

Structural Characterization of Cathinone-type Designer Drugs by Mass Spectrometry and Its Application to the Investigation of Drug Metabolism

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-03-17 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/2297/00061380

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



博士論文要旨

質量分析法によるカチノン系乱用薬物の 構造識別と代謝研究への適用

Structural Characterization of Cathinone-type Designer Drugs by Mass Spectrometry and Its Application to the Investigation of Drug Metabolism

金沢大学大学院自然科学研究科
物質化学専攻

松田 駿太郎

Abstract

Cathinone-derived designer drugs (CATs) are structural analogs of cathinone, which is an active component of Khat (evergreen tree leaves). CATs exert excitatory effects on the central nervous system in the same way as typical stimulants. Variations in the CAT structure usually consist of modifications to the type of amine groups, substituents added on the benzene ring, and alteration to the alkyl chain length. Most modifications are subtle and their similarities could cause misidentification of chemical structures in drug tests of CATs. It has therefore become essential in the field of forensic science to identify the slightly modified structures of CATs. In this thesis, the structural characterization methods for CATs have been established based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In addition, the metabolic pathways of three α -pyrrolidinophenones (α -PBP, α -PHP and α -PHPP) have been investigated in humans, and the influence of the chemical structure (i.e., alkyl chain length) on the metabolism of α -pyrrolidinophenones was discussed in detail. The findings in these studies will contribute not only to identifying the structures of CATs and their metabolites but also to proving the intake of newly encountered designer drugs.

1. 緒言

カチノン類 (CATs) は、カート (Khat、学名 *Catha edulis*) と呼ばれる熱帯に自生する常緑樹の葉に含まれるアルカロイドの「カチノン」を基本骨格とした危険ドラッグである。基本骨格のカチノンが覚醒剤アンフェタミンの β 位がカルボニル基となった構造 (Fig. 1) を持つことから、CATs は覚醒剤と同様に中枢神経興奮作用を有していると考えられている。これら流通している CATs には、芳香環、アルキル鎖、アミン部の構造に様々なバリエーションがあり、中でもアミン部がピロリジン環となった α -ピロリジノ

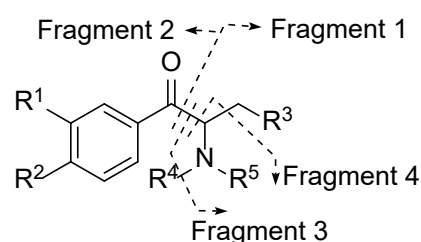


Fig. 1 General structure of CATs and generations of the major fragment ions by EI.

フェノン類 (PPs) は流通量が非常に多い。これら大半の CATs は、多数の構造類縁体が存在し、規制/未規制が混在し流通しているため、確実な構造識別法の開発が求められている。法科学分野では、不純物や夾雑成分の混在している場合や試料量が限られている場合があり、クロマトグラフィーと接続が可能で、かつ高感度な分析が可能な点から、質量分析が汎用されている。

また、法科学分野での生体試料分析において、外部からの汚染や混入の可能性を否定し摂取を証明するためには、摂取した薬物そのものだけでなく、体内を通過していることを示す代謝物を併せて検出する必要がある。このため、摂取を証明する薬物の代謝経路を予め解明しておかなければならない。しかしながら、危険ドラッグは登場して間もなく、そのうえ多種多様に存在することから、個々の薬物について十分に代謝の研究が成されておらず、摂取証明のためにどのような代謝物を検出すべきか明確に定まっていない。

そこで本研究では、危険ドラッグの中でも特に流通量の多い CATs を対象としたガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) での電子イオン化 (EI) マススペクトル及びガスクロマトグラフィータンデム質量分析 (GC-MS/MS)、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) による構造識別法の

確立を目指した。また、CATsの中でも特に流通量の多いPPsを対象とし、尿試料中の代謝物分析による、摂取証明を目的とした代謝経路の解明をテーマとした。

2. EI マススペクトルによるカチノン系乱用薬物の構造推定法の開発

一般的に覚醒剤やCATsの遊離塩基のEIマススペクトルは、アミンの α 開裂による非常に強度の高いフラグメントイオンが観察され、構造を反映したイオンに乏しいとされていたが、強度は低いながらも構造を反映したフラグメントイオンが多数観察されることが分かった。本研究では、98種のCATsを合成し、GC-MSによりこれらの遊離塩基及びトリフルオロアセチル(TFA)誘導体についてEIマススペクトルを測定し、フラグメンテーション機構を考察した。

その結果、CATsの遊離塩基のEIマススペクトルでは、以下のフラグメントイオンが検出されることが分かった。

- (1)カルボニル基側でのアミンの α 開裂によるフラグメントイオン(イミニウムカチオン、**Fig. 1 Fragment 1**)
- (2)カルボニル基の α 開裂によるフラグメントイオン(ベンゾイルカチオン、**Fragment 2**)及び更にCOの脱離したフラグメントイオン
- (3)アルキル鎖がブチル基以上の鎖長をもつ場合又はN-アルキル基がエチル基以上の鎖長をもつ場合に観察される、(1)から更にオレフィンの脱離したフラグメントイオン(**Fragment 3, 4**)
- (4)側鎖側でのアミンの α 開裂によるフラグメントイオン

これら(1)–(4)はCATsの構造推定をする上で非常に有用な指標であった。また、TFA誘導体化によって、ベンゾイルカチオン(**Fragment 2**)の強度が増大すること、並びにメチルアミン構造をもつCATsでは m/z 110のフラグメントイオン($C_3H_3F_3N^+$)が特異的に観察されることが明らかとなった。

また、本研究で検討したCATsに含まれない1-(4-メトキシフェニル)-2-(ピロリジン-1-イル)ペンタン-1-オン(通称4-MeO- α -PVP)の構造推定を試みたところ、置換位置の特定は困難であったものの構造に矛盾しない結果が得られ、未

知の CATs の構造推定法として本法の有用性が示せた。

3. GC-MS/MS によるカチノン系乱用薬物の包括的な構造推定法の開発

現在、CATs は、個別指定及び部分構造の組み合わせによる包括指定でほとんどが指定薬物として、また、約 20 種類の CATs が麻薬として規制されている。法薬毒物学分野において、薬物の構造を同定するためには、試薬メーカーより購入又は合成により標準品を入手する必要がある。しかしながら、これら全種類の CATs、更に未規制のものや未流通のものを含めると、ほぼ無数に構造が考えられる CATs の標準品を予め用意しておくのは不可能である。そのため、予め分析によって考え得る構造を絞り込んだうえで、標準品を入手するほうが合理的である。前述の EI マススペクトルによる構造推定は、強度の低いイオンを利用するため、重要なフラグメントイオンが夾雑物やノイズに埋もれてしまうことがあり、低濃度の試料や夾雑物の多い試料での判断は、ある程度の経験が必要となる場合もある。そこで、より確実な構造推定法として、EI で得られたフラグメントイオンをコリジョンセルで更に開裂させることが可能な GC-MS/MS を用いることで、より容易で確実な構造推定が可能となると考えられる。また、EI マススペクトルでは識別の困難な芳香環の位置異性体についてもプロダクトイオンスペクトルを解析することで識別が可能になることが期待される。

本研究では、CATs の包括規制を対象とした GC-MS/MS による次の 3 種の手法を組み合わせた分析法 (Fig.2) を構築し、その有用性を検討した。

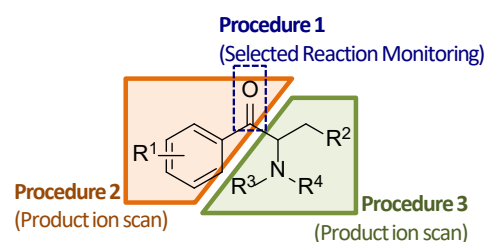


Fig. 2 Analytical procedures of the proposed GC-MS/MS method.

- (1) ベンゾイルカチオン (Fig. 1 Fragment 2) からフェニルカチオンへと、CO が脱離する選択反応モニタリング
- (2) ベンゾイルカチオン (Fragment 2、24 種) をプリカーサイオンとしたプロダクトイオンスキャン
- (3) イミニウムカチオン (Fragment 1、56 種) をプリカーサイオンとしたプロダ

クトイオンスキャン

その結果、ベンゾイルカチオンについていずれの官能基についても明確に官能基識別が可能であり、イミニウムカチオンについても明確に異性体識別が可能であった。また、ベンゾイルカチオンをプリカーサイオンとしたプロダクトイオンスペクトルによって、エチル基、メトキシ基、メチレンジオキシ基では、芳香環上の置換位置が識別可能であった。

更に、今回検討した組み合わせ以外の構造でも、相当するプリカーサイオンを追加登録することで分析が可能であったことから、将来新たな部分構造をもつ CATs が登場した際も容易に対応が可能であることが示唆された。

4. α -PBP の代謝経路に関する研究

CATs の中でも、特に乱用されているのが PPs であり、もっとも多く流通していたものは α -ピロリジノバレロフェノン (α -PVP) である。アルキル鎖がペンチル基である α -PVP が規制されるとすぐに、アルキル鎖長が 1 つ短いブチル基である α -ピロリジノブチロフェノン (α -PBP) が流通した。 α -PVP の主要代謝物は 1 位カルボニル基の還元体 (1-OH 体) 及びピロリジン環 2'' 位の酸化体 (2''-oxo 体) であることは既に報告されている。そこで、 α -PBP 摂取者尿について、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いて主要代謝物の探索を行った。また、1-OH 体及び 2''-oxo 体について定量した。

代謝物探索の結果、 α -PBP 摂取者尿 11 検体全てから、未変化体に加えて、1-OH 体 (ジアステレオマーとして検出) 及び 2''-oxo 体が検出され、 α -PBP の主要代謝物は α -PVP と同じ 1-OH 体及び 2''-oxo 体であることが分かった。また、1-OH 体はグルクロン酸抱合体も検出された。更に、定量分析の結果、 α -PVP と比較して α -

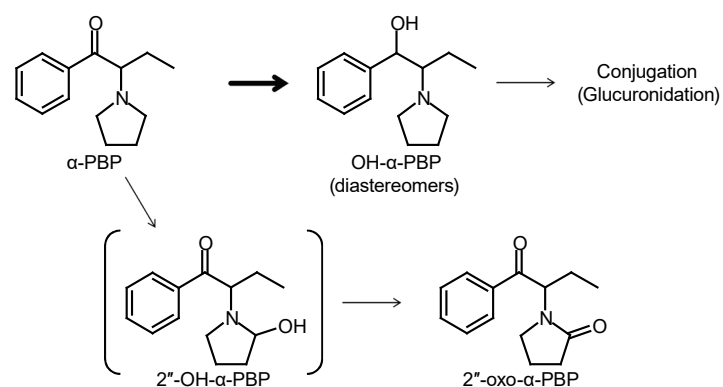


Fig. 3 Proposed major metabolic pathways for α -PBP.

PBP は、1-OH 体の検出量が多く、2"-oxo 体の検出量が少ないこと、ジアステレオマー間の濃度比が顕著であることが初めて明らかとなった。また、本研究結果により推定された α -PBP の代謝経路を **Fig. 3** に示す。

5. α -PHP 及び α -PHPP の代謝経路に関する研究

α -PVP に続いて α -PBP が規制されると、アルキル鎖長の長いヘキシル基である α -ピロリジノヘキサノフェノン (α -PHP)、ヘプチル基である α -ピロリジノヘプタノフェノン (α -PHPP)、オクチル基である α -ピロリジノオクタノフェノン (α -POP) が流通した。これまでに、 α -POP の尿中代謝物は、カルボニル還元を経由した 1-OH 体及びピロリジン環酸化を経由した 2"-oxo 体がそれぞれ検出されるものの微量であること、及びアルキル鎖末端 (ω 位) 及びその隣 (ω -1 位) の酸化を経た代謝物が主として検出されることが知られ、 α -POP の主代謝経路は α -PBP や α -PVP と大きく異なることが報告されている。これらの中間のアルキル鎖長を持つ α -PHP 及び α -PHPP での代謝経路を解明すれば、PPs の代謝とアルキル鎖長の関係が総合的に検討できる。そこで本研究では、LC-MS/MS を用いて α -PHP 及び α -PHPP の摂取者尿について代謝物を探索した。また、1-OH 体及び 2"-oxo 体について定量した。そして、これら以外の検出された代謝物についても、液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析装置によるシングルスキャン分析でのピーク面積より、代謝物濃度について定量的に評価した。そして、これら得られた分析結果から、 α -PHP 及び α -PHPP の代謝経路を解明し、これまでに検討されている α -PBP、 α -PVP 及び α -POP の傾向と併せて検討し、アルキル鎖の長さが PPs の代謝に与える影響について考察した。

その結果、 α -PHP 及び α -PHPP 摂取者尿いずれからも、1-OH 体、2"-oxo 体が同定され、 ω 酸化及び ω -1 酸化を経由したと考えられる代謝物が検出された。更に、1-OH 体、2"-oxo 体について定量分析を行ったところ、アルキル鎖が長鎖となるにつれて 1-OH 体は減少すること、2"-oxo 体は α -PHP までは増加し、その後減少に転じることが示された。更に、アルキル鎖が長鎖となるにつれて 1-OH 体のジアステレオマー間の濃度比の偏りが減少することが示された。これ

は、アルキル鎖が長鎖となることで、*S*-体、*R*-体の基質特異性、酵素反応の立体選択性、あるいはその両方が低下したためと予想された。また、 ω 酸化及び ω -1酸化を經由したと考えられる代謝物も含め、定量的な評価を行ったところ、PPsのアルキルの鎖長が伸延することによって代謝経路がカルボニル還元からピロリジン環酸化、そして ω 酸化、 ω -1酸化へと推移することが分かった (Fig. 4)。

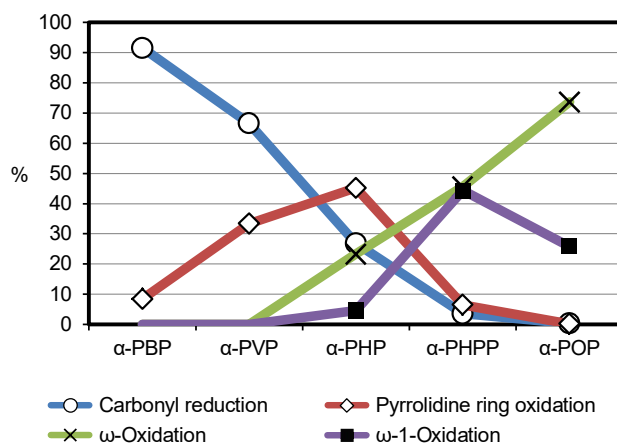


Fig. 4 Average percentage composition of various metabolites of PPs detected in the users' urine specimens.

6. 重水素標識体を用いたカチノン系乱用薬物及びその代謝物のフラグメンテーションに関する研究

代謝物を含め生体試料中の CATs の構造識別には、LC-MS/MS でのエレクトロスプレーイオン化-衝突誘起解離 (ESI-CID) により得られるプロダクトイオンスペクトルの測定が有用である。特に CATs では、ESI-CID により第一級・第二級アミン構造を持つ場合に特徴的な脱水フラグメントイオン $[M+H-H_2O]^+$ が観察され、第三級アミン構造を持つ場合には観察されないことが知られている。加えて、PPs の代謝物である 1-OH 体及び 2''-oxo 体についても、脱水イオンが観察されることが知られている。このため、これらの脱水フラグメントイオン生成機構を解明しておくことは構造推定において非常に重要である。そこで本研究は、安定同位体 (重水素(D)及び酸素-18(^{18}O)) 標識化合物を用いて ESI-CID による脱水フラグメントイオンの生成機構を解明し、CATs の構造推定への適用を試みた。

その結果、第一級・第二級アミン構造を持つ CATs での脱水反応において脱離する水素原子 2 つについて D 標識化合物により検討したところ、ESI で付加したプロトンに由来する水素原子及び窒素原子に結合している水素原子である

ことが示された。また、推定された脱水イオンの生成メカニズムを **Fig. 5** に示す。これにより第三級アミン構造を持つ CATs において脱水イオンが観

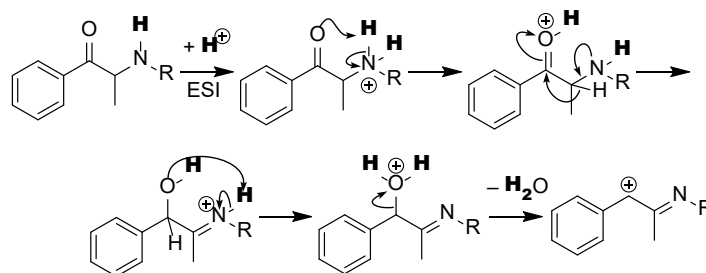


Fig. 5 Proposed mechanism for generation of the dehydrated ion during ESI-CID for CATs with primary and secondary amines.

察されないことが説明できる。一方、PPs の主要な代謝物である 1-OH 体及び 2''-oxo 体は、いずれも窒素原子に水素原子が結合していないにも関わらず、ESI-CID によって脱水イオンが観察された。D 及び ^{18}O 標識化合物による検討の結果、1-OH 体での脱水反応では、ESI で付加したプロトンに由来する水素原子と共にヒドロキシ基が脱離することが示された。一方、2''-oxo 体での脱水反応では、ESI で付加したプロトン及びアルキル鎖 2 位 (α 位) の水素原子が脱水に寄与していることが示されたが、その他の水素原子も寄与していることが分かり、複数の脱水メカニズムが存在することが示された。なお、ピロリドン環は脱水反応に関与しないことが示され、脱離する酸素原子は 1 位カルボニル基に由来することが初めて明らかとなった。このような脱水メカニズムは、他の PPs (α -PPP、 α -PVP、 α -PHP、 α -PHPP) の代謝物においても基本的に同様であったが、2''-oxo- α -PPP においてのみ、脱水イオンがベースピークとして観察され、二次プロダクトイオンスキャンのスペクトルが大きく異なっていた。このため、D 及び ^{18}O 標識化合物により検討し、ESI で付加したプロトン、フェニル基、 α 位及びアルキル鎖末端の水素原子がいずれも脱水に寄与していること、並びに、2''-oxo- α -PBP と同様、1 位カルボニル基の酸素原子のみが脱離していることが示された。このため 2''-oxo- α -PPP も複数の脱水メカニズムが存在することが示唆された。今回得られた知見により、CATs において ESI-CID での脱水イオンの有無は、構造推定の際に有用な指標となることが示された。

7. 結論

本研究では、危険ドラッグの中でも特に流通量の多い CATs を対象とし、GC-MS、GC-MS/MS 及び LC-MS/MS を用いた構造識別法の確立を目指した。また、応用として、CATs の中でも流通量の多い PPs を対象とし、MS を用いた尿試料中の代謝物分析による、摂取証明を目的とした代謝経路の解明を試みた。

構造類縁体が多く、規制／未規制が混在して流通している危険ドラッグの CATs について、GC-MS の EI マススペクトルを用いた構造推定法、並びに GC-MS/MS による部分構造の特定可能な包括的分析法を構築し、これらの CATs の構造推定法を確立し、未知の CATs の構造推定に適用可能であることを示した。また、CATs を LC-MS/MS で分析した際に ESI-CID で構造に依存し観察される脱水イオンが、CATs の構造識別への活用が期待できるため、安定同位体標識体を用いて脱水イオンの生成メカニズムの解明を試みた。その結果、第一級・第二級アミン構造の CATs では、カルボニル基の酸素原子及び ESI 時に付加したプロトンと共に、アミンの窒素原子に結合する水素原子が水分子として脱離していること及びそのメカニズムを初めて明らかにした。また、PPs の代謝物 1-OH 体及び 2"-oxo 体ではいずれも、窒素原子に水素原子が結合していても脱水イオンが生成することが分かった。これらの知見に基づき、脱水イオンの有無が CATs の構造識別に活用できることを示した。

そして、応用として、MS による PPs の摂取証明への活用を目的とし、 α -PBP、 α -PHP 及び α -PHPP について代謝経路、並びにアルキル鎖長が代謝経路に与える影響の解明を試みた。アルキル鎖がブチル基の α -PBP では、1-OH 体が最も主要な代謝物であること及び 1-OH 体のジアステレオマー間の濃度差が非常に大きいことを初めて明らかにした。また、アルキル鎖がヘキシル基の α -PHP 及びヘプチル基の α -PHPP の使用者尿から 1-OH 体、2"-oxo 体、アルキル鎖の ω 位または ω -1 位が酸化された代謝物、並びにこれらが組み合わされた代謝物が検出されることが分かった。また、PPs のアルキルの鎖長が伸延することにより、主要な代謝経路がカルボニル還元からピロリジン環酸化、そして ω 酸化、

ω-1 酸化へと推移することを説明した。今回得られた PPs のアルキル鎖が代謝経路に及ぼす影響は、PPs のみならず、ピロリジン環を持たない CATs の代謝経路を予想する際にも有用な知見となることが期待される。

本研究の成果は、法科学分野及び法中毒学分野における、構造識別法及び乱用薬物摂取証明法の確立、並びに薬物事犯の取り締まりに大きく貢献するものと期待される。

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。）

質量分析法によるカチノン系乱用薬物の構造識別と代謝研究への適用

2. 論文提出者 (1) 所 属 物質化学 専攻

(2) 氏 名 ^{かり} ^{がな} ^{まつた} ^{しゅんたろう}
松田 駿太郎

3. 審査結果の要旨（600～650字）

提出学位論文について、各審査員が個別に審査した後、令和2年7月9日に予備審査会、令和2年8月5日に口頭発表会および論文審査委員会を開催し、以下のように判定した。

アルカロイドのカチノンを基本骨格とするカチノン類（CATs）は、危険ドラッグとして広く流通している。CATsには様々な構造類縁体が存在し、規制/未規制薬物が混在しているため、確実な構造識別法の開発が必要である。本論文では、様々な官能基を有する98種のCATsを標準品として合成し、ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）の電子イオン化マスペクトルを用いた構造推定法、並びにガスクロマトグラフィータンデム質量分析（GC-MS/MS）による部分構造の特定可能な包括的分析法を構築した。標準品に含まれないCATsに対しても本法を適用し、構造推定法としての有用性を確認した。さらに、CATsを液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）で分析した際、エレクトロスプレーイオン化-衝突誘起解離により観察される脱水イオンについて、安定同位体標識体を用いて生成メカニズムを検討し、脱水イオンの有無がCATsの構造識別に活用できることを示した。また、法科学分野の生体試料分析では、摂取した薬物だけでなく、構造を反映した代謝物の検出が必要なため、CATsの中でも特に流通量の多い α -ピロリジノフェノン類（PPs）について、LC-MS/MSを用いて尿試料中の主要代謝物の探索と代謝経路の検討を行い、アルキル鎖長の伸延によって代謝経路がカルボニル還元からピロリジン環酸化、そして ω 酸化、 $\omega-1$ 酸化へと推移することを明らかにした。

本論文の成果は、CATsの構造識別法および乱用薬物摂取証明法の確立などに寄与するものであり、博士（理学）の学位に値すると判断した。

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（理学）