Metabolitenspektrum von MDMB-CHMICA und die relative Intensität der Metabolite zueinander wurde mit einem Multiple Reaction Monitoring (MRM) Scan der intensivsten Massenübergänge untersucht.

3. Ergebnisse und Diskussion

In den beiden untersuchten Urinproben wurden insgesamt zehn Metabolite identifiziert. Die Muttersubstanz selbst konnte in geringen Mengen in einer Urinprobe nachgewiesen werden.

Abb. 4. Identifizierte *in vivo* Metaboliten von MDMB-CHMICA.

Bei den detektierten *in vivo* Stoffwechselprodukten handelte es sich um Monohydroxylierungen der Muttersubstanz, das Produkt der Amidhydrolyse, das Ester-Spaltprodukt, sowie verschiedene Monohydroxylierungen und eine Dihydroxylierung des Esterspaltproduktes (Abb. 4). Abgesehen von einem Monohydroxy-Metaboliten des Esterspaltproduktes wurden von allen *in vivo* Metaboliten entsprechende Signale auch im pHLM-Ansatz erhalten.

Beispielhaft soll die Identifizierung des monohydroxylierten MDMB-CHMICA-Metaboliten mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) 401 (RT 5,7 min) durch Abgleich des Produktionenspektrums mit dem EPI-Spektrum der Muttersubstanz (m/z 385) erläutert werden (Abb. 5).

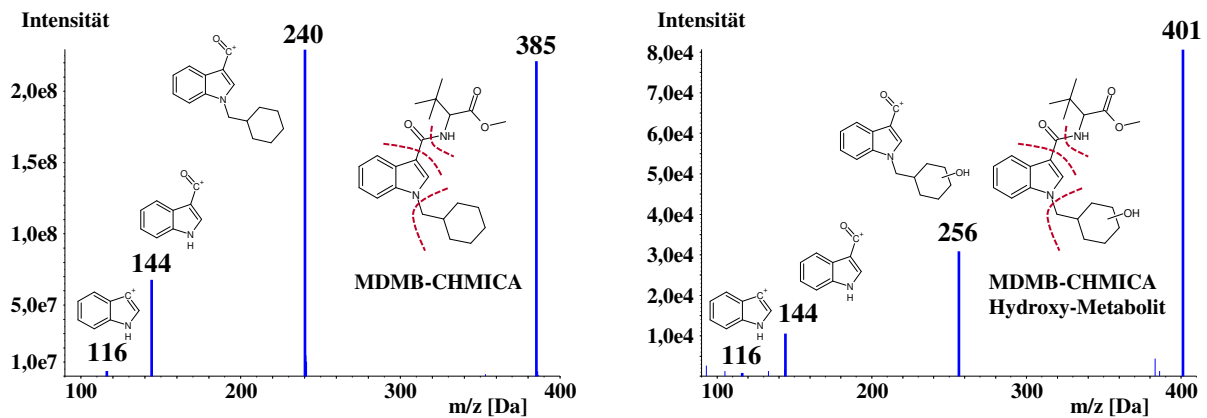


Abb. 5. Vergleich der EPI-Spektren der Referenzsubstanz MDMB-CHMICA und seines Monohydroxy-Metaboliten (RT 5,6 min) in der Urinprobe 2.

Das Signal bei m/z 401 stellt das unfragmentierte Precursor-Ion des Metaboliten dar, dessen Masse/Ladungs-Verhältnis im Vergleich zu dem Precursor-Ion der Muttersubstanz (m/z 385) um 16 Da erhöht ist. Eine Massenerhöhung um 16 Da spricht für eine einfache Oxidierung beispielsweise über eine CYP-katalysierte Monohydroxylierung. Durch Spaltung der Amidbindung entsteht im Falle der Muttersubstanz das intensive Fragmentation (m/z 240) und durch weitere Abspaltung der N-Alkylgruppe das Fragmentation m/z 144, welches durch eine erneute alpha-Spaltung zum Fragmentation m/z 116 führt. Im Vergleich mit dem EPI-Spektrum des Metaboliten zeigt sich ein sehr ähnliches Fragmentationenspektrum mit übereinstimmenden Ionen für m/z von 116 und 144 sowie einem intensiven Signal bei m/z 256. Die Signale m/z 116 und 144 beweisen, dass der Indol-Ring des Metaboliten unverändert vorliegt, wohingegen das Signal m/z 256 dem um 16 Da schwereren Fragmentation m/z 240 der Muttersubstanz entspricht. Somit kann die Strukturmodifikation (Hydroxylierung) am Cyclohexylmethyl-Rest des Metaboliten lokalisiert werden. Eine detaillierte Aufstellung aller detektierten Substanzen zeigt Tabelle 3.

Tab. 3. Detektierte *in vivo* Metaboliten von MDMB-CHMICA mit charakteristischen Massenübergängen. Mit Hilfe der Massenabweichung von der Muttersubstanz und der charakteristischen Fragmentationen kann die metabolische Modifikation des Moleküls auf einer Teilstruktur lokalisiert werden (Methylester-Bindung, Tertiärbutyl-Seitenkette (TB), Amidbindung, Indol-Ring oder Cyclohexylmethyl-Rest (CHM)).

Q1	Δ Q1 [Da]	Metabolit	RT [min]	Δ 144 [Da]	Δ 240 [Da]	Lokalisierung	Urin 1	Urin 2	pHLM
385	0	MDMB-CHMICA	7,6	0	0	-	+	-	+
401	+16	Mono-OH	5,9	+16	+16	Indol	+	-	+
401	+16	Mono-OH	5,7	0	+16	CHM	+	+	+
401	+16	Mono-OH	4,3	0	+16	CHM	+	+	+
371	-14	Esterhydrolyse (EH)	6,5	0	0	Ester	+	+	+
387	+2	EH + Mono-OH	4,7	0	0	TB	+	-	+
387	+2	EH + Mono-OH	3,8	0	+16	CHM	+	+	+
387	+2	EH + Mono-OH	2,4	0	+16	CHM	+	+	-
403	+18	EH + Di-OH	2,2	0	+16	CHM + TB	+	+	+
258	-127	Amidhydrolyse	4,6	0	0	Amid	+	-	+

Durch Betrachtung der Ionenübergänge aller identifizierten Metaboliten mittels einer MRM-Methode wurden ein Monohydroxy-Metabolit (RT 5,7 min), das Esterspaltprodukt (RT 6,5 min) und ein Monohydroxy-Metabolit des Esterspaltproduktes (RT 2,4 min) in beiden Urinproben als die intensivsten Metaboliten detektiert (Abb. 6).

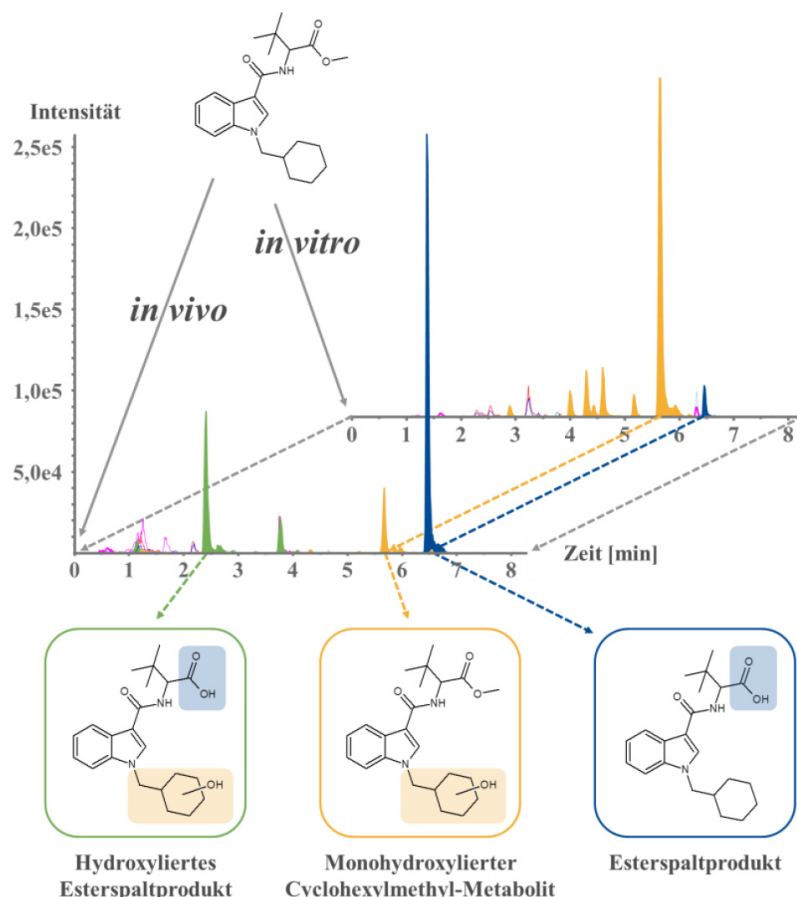


Abb. 6. Vergleich des *in vitro* und *in vivo* Metabolitenspektrums (Urin 1) von MDMB-CHMICA.

Damit eignen sich unter den gewählten Bedingungen die beschriebenen drei Hauptmetaboliten am besten für einen empfindlichen Nachweis einer Aufnahme von MDMB-CHMICA. Dabei ist zu beachten, dass der Monohydroxy-Metabolit als substanzspezifischer Metabolit für MDMB-CHMICA angesehen werden kann, wohingegen das Esterspaltprodukt und mehrfach metabolisierte Stoffwechselprodukte auch nach Konsum des Methylvalinamid-Analogs „ADB-CHMICA“ (Abb. 7) durch Amidhydrolyse und anschließende Hydroxylierung entstehen könnten. Eine Unterscheidung der Aufnahme beider Substanzen ist daher nur bei Nachweis spezifischer Metabolite möglich.

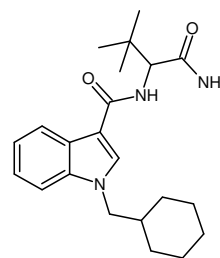


Abb. 7. Struktur von ADB-CHMICA.

Des Weiteren besteht eine Verwechslungsgefahr bei der Detektion von MDMB-CHMICA und BB-22 (QUCHIC) bzw. deren Metaboliten, sofern keine hochauflösenden massenspektrometrischen Verfahren verwendet werden (die jeweiligen Precursor weisen übereinstimmende Nominalmassen auf und es liegen identische Fragmente vor) (Abb. 8).

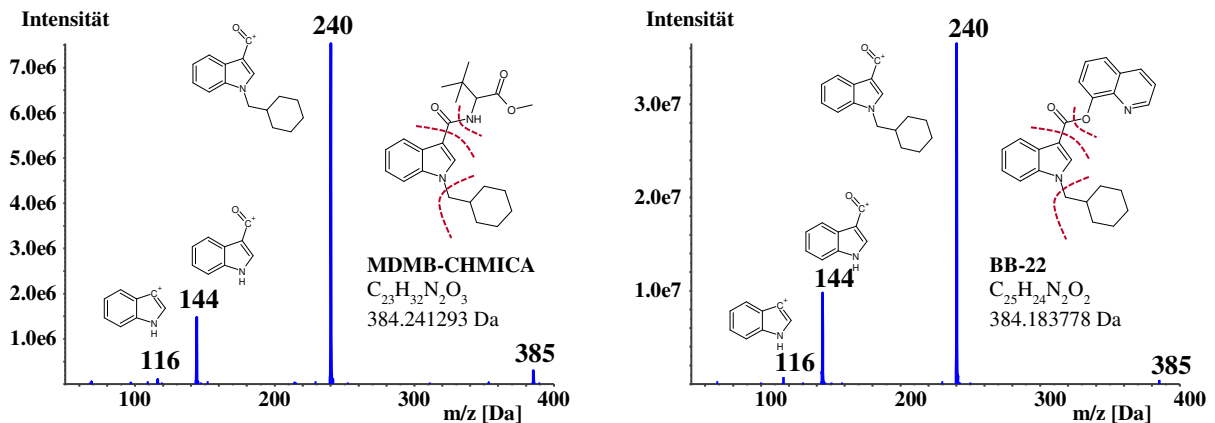


Abb. 8. Vergleich der EPI-Spektren von MDMB-CHMICA und BB-22 mit Angabe der monoisotopischen Massen.

4. Schlussfolgerung

MDMB-CHMICA ist derzeit eines der am häufigsten konsumierten synthetischen Cannabinoide. Das Metabolitenspektrum dieses Stoffs ähnelt qualitativ dem des AB-CHMINACA und zeichnet sich überwiegend durch Hydroxylierungen des Cyclohexylmethyl-Restes und Esterhydrolyse aus [5]. Mit zunehmender Kenntnis des Metabolismus einzelner Wirkstoffe werden immer genauere Vorhersagen zu den metabolischen Profilen neuer Substanzen möglich, die eine schnellere Identifizierung geeigneter Biomarker für den Konsumnachweis in Urinproben zulassen. Zur eindeutigen Unterscheidung eines Konsums von MDMB-CHMICA und BB-22 ist die Verwendung von geprüftem Referenzmaterial oder der Einsatz hochauflösender Massenspektrometrie zwingend erforderlich. Die Verwendung humaner Lebermikrosomen für *in vitro* Assays liefert in der Regel eine gute Übereinstimmung zu dem *in vivo* festgestellten Metabolitenspektrum und ist daher für eine schnelle Identifizierung potentieller Hauptmetaboliten geeignet. Solange zertifizierte Referenzstandards kommerziell nicht erhältlich sind, bietet sich auch eine Verwendung als Kontrollprobe und der Einsatz zur Optimierung der MS-Methodenparameter an.

5. Referenzen

- [1] Auwärter V, Dresen S, Weinmann W, Müller M, Pütz M, Ferreiros N. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *J Mass Spectrom* 2009;44:832–837.
- [2] Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Kawahara N, Haishima Y, Goda Y Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product. *Chem Pharm Bull* 2009;57:439-441.
- [3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2015), New psychoactive substances in Europe. An update from the EU Early Warning System (March 2015), Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- [4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) Reporting forms von AB-CHMINACA, AB-PINACA, AB-FUBINACA, ADB-CHMINACA, ADB-FUBINACA und MDMB-CHMICA einsehbar über die EDND-Datenbank der EMCDDA.
- [5] Erratico C, Negreira N, Norouzizadeh H, Covaci A, Neels H, Maudens K, L.N. van Nuijs A In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. *Drug Test Analysis* DOI: 10.1002/dta.1796