

## 17. 官学連携による誘導化 GC/MS を用いた合成カンナビノイド代謝物の高感度分析

○伊藤 哲朗 (岐阜県保健環境研究所)

北市 清幸 (岐阜薬科大学)

### 【研究目的】

当研究所と岐阜薬科大学は協定を結んでいた連携大学院の一環として、危険ドラッグ蔓延の抑止力となることを目指して協議会を設立し官学連携体制の下、違法性薬物に関する情報共有と技術的連携を行って危険ドラッグの解析技術の開発を進めおり（岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会・平成 26 年 11 月設立（以下、協議会と呼ぶ））(図 1)，現在まで危険ドラッグの分析方法について情報収集に努めてきた.<sup>1)</sup> 本研究では、代謝産物の分析方法の開発に主眼を置き、併せて市中製品からの危険ドラッグ測定系、及び誤同定が懸念される異性体との識別法を開発する。

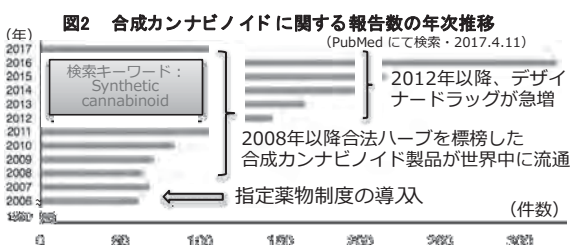
図1 岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会※における研究実施体制



※平成26年11月設立

### 【研究の必要性】

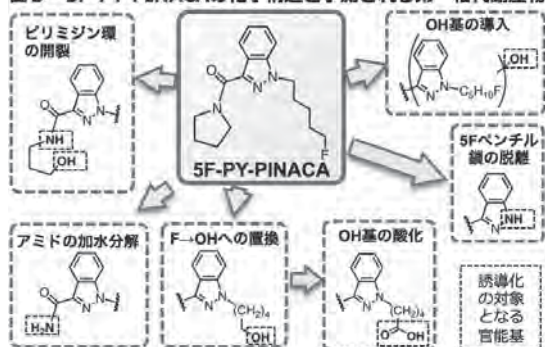
近年は、本邦における危険ドラッグの流通と使用は沈静化に向かっていると認識されている。一方、合成カンナビノイド(SCs)を筆頭とする精神作用物質の海外における流通は続いている。加えて、その解析技術と生化学的な知見は未だ不足している。<sup>2)</sup> 従って、その解析法の絶え間ない開発により新規出現物質の流通を監視し続ける必要がある(図 2)。とりわけ生体内で代謝を受けやすい SCs については、未変化体の検出は難しく、代謝物を指標とした検出法の開発は急務である。



### 【研究計画】

協議会の中心である申請者と共同研究者は、化合物の解析を多面的に行う研究体制を整え、誤同定が懸念される SCs の多様な構造異性体について、代謝物同定と構造識別に必要な生物学的試料 (SCs 代謝物) の調製プロトコルの作成と分析機器 [ガスクロマトグラフ-質量分析装置 (GC/MS) 及び高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC/MS)] の測定条件の設定を進めてきた。申請者はこれら

図3 5F-PY-PINACAの化学構造と予測される第一相代謝産物



の集約情報と手技を基盤として、下記を実施する。

#### ① In vitro 実験系による新規出現合成カンナビノイドの代謝物調製（担当：北市）

実験系に付する SCs は、2014 年以降も流通が続く 5F-PY-PINACA とする<sup>3)</sup> (図 3)。ヒト肝ミクロソーム (HLM) を用いて、第一相代謝物及び第二相代謝物の調整を調製する。

#### ② 合成カンナビノイドの異性体識別・代謝物への誘導化及び代謝物解析（担当：伊藤）

①で得た試料を TMS 化し、GC/MS に付す。スキャンモード及び予測される代謝物の化学構造から推定される誘導化体を考慮した SIM モード測定により、代謝物の感度の差異を明らかにし、高感度を示す指標成分を特定する。また高速液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析装置(LC-MS-IT-TOF)による測定系を用いて、代謝物の化学構造を推定する。

### 【実施内容・結果】

#### 1) HLM を用いた代謝実験

薬物の代謝反応は Erratico et al<sup>4)</sup>の方法に一部改良を加えて行った (図 4)。

##### 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)にて混液を採取し、内部標準物質であるパパベリンを含有する MeCN 溶液を添加し、代謝反応を停止させた。検体を遠心し、窒素乾固した上清を超音波処理のもとで 50%MeOH に再溶解した。再度遠心後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

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。

#### 2) GC/MS による代謝物の測定

代謝反応物の前処理方法として有機溶剤添加による除タンパク操作、及び固相抽出法による精製操作の後、TMS 誘導化を行った。得られた試料についてシリカゲル担体を用いた昇温法による GC 分離と EI-MS 検出器を組み合わせで分析を行った。

### 結果

MeCN による除タンパク法、逆相系担体を用いた固相抽出法を用いて得られた AB-CHIMINACA 代謝物の測定結果 TMS 化された脂肪酸のみが検出され、代謝物 (AB-CHIMINACA M1~M4) は不検出であった。

#### 3) LC/MS 測定系の開発

図 5 に示す条件にて LC-MS-IT-TOF

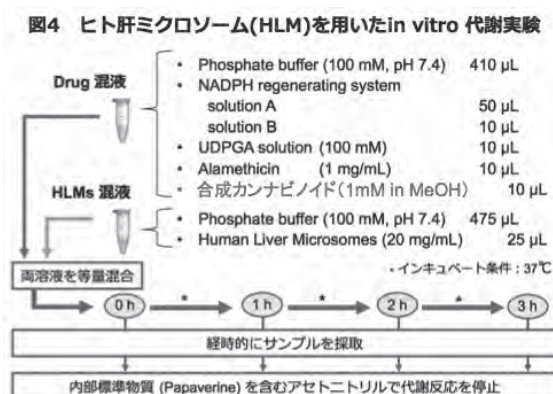


図5 LC/MS による測定条件

|           |                                                                          |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|
| ● 機材      | LCMS-IT-TOF Shimadzu                                                     |
| ● 測定範囲    | MS1; m/z 100-700<br>MS2; m/z 100-700                                     |
| ● イオン化モード | ESI positive                                                             |
| ● カラム     | ZORBAX Eclipse Plus C8 (2.1×150 mm, 3.5 µm)                              |
| ● 移動相     | A: 0.1% formic acid<br>B: 0.1% formic acid in acetonitrile               |
| ● グラジエント  | 0 min - 2 min B 10%<br>2 min - 40 min B 10%→90%<br>40 min - 47 min B 10% |
| ● カラム温度   | 40℃                                                                      |
| ● インジェクト量 | 10 µL                                                                    |
| ● 流速      | 0.18 mL/min                                                              |
| ● イオン蓄積時間 | 40 msec                                                                  |

Gradient Curve

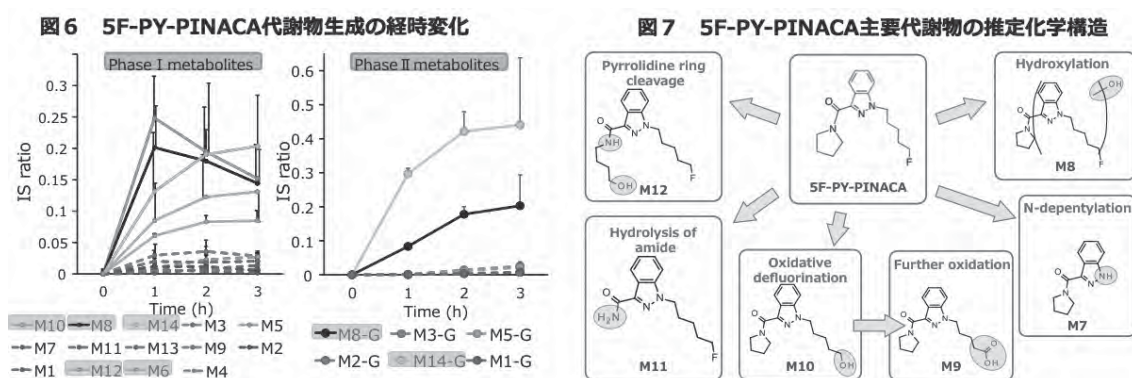
(Shimadzu, Kyoto)を用いて SCs およびその代謝物の分析を行った。データ解析には MetID Solution 1.1 (Shimadzu, Kyoto) 等を用いた。予測された代謝物ライブラリの質量荷電比( $m/z$ )との比較により、代謝物を確認した。さらに、推定された代謝物より得られた MS/MS データより、その代謝物が SCs 由来の化合物であることを確認した。命名は ESI (+)で得られた代謝物は溶出順に命名、ESI (-)で得られたグルクロン酸抱合代謝物は、先の代謝物に G を付した。

#### 結果 1. 代謝物の同定

5F-PY-PINACA は 5F-AMB の部分構造である L-バリンメチルエステルをヘテロ環であるピロールに変化させた構造を持つ。HLMs を用いた *in vitro* 試験によって第一相代謝反応物として 14 種 (M1~14)、第二相代謝物 6 種が確認された。反応 3 時間後の主要な代謝物は M14 (2 水酸化体)、M10 (1 水酸化体)をはじめとする 5 種であった (図 6)。なお M10 は反応時間 1 時間において主要代謝物であり、ペンチル基末端のフッ素原子の水酸基への置換が早い速度で起こることが確認された。同定された代謝物の化学構造 (抜粋) を図 7 に示す。

#### 結果 2. 半減期

5F-PY-PINACA の代謝半減期は  $21.2 \pm 0.8$  分であった。



#### 4) 合成カンナビノイドとその異性体の合成と識別

図 8 に示す合成スキームにより FUB-JWH-018 及びその異性体 5 種を合成し、各々の化学構造を決定した後、LC/MS を用いて識別可能な条件開発を行った。

#### 結果 1. 測定条件の設定

合成した 6 種の化合物(1 - 6)の分離及び質量分析による識別を達成するための条件設定に至った (図 9)。本条件にて得られたトータルイオンクロマトグラムを図 10 に示す。固定相に pentafluorophenyl 基を持つ F5 カラムですべての異性体が良好に分離された。図 11 には LC-IT-TOF-MS においてプリカーサーイオン  $m/z$ 380 より得られた  $m/z$  252 の質量荷電比の差異を示す。位置異性体間で、同イオン強度に違いが認められ、イオン強度は *meta*-, *ortho*-及び *para*-isomer の順 ( $2 > 1 > 3$ ,  $5 > 4 > 6$ ) であった。

#### 結果 2. 市場買い上げ品の測定結果

実際に FUB-JWH-018 (3)を含有するハーブ形態の危険ドラッグ製品について同条件で分析したところ、当該製品に異性体 (1, 2, 4 - 6) は含まれておらず、FUB-JWH-018 (3)と一致する保持時間、プロダクトイオンスペクトルが確認された。

図8 合成カンナビノイド及び異性体の合成

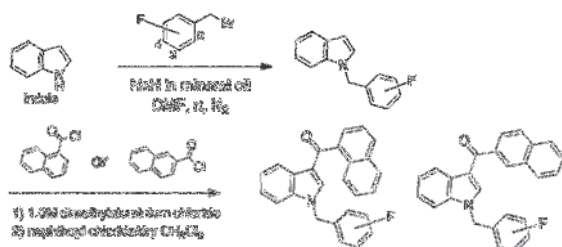


図10 合成カンナビノイド異性体 (1-6) の  
トータルイオンクロマトグラム

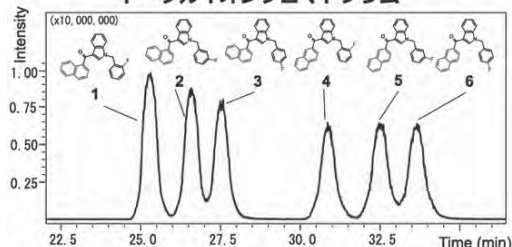
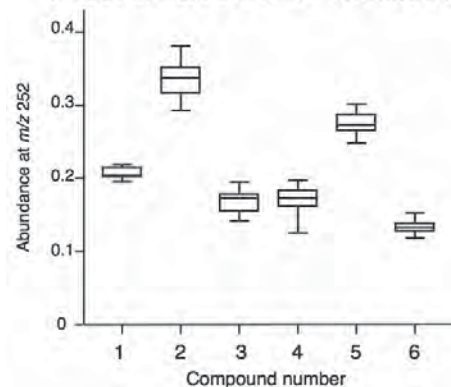


図9 LC-MS-IT-TOF による測定条件

|           |                                                                     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|
| 機材        | LCMS-IT-TOF Shimadzu                                                |
| 測定範囲      | MS1 ; $m/z$ 100-700<br>MS2 ; $m/z$ 100-700                          |
| イオン化モード   | ESI positive                                                        |
| 移動相       | A: 0.1% formic acid in Acetonitrile<br>B: 0.1% formic acid in Water |
| 移動相組成     | A : B = 42 : 58                                                     |
| 流速        | 0.40 mL/min                                                         |
| インジェクト量   | 5 $\mu$ L (1 $\mu$ g/mL 溶液)                                         |
| ヒートブロック温度 | 200 $^{\circ}$ C                                                    |
| CDL温度     | 200 $^{\circ}$ C                                                    |
| ネブライザガス流量 | 1.5L/min                                                            |
| 内部標準 (IS) | papaverine 1 $\mu$ g/mL                                             |
| カラム       | HS F5 column                                                        |

図11 IT-TOF-MSによる各異性体における $m/z$ 252のイオン強度 ( $n = 15$ , プリカーサーイオン $m/z$  380)



## 【考察と今後の課題】

当初目標に掲げた GC/MS を用いた高感度測定は、導入容易な一般的な手法開発を目指したが、代謝物 TMS 誘導化体の適切な精製操作を見いだすことは困難であった。そこで我々は誘導化を行わない LC/MS を用いる方法により同研究を進めた。その結果、5F-PY-PINACA の代謝物及び代謝挙動を迅速に推定することに成功し、SCs の代謝プロファイルをさらに蓄積することが出来た。本研究により、SCs の代謝物分析では前処理及び検出感度の観点から、LC/MS が GC/MS より優れる事が示された。今後はより多様な SCs の代謝様式を明らかにし、新規な SCs 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。一方で GC/MS は、ハーブ製品中の成分同定においては豊富なデータベースにより強力な分析ツールであるため、本法も組み合わせて、より多面的に検証可能な検査体制を構築・維持する必要がある。以て、新規出現 SCs 分析へと適用拡大出来れば、将来包括的危険ドラッグ規制と中毒者への対応に資し、地域保健の基盤(薬物乱用防止施策)に貢献出来る。

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を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 LC-IT-MS 分析が有効であった。加えてハーブ製品を用いた検証にも耐えうることを実証した。得られた知見は実用性が高く、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。

「岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会」は増加の一途を辿る違法薬物の解析技術の向上を目的として、地方衛生研究所と大学が連携した我が国最初の取り組みである。今後さらに情報集約と薬物解析技術の開発を継続し、連携研究のネットワークの拡大とともに、解析技術の向上に資する連携研究を推進し地域保健への貢献を目指していく。

#### 【参考文献】

- <sup>1)</sup> 薬事日報, 薬事日報社, 第 11546 号第一誌面 (平成 27 年 3 月 11 日発行), <sup>2)</sup> *Science* **347**, 469-473 (2015), <sup>3)</sup> United Nations Office on Drugs and Crime (2015) <https://http://www.unodc.org/LSS/Announcement/Details/d05ee4c0-c835-4055-b042-df0a15f16f49>, <sup>4)</sup> *Drug Test. Anal.*, **7**, 866-876 (2015).

#### 【論文発表・学会発表】(抜粋)

- Chikumoto, T., Kitaichi, K., Ito, T. *et.al.* Liquid chromatography–mass spectrometry studies on the isomeric 1-fluorobenzyl-3-naphthoyl- indoles: FUB-JWH-018 and five isomers. *Forensic Toxicol. published in Springerlink on 3 September 2018.* (責任著者)
- 伊藤哲朗, 北市清幸ら, 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(3): 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 53 回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 2018 年 9 月, 京都市 (筆頭演者)

#### 【経費使途明細】

| 使 途                            | 金 額       |
|--------------------------------|-----------|
| ○英文校正 (消費税課税対象外)               | 31,903 円  |
| ○消耗品                           |           |
| ・ 試薬類: 分離用担体, シリカゲル, 固相抽出カラム等) | 126,620 円 |
| ・ プラスチック器具類: 固相抽出用ジョイントアダプター等) | 22,080 円  |
| ・ ガラス器具類: ガラスピペット, バイアル等)      | 82,091 円  |
| ・ その他: パラフィルム, ろ紙, ニトリル手袋等)    | 17,450 円  |
| ○消費税                           | 19,857 円  |
| 合 計                            | 300,001 円 |
| 大同生命厚生事業団助成金                   | 300,000 円 |
| 利子                             | 1 円       |