

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893105

研究課題名(和文)GC/MS/MSによる違法ドラッグ類異性体識別法の構築

研究課題名(英文)Development of positional isomer differentiation method of synthetic cannabinoids by GC/MS/MS

研究代表者

草野 麻衣子(Kusano, Maiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：60733574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ガスクロマトグラフィータンデム質量分析(GC/MS/MS)による危険ドラッグ、特に合成カンナビノイド類の位置異性体識別法の構築を行った。ナフトイルインドール骨格を有し、ナフタレン間の位置異性体を有する合成カンナビノイドJWH-081(メトキシ基)、JWH-122(メチル基)、およびJWH-210(エチル基)とそれらの6つの位置異性体の識別を行った。

また、合成カンナビノイドの水酸化代謝物の水酸基の位置決定法の構築も行い、構築された手法を用いて麻薬であるJWH-018を投与したマウスの尿試料を分析し、主たるインドール環水酸化対は6-OHであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Synthetic cannabinoids (SC) have structural/positional isomers which may not all be regulated, thus isomeric differentiation becomes crucial as new designer drugs continuously emerge with minor modifications.

Positional isomer differentiation of the SCs JWH-081, JWH-122, JWH-210, and their isomers was attained by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Product ions with the same m/z are suspected to have different properties such as ion configuration and internal energy depending on the position of the functional group, producing characteristic spectra allowing for isomeric differentiation.

Furthermore, differentiation of the hydroxyindole metabolite isomers of JWH-018 was also attained.

Results were applied as a hydroxyl-position determining method for the metabolites of JWH-018 by GC-MS/MS in MRM mode to JWH-018 administered mice. Hydroxylation at the 6-position was found to be the likely dominant pathway for JWH-018 metabolism to produce the hydroxyindole metabolites.

研究分野：分析化学

キーワード：分析化学 危険ドラッグ 異性体識別法 GC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

(1) 2013年3月からは我が国初となる「包括指定制度」が施行されたが、危険ドラッグの過剰摂取等による中毒事故は後を絶たず、法中毒学的に生体試料からの危険ドラッグの分析は極めて重要である。また、位置異性体や構造異性体を有するものが多く、異性体によっては規制対象とならない場合があることや、急性毒性の程度が異なる場合も想定されることから、危険ドラッグの異性体識別が極めて重要と考えられる。

近年、ガスクロマトグラフタンデム質量分析計(GC/MS/MS)の高速スキャン化が進み、法中毒学的に極めて有用な分析ツールとなってきている。異性体によって異なるフラグメントイオンのプロファイルを得ることができ、結果として異性体識別を達成できる有用な手法としても考えられ、実際、フェネチルアミン系薬物の位置及び構造異性体を容易に識別できる手法が近年報告されている¹。この手法は危険ドラッグ類、特に合成カンナビノイド類の位置異性体あるいは構造異性体の識別にも有用であると考えられた。

(2) さらに、合成カンナビノイドの代謝については、ナフタレン環や芳香環への水酸化が主代謝経路と推定されているものの、現状の分析法では水酸基の位置決定が極めて難しく、水酸化代謝物は構造推定の域にとどまっている。しかし、GC/MS/MSを用いれば、合成カンナビノイドの水酸化代謝物の水酸基の位置を決定できる可能性が高く、薬物代謝学の観点からも、極めて重要な分析ツールとなりうると考えられた。

2. 研究の目的

(1) GC/MS/MSによる危険ドラッグ、特にナフトイルインドール骨格を有する合成カンナビノイドの位置異性体識別法の構築を目的とした。

(2) GC/MS/MSによる合成カンナビノイド類の水酸化代謝物の水酸基位置決定法の構築を目的とした。モデル化合物としてJWH-018(麻薬指定)を選択し、インドール環水酸化代謝物の位置異性体の識別およびその水酸基位置決定法の構築を検討した。

3. 研究の方法

(1) シングルスキャンモードによるEI-マススペクトルの取得を行った後、フラグメンテーション解析を実施し、各フラグメントイオンのうち、異性部位に相当するイオンを決定した後、異性部位のMS/MS条件の最適化(CEやプリカーサーイオンの決定など)を行った。

試料

合成カンナビノイド JWH-081、JWH-122、JWH-210、及びそのナフタレン環位置異性体は全てメタノールに溶解し分析試料とした。

装置と分析条件

装置：島津製作所製 GCMS-TQ8040 (トリプル四重極型 GC-MS/MS)、カラム：Restek 社製 Rxi-5Sil MS (30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm)、昇温条件：120 °C (1分) - 10 °C / 分 - 320 °C (7分)、キャリアガス：He (45.6 cm/秒)、試料注入量：1 μL (スプリットレス・モード)、測定モード：シングルスキャンモードあるいはプロダクトイオンスキャンモード、コリジョンガス：アルゴン (200 kPa)、コリジョンエネルギー (CE)：5-40 eV (5 eV 刻み)、イオン化法：電子イオン化法 (EI)。

(2) 標準試料をトリメチルシリル (TMS) 誘導体化後、(1)と同様に標準試料を用いて EI-マススペクトルおよびプロダクトイオンマススペクトルを取得した後、各異性体に特徴的なプロダクトイオンを用いて SRM トランジションを設定し、JWH-018 投与マウスの尿試料を分析した。

試料

JWH-018 インドール水酸化体の標準試料は全てメタノールに溶解し、TMS 誘導体化を行った後、分析試料とした。

動物実験

9 週齢の 129/sv 雄性マウス(n=2)に JWH-018 (DMSO 溶液、30 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に尿試料を膀胱から直接採取した。なお、動物実験は名古屋大学医学部の動物実験委員会の承認を得て実施した。尿試料は加水分解後、クロロホルム：イソプロパノール抽出を行い、上記と同様に分析した。

装置と分析条件

装置および分析条件は上記と同様であったが、生体試料の測定条件は以下を用いた：SRM モード、コリジョンガス：アルゴン(200 kPa)、コリジョンエネルギー (CE)：25 kV。

4. 研究成果

ナフトイルインドール骨格を有し、ナフタレン環にメトキシ基 (JWH-081) やアルキル基 (R=メチル基 (JWH-122)、R=エチル基 (JWH-210)) など種類の異なる官能基を有する合成カンナビノイドとその位置異性体の識別を行った(図 1)。

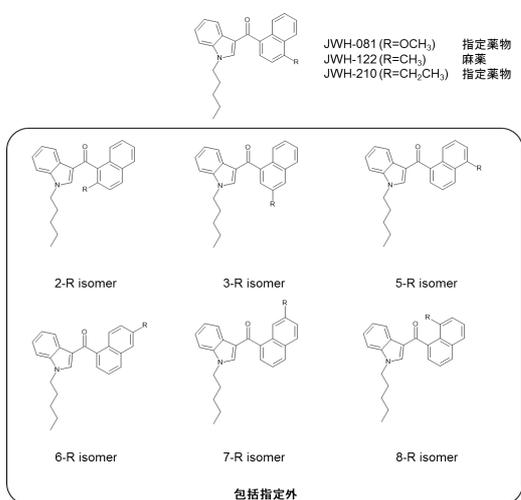


図 1 対象化合物とその位置異性体

(1) JWH-081

図 2 で示すように、EI-スキャン分析を行ったところ、2-MeO 体と 8-MeO 体は他の異性体と明らかに異なる EI マススペクトルを示し、容易に識別することができた。また、7-MeO 体においても他の位置異性体とは異なるイオン (m/z 286) が観察されたことから、識別が可能であった。しかし、JWH-081 を含む他の 3 つの異性体は EI-マススペクトルが酷似しており識別が困難であった。

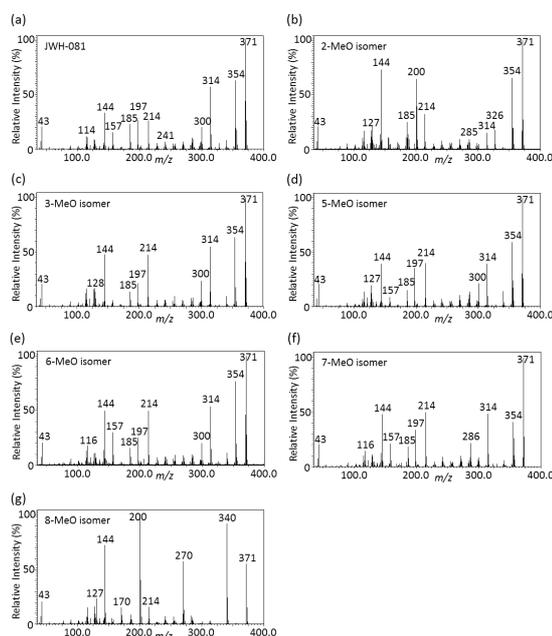


図 2 JWH-081 および位置異性体の EI マススペクトル
EI-マススペクトルでは識別が難しかった 4 つの化合物について、ナフトイル基を反映するフラグメントイオン m/z 185 をプリカーサーイオンとして、EI-MS/MS を行った結果、位置異性体間で異なるプロダクトイオンスペクトルが観察されたことから、4 つの位置異性体を識別することが可能であった(図 3)。得られた MS/MS スペクトルより、異性体部位を含むイオンは図 4 で示すようなフラグメンテーションパターンが推測された。
以上の研究成果については国際学会で発表を行い、さらに論文投稿も行い 2015 年 3 月に公表された。

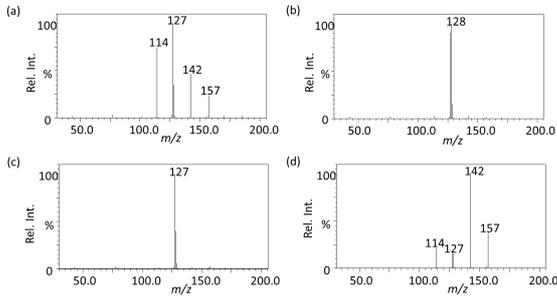


図 3 EI スキャンでは識別困難だった位置異性体の EI-MS/MS スペクトル (プリカーサーイオン m/z 185)

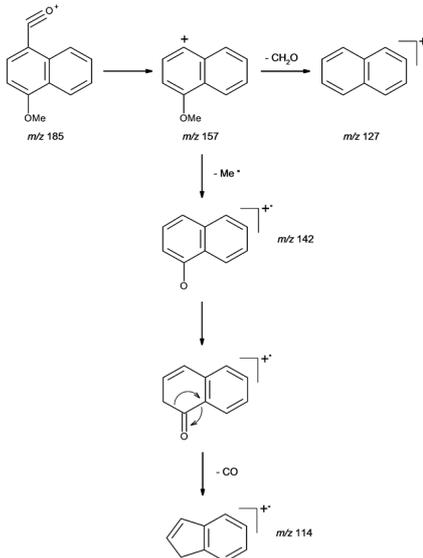


図 4 JWH-081 の推定フラグメンテーションパターン

(2) JWH-122

JWH-081 と同様に、2-および 8-メチル体には特徴的なフラグメントイオンが観察されたことから、これらの異性体の識別は容易であった。しかし、その他の異性体の識別は、一見して識別は困難であった。

ナフタレン環にメチル基が付いた異性部位を含むフラグメントイオン m/z 298 をプリカーサーイオンに選択し、MS/MS を行った。図 5 に示すように、5-および 7-メチル体と、その他異性体の間でスペクトルパターンが異なったものの、全ての異性体を識別することはできなかった。他のプリカーサーイオンでも MS/MS を行ったが、異性体間で明確な相違は見られず、MS/MS による識別は困難であった。得られたスペクトルから推定される JWH-122 のフラグメンテーションパターンを

図 6 に示す。

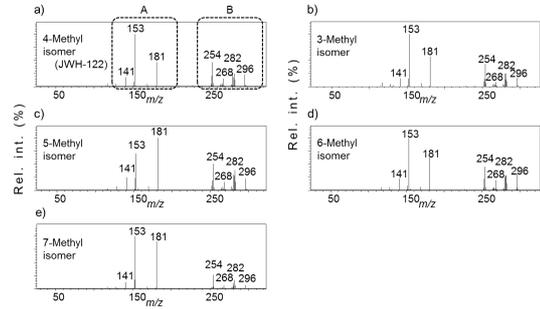


図 5 JWH-122 およびメチル基位置異性体の EI-MS/MS スペクトル (プリカーサーイオン m/z 298)

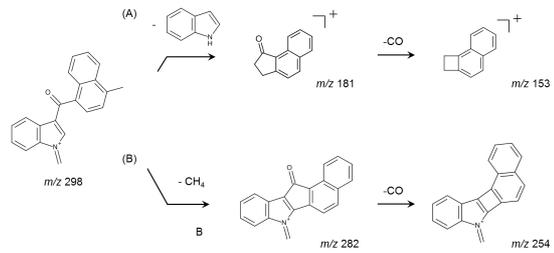


図 6 JWH-122 の推定フラグメンテーションパターン

(3) JWH-210

EI-マススペクトルにおいては、JWH-122 とほぼ同様のフラグメントパターンから成るスペクトルが観測された。異性体部位を含むフラグメントイオン m/z 312 をプリカーサーイオンに選択し、MS/MS を行った結果、図 7 に示すようにフラグメントイオンの相対強度比の明らかな違いにより 4-, 5-および 7-エチル体は識別が可能であった。3-および 6-エチル体は、マススペクトルが酷似しており識別が困難だったため、別のプリカーサーイオン m/z 183 を選択した結果、異なるベースピークを有するマススペクトルが得られ、全ての異性体の識別が可能であった (図 8)。

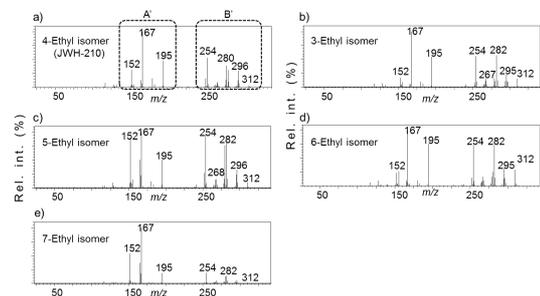


図 7 JWH-210 およびエチル基異性体の EI-MS/MS スペクトル (プリカーサーイオン m/z 312)

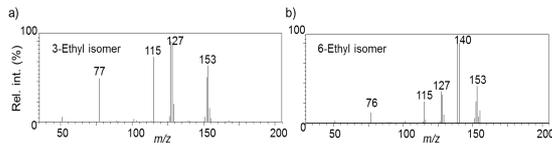


図 8 JWH-210 の EI-MS/MS スペクトル
(プリカーサーイオン m/z 183)

JWH-122 および JWH-210 においては、アルキル側鎖の長さの違いによってフラグメンテーションの経路の方向に差が生じ、そのフラグメンテーションの経路の際は、主として、官能基の立体構造に基づくものと推定された。以上の研究成果は国内学会において発表を行い、また、論文投稿も行い 2016 年 5 月に公表された。

(4) JWH-018 インドール水酸化体の位置異性体の識別および JWH-018 尿中代謝物の水酸基位置決定法の構築

EI-スキャン分析においては、4-OH 体のみ特徴的なイオンが観察されたが、その他の異性体はマススペクトルが酷似しており識別が困難であった。そこで、インドール部位を反映する m/z 302 をプリカーサーイオンとして EI-MS/MS を行った結果、異性体間で異なるプロダクトイオンスペクトルが観察された(図 9)。MS/MS 分析の結果から推定されたフラグメンテーション経路を図 10 に示す。

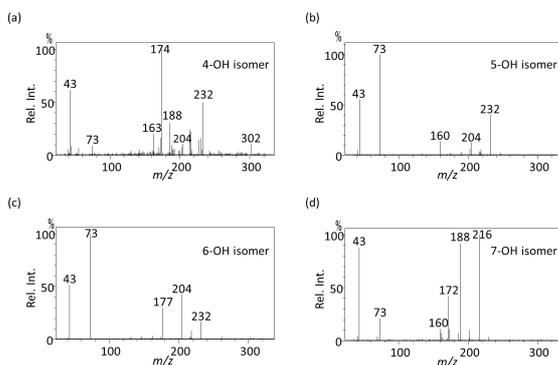


図 9 JWH-018 インドール水酸化体位置異性体のプロダクトイオンスペクトル (TMS 誘導体化後)

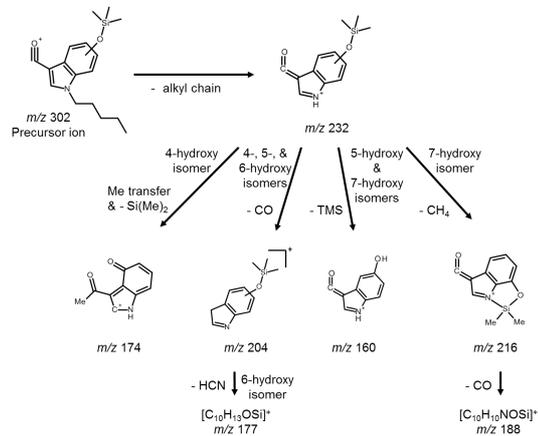


図 10 JWH-018 インドール水酸化体の推定フラグメンテーションパターン

プリカーサーイオン (m/z 302) と各異性体に特徴的なイオンを SRM トランジションに設定し、マウス尿試料の分析を行った。その結果、主たるインドール環水酸化体は 6-OH 体であることが示唆された(図 11)。また、インドール環の水酸化は 4 あるいは 7 位では起こりにくいものと考えられ、これは立体障害の影響が示唆された。

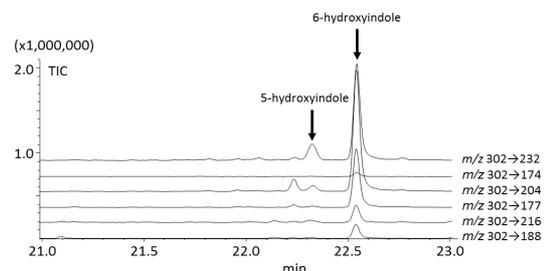


図 11 JWH-018 投与マウス尿試料の SRM クロマトグラム GC/MS/MS を水酸化代謝物の水酸基位置決定法として使用するという視点は、従来になく、極めて独創性の高い研究である。また、MAM-2201 などのようにプリカーサーイオンが共通構造の合成カンナビノイドであれば、標準品を用いることなく水酸基の位置を決定することが可能であると考えられ、合成カンナビノイドの代謝経路の特定に極めて有効な分析法であると考えられる。さらには、他の医薬品などの水酸基位置決定法としても応用できることが期待されるため、薬物代謝学の観点からも、極めて有用な分析ツールとなりうる。

以上の研究成果については国際学会にて発表を行い、さらに論文発表も行い 2016 年 4 月に公表された。

< 引用文献 >

K. Zaitso et al., Mass spectrometric differentiation of the isomers of mono-methoxyethylamphetamines and mono-methoxydimethylamphetamines by GC-EI-MS-MS. Forensic Toxicology, 31, 2013, 292-300

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

M. Kusano, M. Yamanaka, K. Zaitso, H. Nakayama, J. Nakajima, T. Moriyasu, H. Tsuchihashi, A. Ishii, Regioisomeric differentiation of the alkyl-substituted synthetic cannabinoids JWH-122 and JWH-210 by GC-EI-MS/MS, Forensic Toxicology, 査読有、2016, in press

DOI: 10.1007/s11419-016-0317-x

M. Kusano, K. Zaitso, M. Yamanaka, K. Hisatsune, T. Asano, Y. Hayashi, H. Tsuchihashi, A. Ishii, Development of a mass spectrometric hydroxyl-position determination method for the hydroxyindole metabolites of JWH-018 by GC-MS/MS, Journal of Mass Spectrometry, 査読有、50 巻、2016、350-357

DOI: 10.1002/jms.3761

M. Kusano, K. Zaitso, H. Nakayama, J. Nakajima, K. Hisatsune, T. Moriyasu, M. Katagi, H. Tsuchihashi, A. Ishii, Positional isomer differentiation of synthetic cannabinoid JWH-081 by GC-MS/MS, Journal of Mass

Spectrometry, 査読有、50 巻、2015、586-591

DOI: 10.1002/jms.3565

[学会発表] (計 10 件)

M. Kusano, K. Zaitso, M. Yamanaka, K. Hisatsune, T. Asano, K. Taki, Y. Hayashi, H. Tsuchihashi, A. Ishii, Development of a hydroxyl-position determining method for the metabolites of naphthoylindole-type synthetic cannabinoids by GC/MS/MS, Society of Forensic Toxicologists 2015, 2015 年 10 月 22 日、Atlanta (USA) 山中麻友美、財津桂、草野麻衣子、久恒一晃、中嶋順一、守安貴子、松田駿太郎、片木宗弘、土橋均、石井晃、GC/MS/MS による合成カンナビノイド JWH-122 および JWH-210 の位置異性体識別の検討、第 99 次日本法医学会学術全国集会、2015 年 6 月 11 日、高知市文化プラザかるぼーと (高知県高知市)

M. Kusano, K. Zaitso, H. Nakayama, J. Nakajima, M. Yamanaka, T. Moriyasu, S. Matsuta, M. Katagi, H. Tsuchihashi, A. Ishii, Positional isomer differentiation of naphthoylindole-based synthetic cannabinoids by GC-MS/MS, 52nd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2014 年 11 月 12 日、Buenos Aires (Argentina)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

草野 麻衣子 (KUSANO, Maiko)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号 : 6 0 7 3 3 5 7 4