

Energy-resolved Mass Spectrometry for Positional Isomer Differentiation of New Psychoactive Substances

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2020-01-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00056477

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博士論文要旨

Energy-resolved Mass Spectrometry for Positional Isomer Differentiation of New Psychoactive Substances

エネルギー分解質量分析法による新規乱用薬物の
位置異性体識別に関する研究

金沢大学大学院自然科学研究科
物質化学専攻

村上 貴哉

Abstract

Recently, novel synthetic abused drugs, generally referred to as new psychoactive substances (NPSs), have rapidly emerged worldwide and pose a serious threat to public health and safety. These compounds are structurally related to their controlled illegal counterparts, featuring only slight structural changes introduced in response to existing legal controls. Forensic drug analysis relies on structural isomer differentiation to determine whether an NPS falls under the current legal restrictions. However, *ortho*-, *meta*-, and *para*-ring-fluorinated positional isomers of synthetic cannabinoids and synthetic cathinones, major emerging classes of NPSs, exhibit similar chromatographic properties and nearly identical mass spectra, making them difficult to distinguish. Herein, a novel and practical method for differentiating the ring-fluorinated synthetic cannabinoids and synthetic cathinones was developed based on energy-resolved mass spectrometry (ERMS). The *o*-, *m*-, and *p*-fluorine positional isomers exhibited differences in relative abundances of the product ions containing a positional isomeric moiety in the respective ERMS. Logarithmic plots of the abundance ratio of the product ions as a function of collision energy allowed the three isomers to be unambiguously and reliably differentiated. The usefulness of derivatization method with a benzyltrimethylammonium hydroxide (Triton B)-mediated one-pot reaction for differentiation of the ring-fluorinated synthetic cathinones, was also demonstrated. In addition, a highly class-selective extraction method was developed for identifying synthetic cathinones from urine and whole blood samples by exploiting a molecularly imprinted polymer solid-phase extraction cartridge. The present methodologies will contribute significantly to drug identification in the forensic, therapeutic, and clinical fields.

1. 緒言

近年, new psychoactive substances (NPSs ; 我が国では危険ドラッグ) と呼ばれる新規乱用薬物の摂取が原因となる中毒・死亡事案や交通事件が度々発生し, 大きな社会問題となった. これを受け, 厚生労働省は法律の省令を随時改正して規制薬物の数を増加させ (2019年6月時点で麻薬197種, 指定薬物2,378種), 薬物乱用の抑止に努めてきた. しかし, 法の網を逃れるかのように化学構造を僅かに改変させたNPSsが次々と流通し, まさに“いたちごっこ”の状態が続いている.

薬物事犯においてその罪を問う場合, 規制薬物の所持や使用を科学的に立証することが必要である. 法科学分野における薬物分析では, 通常, ガスクロマトグラフ質量分析法や液体クロマトグラフ質量分析法を用い, 得られた保持時間やマススペクトルから薬物の化学構造を推定し, 化学構造が既知の標準品のデータと比較・対照したのち, 薬物構造を最終同定する. しかし, “いたちごっこ”によって蔓延したNPSsの中には, 置換されている原子団の位置だけが異なる「位置異性体」が数多く存在しており, これらは, その酷似した化学構造ゆえ, 分析データに違いが得られにくく正確な構造決定が難しい. とりわけ, NPSsの主たる薬物群である合成カンナビノイド類やカチノン類の芳香環上にフッ素を有する薬物の *ortho*, *meta*, *para*位置異性体は, 保持時間が互いに近接するだけでなく, マススペクトルもほぼ同一のパターンを示すことから, これらを識別することは非常に困難である. 現状の法律では, Fig. 1のようにフッ素の結合位置によって法規制の可否が異なるNPSsが多く存在することから, これらを確実に識別できる分析法の確立が喫緊の課題であった.

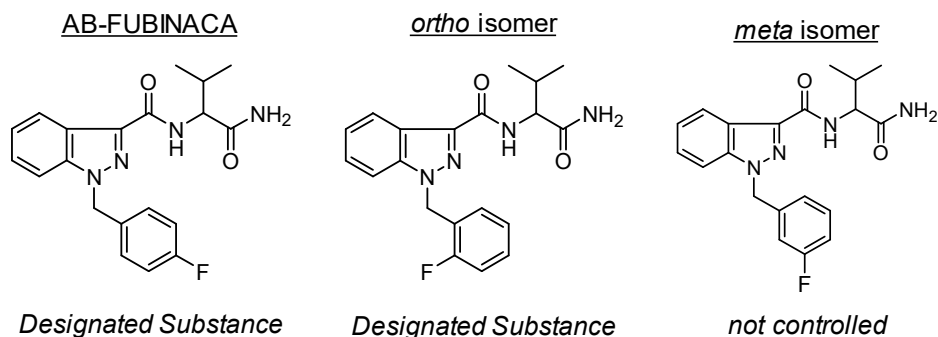


Fig. 1 AB-FUBINACA (*para*) and its fluorine positional (*ortho* and *meta*) isomers.

そこで本研究では, 芳香環上にフッ素を有する合成カンナビノイド類やカチノン類の位置異性体を信頼性高く明確に識別することを目的とし, 「エネルギー分解質量分析法 (energy-resolved mass spectrometry, ERMS)」に着目した新たな分析法の開発を試みた (下記第 2~6 項). また, 「芳香族求核置換 (S_NAr) 反応」を用いた誘導体化法により, 分析対象をフッ素の結合位置の判別が容易な構造体へ変化させることで位置異性体識別が可能かについても検討した (下記第 7 項).

加えて, カチノン類の生体試料中からの新たな抽出法の開発も行った. 液性を問わず鑄型に適合する構造体のみを選択的に捕捉することが可能な分子鑄型ポリマーを充填剤とする固相抽出法 (MIP-SPE) をカチノン類の抽出に応用し, その有用性を評価した (下記第 8 項).

2. エネルギー分解質量分析法 (ERMS)

トリプル四重極型やイオントラップ型などのコリジョン機能を備えた質量分析装置は、イオン化によって生成した特定のフラグメントイオン（プリカーサーイオン）に、コリジョンエネルギー（CE）を与えて衝突誘起解離させることで、さらに開裂が進行したフラグメントイオン（プロダクトイオン）を得ることができる。ERMSは、CEを任意に変化させて、各CE値におけるプロダクトイオンデータをクロマトタイムスケールで取得する分析法であり、活性化に伴うプリカーサーイオンの開裂挙動を詳細に追跡することが可能である。本研究では、トリプル四重極型質量分析装置（QqQ-MS）を用いてERMSを行い、得られるプロダクトイオンの種類や収量変化を各異性体間で比較・評価した。

3. エネルギー分解質量分析法による AB-FUBINACA の位置異性体識別

芳香環上にフッ素を有する合成カンナビノイド類のうち、流通が顕著に認められるものの1つにAB-FUBINACAがある。Fig. 1に示したように、AB-FUBINACA (*para* 体) およびその *ortho* 体は指定薬物として法規制されているが、*meta* 体は法規制の対象外である。

この3つの位置異性体について、フルスキャンスペクトルの主たるフラグメントイオンである m/z 253 ($[M-NHCH(i-Pr)CONH_2]^+$) をプリカーサーイオンとして、電子イオン化(EI)-QqQ-MSを用いたERMSを行った。その結果、観測されたプロダクトイオンの種類はCE値を問わず異性体間で同一であったが、CEに対するプロダクトイオンのシグナル強度変化を示すブレイクダウン図 (Fig. 2) より、 m/z 109 (フルオロベンジルカチオン) と m/z 253 のシグナル強度が異性体間で僅かに異なることがわかった。そこで、 m/z 109 の m/z 253 に対するシグナル強度の比の対数値 $\ln(A_{109}/A_{253})$ を各CE値に対してプロットしたところ、各異性体のプロットは良好な直線性を示し、 $\ln(A_{109}/A_{253})$ 値は、いずれのCE値においても $meta < ortho < AB-FUBINACA (para)$ の関係にあることが明らかとなった (Fig. 3)。これはすなわち、インダゾール部位からのフルオロベンジル基の脱離のしやすさは、芳香環上のフッ素の結合位置によって異なり、まさに上記の関係にあると言い換えることができる。密度汎関数法によって算出されたインダゾール-フルオロベンジル間の解離エネルギーは $para < ortho < meta$ の関係であったことから、本反応は $meta < ortho < para$ の順で生じやすいと判断され、ERMSで得られた結果を支持した。

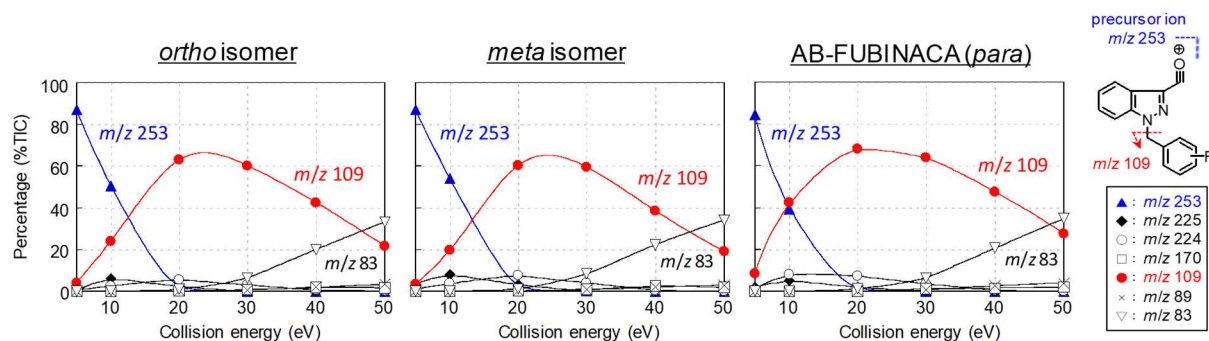


Fig. 2 Breakdown curves of AB-FUBINACA (*para*) and its fluorine positional (*ortho* and *meta*) isomers in the CE range of 5–50 eV. The precursor ion was set at m/z 253.

以上のように、ERMSを行い、複数のCE値において $meta < ortho < para$ の関係性を確認することによって、信頼性高く明確に AB-FUBINACA とその位置異性体を識別することができた。

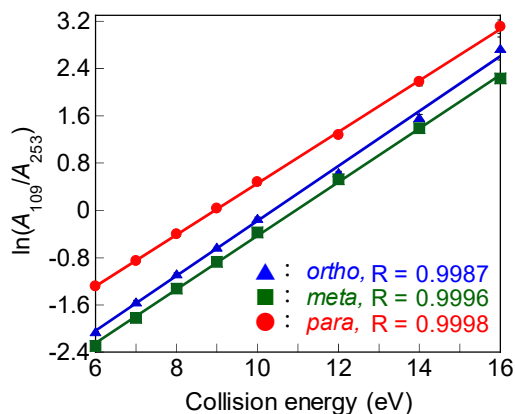


Fig. 3 Logarithmic plots of the abundance ratios of the m/z 109 ion to the 253 ion [$\ln(A_{109}/A_{253})$] of AB-FUBINACA (*para*) and its fluorine positional (*ortho* and *meta*) isomers.

4. モデル化合物を用いた合成カンナビノイド類のフッ素の結合位置の特定

Fig. 4 に示すような AB-FUBINACA と同様の化学構造を有する NPSs の流通・乱用も散見されている。そこで、これらに共通の構造を有するモデル化合物 1-[1-(2-, 3-, 4-fluorobenzyl)-1*H*-indazol-3-yl]ethenones (*o*-, *m*-, *p*-FUBINAEs) を合成し、以下に示すアプローチでフッ素の結合位置を識別した。

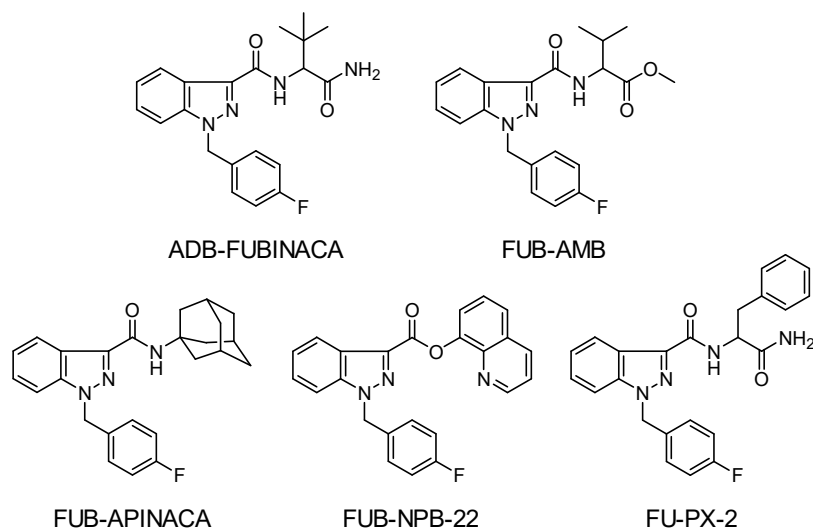


Fig. 4 Synthetic cannabinoids containing a fluorobenzyl group at the N-1 position.

モデル化合物 *o*-, *m*-, *p*-FUBINAEs のフルスキャン分析より、 m/z 253 のフラグメントイオンを確認できたことから、これをプリカーサーイオンとして ERMS を行った。その結果、 $\ln(A_{109}/A_{253})$ プロットは前項と同じく $meta < ortho < para$ の関係にあることがわかり、さらに、*o*-, *m*-, *p*-FUBINAEs のプロットと AB-FUBINACA の各位置異性体のプロットを重ね合わせた

ところ、フッ素の結合位置に応じてプロットはそれぞれ一致することが明らかとなった (Fig. 5). Fig. 4 に示す各種合成カンナビノイド (ADB-FUBINACA, FUB-AMB, FUB-APINACA, FUB-NPB-22, FU-PX-2 : すべてフッ素の位置は *para*) および実際の危険ドラッグ製品 (AB-FUBINACA を含有するハーブ製品) のメタノール抽出物についてもプロットを重ね合わせたところ、いずれのプロットも *p*-FUBINAE のプロットと一致した (Fig. 6). 以上の結果より、モデル化合物のプロットと分析対象である危険ドラッグのプロットを対照することによって、フッ素の結合位置を容易に識別できることが示された。

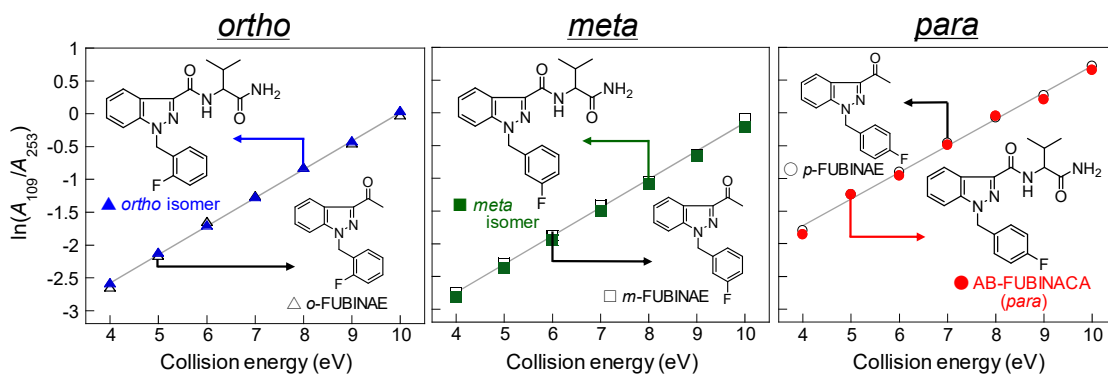


Fig. 5 Comparisons of the $\ln(A_{109}/A_{253})$ plots of *o*-, *m*-, and *p*-FUBINAEs with those of the AB-FUBINACA positional isomers.

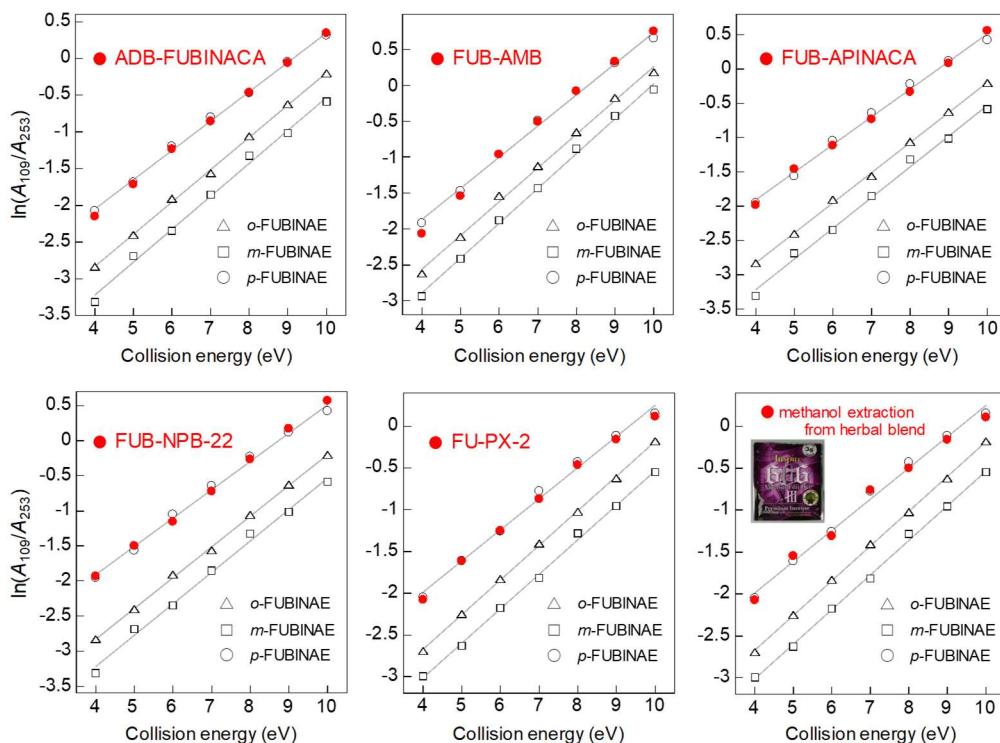


Fig. 6 Comparisons of the $\ln(A_{109}/A_{253})$ plots of ADB-FUBINACA, FUB-AMB, FUB-APINACA, FUB-NPB-22, FU-PX-2, and methanol extract from herbal blend containing AB-FUBINACA with a set of *o*-, *m*- and *p*-FUBINAEs.

5. AB-FUBINACA と 5 種の位置異性体の識別分析

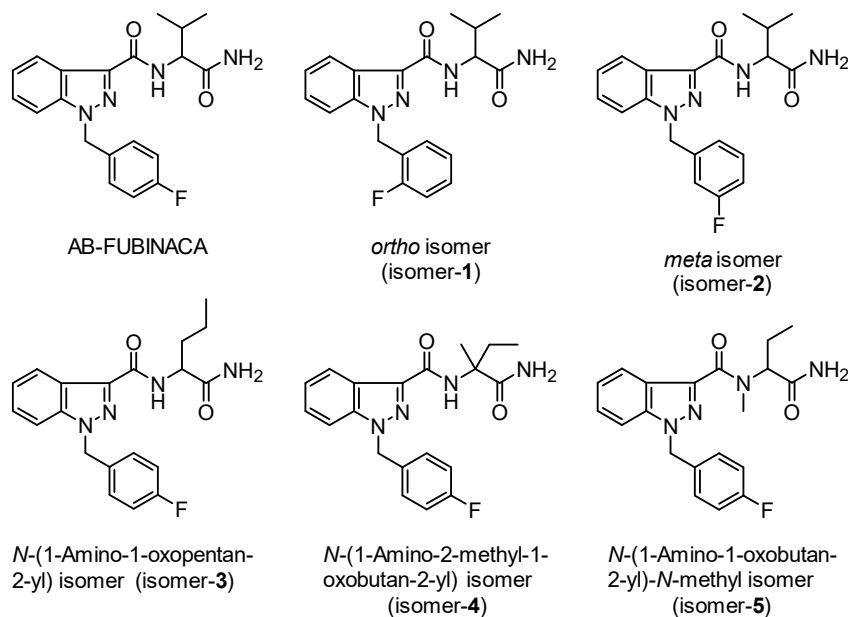


Fig. 7 AB-FUBINACA and its five positional isomers.

前記第 3 項では、EI-QqQ-MS を用いた ERMS により、AB-FUBINACA の位置異性体を識別することに成功した。そこで、本識別法の有用性を高めるため、EI 法とは異なるイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、さらに AB-FUBINACA の側鎖のメチル基に関する位置異性体も含めた計 6 化合物 (Fig. 7) について相互に識別が可能か検証した。

位置異性部位を含む特徴的なプロダクトイオン 2 種を選び出し、それらのシグナル強度の比の対数値を比較したところ、Fig. 8 のように、CE が 0–10 eV の範囲で $\ln(A_{352}/A_{369})$ 値は isomer-3 < isomer-4 < isomer-5、5–20 eV で $\ln(A_{324}/A_{352})$ 値は isomer-5 < isomer-4 < isomer-3、15–30 eV で $\ln(A_{253}/A_{324})$ 値は AB-FUBINACA < isomer-4 < isomer-3、20–50 eV で $\ln(A_{109}/A_{253})$ 値は isomer-2 < isomer-1 < AB-FUBINACA の関係にあることがわかり、これらを総合的に判断することによって各位置異性体を識別することができた。

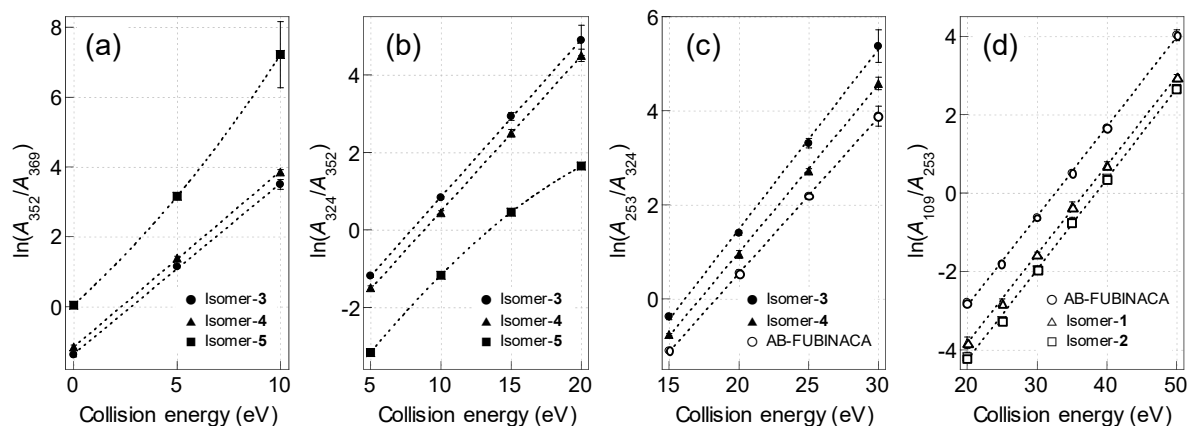


Fig. 8 Logarithmic plots of the abundance ratios of (a) m/z 352 to 369 at CE of 0–10 eV for isomers-3, -4, and -5, (b) m/z 324 to 352 at 5–20 eV for isomers-3, -4, and -5, (c) m/z 253 to 324 at 15–30 eV for AB-FUBINACA, isomers-3, and -4, and (d) m/z 109 to 253 at 20–50 eV for AB-FUBINACA, isomers-1, and -2.

6. エネルギー分解質量分析法による Fluoromethcathinone の位置異性体識別

芳香環上にフッ素を有する NPSs は合成カンナビノイド類に限らず、カチノン類にも数多く存在する。そこで、2-, 3-, 4-fluoromethcathinones (*o*-, *m*-, *p*-FMCs, Fig. 9) を分析対象とし、ERMS による位置異性体識別法がカチノン類にも適用可能か検証した。

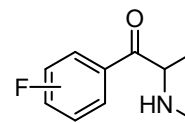


Fig. 9 Fluoromethcathinones.

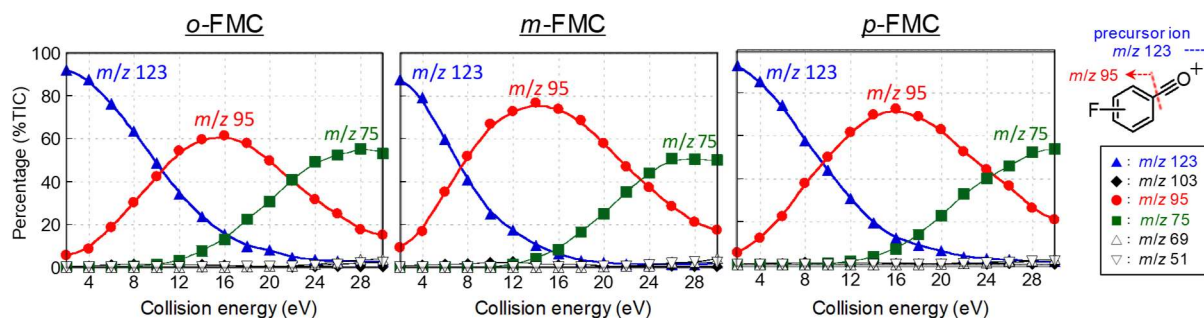


Fig. 10 Breakdown curves of the trifluoroacetyl derivatives of *o*-, *m*-, and *p*-FMCs in the CE range of 2–30 eV. The precursor ion was set at *m/z* 123.

EI-QqQ-MS を用い、イオン化によって生じる *m/z* 123 (フルオロベンゾイルカチオン) をプリカーサーイオンとした ERMS を行うことで、*m/z* 95 (フルオロフェニルカチオン) と *m/z* 123 のシグナル強度が異性体間で僅かに異なることがわかった (Fig. 10) . *m/z* 95 の *m/z* 123 に対するシグナル強度の比の対数值 $\ln(A_{95}/A_{123})$ を比較したところ、いずれの CE 値でも *ortho* < *para* < *meta* の関係にあることが明らかとなり、各異性体を明確に識別することができた (Fig. 11) . 本関係性は、フルオロベンゾイルカチオンから CO が脱離する際の解離エネルギーがフッ素の結合位置によって異なることに起因しており、密度汎関数法による計算結果がこれを支持した。FMC を含有する実際の危険ドラッグ製品にも本識別法を適用したところ、すべての試料で FMC のフッ素の結合位置を特定することができた。

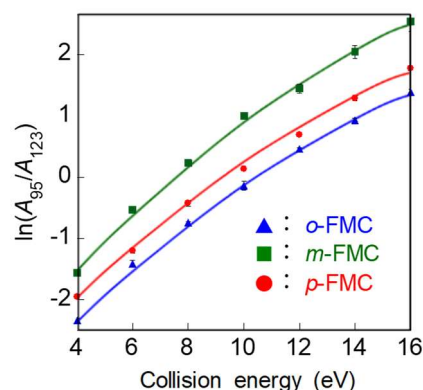


Fig. 11 Logarithmic plots of the abundance ratio of the *m/z* 95 ion to the 123 ion [$\ln(A_{95}/A_{123})$] of the trifluoroacetyl derivatives of *o*-, *m*-, and *p*-FMCs.

7. 芳香族求核置換反応による Fluoro- α -pyrrolidinopropiophenone の位置異性体識別

前述の ERMS に基づく識別法とは異なる方法論として、分析対象に S_NAr 反応による誘導体化を行い、得られた反応生成物の保持時間やマススペクトルの違いから位置異性体識別が可能か検証した。

芳香環上にフッ素を有するカチノン類 2-, 3-, 4-fluoro- α -pyrrolidinopropiophenones (*o*-, *m*-, *p*-FPPPs, Fig. 12) を分析対象と

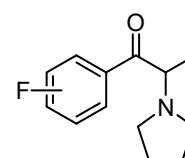


Fig. 12 Fluoro- α -pyrrolidinopropiophenones

して、benzyltrimethylammonium hydroxide (Triton B) 存在下でメタノールを求核試薬とした芳香族アルコキシル化反応を行った。p-FPPP については、*para* 位のフッ素をメトキシ基へ変換することができた。一方、*o*-FPPP および *m*-FPPP では目的の反応は進行しなかったが、2,3-エナミン体にピロリジン環が付加したと示唆される新たな化合物の生成が確認された。得られた各反応生成物の保持時間やマススペクトルは明確に異なっており、これに基づき FPPP のフッ素の結合位置を識別することができた。

8. 分子鑄型ポリマー固相抽出法によるカチノン類の生体試料中からの高選択的抽出

カチノン類を生体試料中から高選択的に抽出できる前処理法の開発を試みた。MIP は、ターゲット分子を構造的かつ化学的に捕捉できる高架橋特殊ポリマーである。これを固相充填剤とすれば、液性を問わず鑄型に適合する構造体を高選択的に抽出することが可能である。カチノン類は覚醒剤と酷似した化学構造を有していることから、覚醒剤類に高い親和性を示す MIP-SPE カートリッジ AFFINILUTE MIP-Amphetamines をカチノン類の抽出に応用した。分析対象として、methcathinone, methylone, ethcathinone, buphedrone, pentedrone, hexedrone, mephedrone, 4-ethylmethcathinone, methedrone, flephedrone, brephedrone の計 11 種のカチノン類を用いた。

まず、MIP へロードする際の試料溶液の液性を pH 4–10 の範囲で変化させ、標準溶液の回収率を比較したところ、pH 6 で最も高い回収率を得ることができた。カチノン類の分子構造と回収率の相関から、側鎖アルキルの伸長は回収率を徐々に低下させるが、芳香環上の *para* 位の置換基の種類や有無は回収率に大きな影響は与えないことがわかった。尿への添加回収試験を行ったところ、回収率は従来法であるポリマー系 SPE や液々抽出法と比べ同程度もしくはそれ以上の良好な結果を示し、マトリクス効果は数%程度と非常に低い値であった。また、血液試料でも尿試料と同程度の回収率を達成した。

9. 結言

本研究では、ERMS や S_NAr 反応に基づく新たな位置異性体識別法を構築し、これまで識別が困難であった合成カンナビノイド類やカチノン類のフッ素の位置異性体を信頼性高く明確に識別することに成功した。また、カチノン類をターゲットとした MIP-SPE を開発し、生体試料中からの高選択的な抽出能を実証した。これらの成果は、法科学分野のみならず中毒学や臨床医学など多方面の分野でも有用であると考えられる。我が国の NPSs の流通は、取締りや法規制の強化により現在のところ収束傾向にあるが、世界に目を向ければ今なお新たな NPSs が次々と出現している。国内への流入阻止や健康危害防止のためにも、今後も継続的に NPSs の流通動向を監視し、科学的なデータの蓄積や新たな分析法の開発・高度化に努めていかななくてはならない。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

エネルギー分解質量分析法による新規乱用薬物の位置異性体識別に関する研究

2. 論文提出者 (1) 所属 物質化学 専攻

(2) 氏名 村上 貴哉

3. 審査結果の要旨（600～650字）

提出学位論文について、各審査委員が個別に審査した後、令和元年7月18日に予備審査会を実施した。令和元年7月30日に行われた口頭発表会に引き続き、審査員による審査委員会を開催し、以下のとおり判定した。

化学構造をわずかに改変させながら次々と生み出される新規乱用薬物（危険ドラッグ）に対して、違法性を精確に判断できる新しい新規分析法の開発が求められている。本論文では、構造決定が難しい合成カンナビノイド類やカチノン類について、エネルギー分解質量分析法を駆使した定量的解析により位置異性体を識別する新たな方法論を確立した。芳香族求核置換反応による誘導體化を同質量分析法と組み合わせて、芳香環上にフッ素を有する合成カンナビノイド類やカチノン類の位置異性体を識別する手法を開発するとともに、モデル化合物に適用してフッ素の結合位置も特定できることを明らかにした。さらに、カチノン類をターゲットとした分子鋳型ポリマーを充填剤とする新規固相抽出法を開発し、生体試料からカチノン類を高選択的に抽出できることを実証した。

以上、本研究は、これまで識別が困難であった新規乱用薬物のフッ素の位置異性体を信頼性高く同定するための新しい解析法を開拓するものであり、分析化学分野のみならず法科学や中毒学の発展に貢献することが期待される。従って、本論文は博士（工学）の学位に値するものと判断する。

4. 審査結果 (1) 判定（いずれかに○印） ○合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士（工学）