

#### E. 結論

今回 DART-Orbitrap MS で検討を行った結果、多少の前処理を行っても、LC-MS や GC-MS に比べ非常に効率良く危険ドラッグ製品に含まれる指定薬物の分析を行うことができ、さらに MS/MS スペクトルの併用が有効であることがわかった。MS/MS は組成式が同一の化合物も効果的に識別できると考えられるため、構造類似体や異性体の多い危険ドラッグの成分の分析において、威力を発揮すると期待される。

今後、さらに多くの指定薬物の標準試薬について DART-Orbitrap MS で MS および MS/MS データを取得したのちライブラリーの作成を行なう。これをもとにスクリーニングメソッドを構築し、危険ドラッグ製品のハイスループット分析に役立てる予定である。

#### F. 参考文献

- 1) Cody R.B., Laramée J. A., Durst H. D., *Anal. Chem.*, **77**, 2297-2302 (2005).
- 2) Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., *YAKUGAKU ZASSHI*, **129**, 719-725 (2009).
- 3) Lesiak A.D., Musah R. A., Domin M. A., Shepard R. E., *J. Forensic Sci.*, **59**, 337-343 (2014).
- 4) Makarov A., *Anal. Chem.*, **72**, 1156-1162 (2000).

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

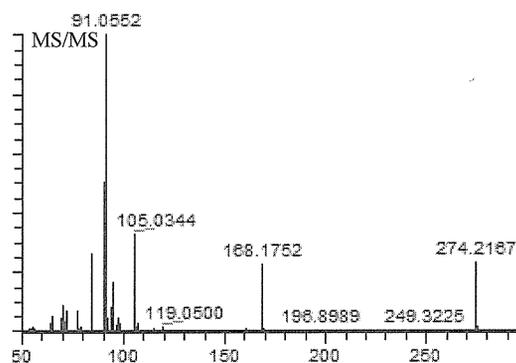
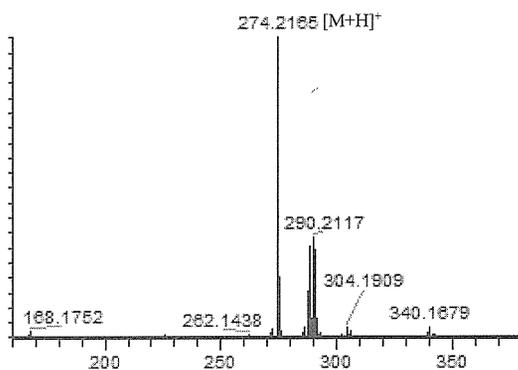
なし

**Table 1** 危険ドラッグ製品の DART-Orbitrap MS による分析結果

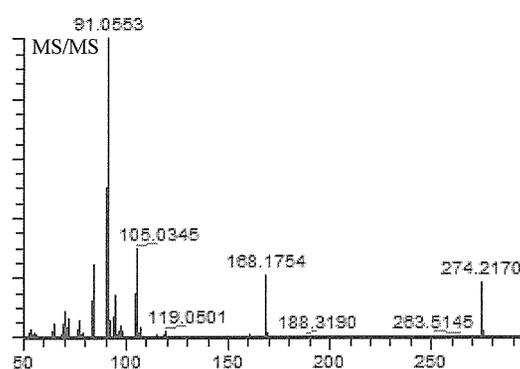
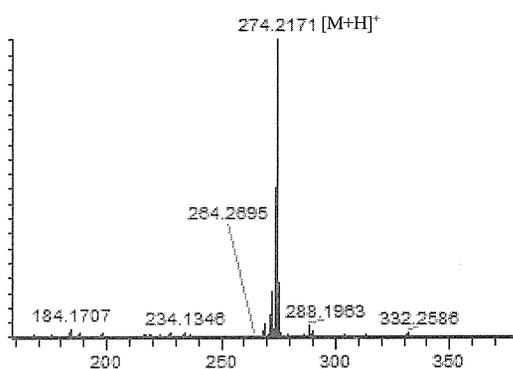
	形態	含有される指定薬物 <sup>1)</sup>	組成式	精密質量(実測値)	計算値
製品 1	液体	$\alpha$ -POP	$C_{18}H_{27}NO$	274.2165	274.2165
製品 2	乾燥植物細片	$\alpha$ -POP	$C_{18}H_{27}NO$	274.2171	274.2165
製品 3	乾燥植物細片	ADB-FUBINACA	$C_{21}H_{23}FN_4O_2$	383.1886	383.1878
		(ADBICA)	$C_{20}H_{29}N_3O_2$	344.2339	344.2333
製品 4	乾燥植物細片	AB-PINACA	$C_{18}H_{26}N_4O_2$	331.2130	331.2129
製品 5	液体	2-EAPB	$C_{13}H_{17}NO$	204.1390	204.1383
製品 6	乾燥植物細片	NM2201	$C_{24}H_{22}FNO_2$	376.1710	376.1707

1)GC-MS,LCMS で同定

a) 製品 1



b) 製品 2



c) α-POP

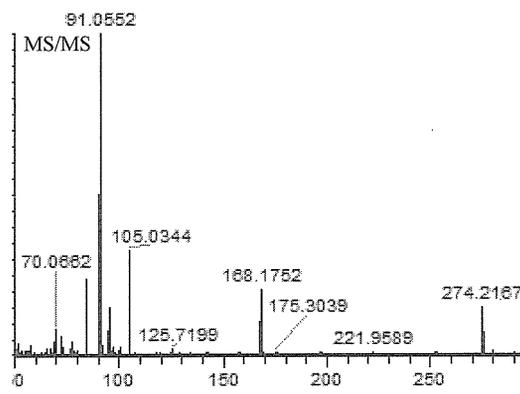
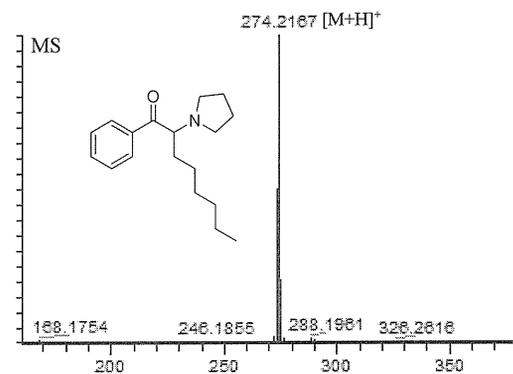
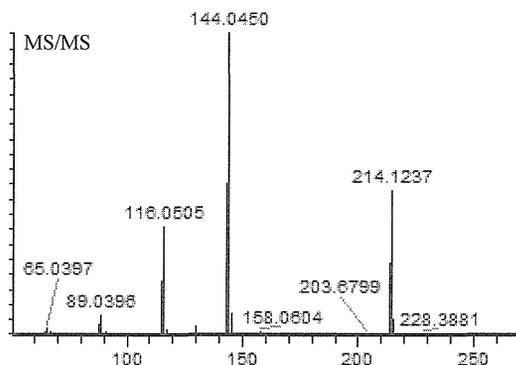
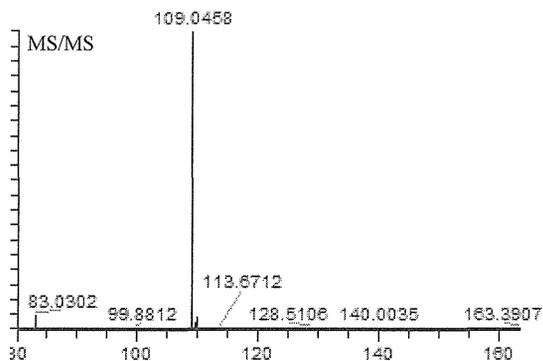
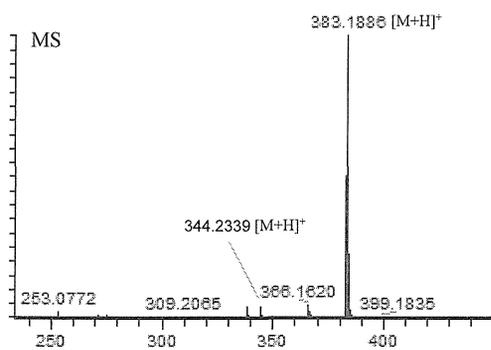
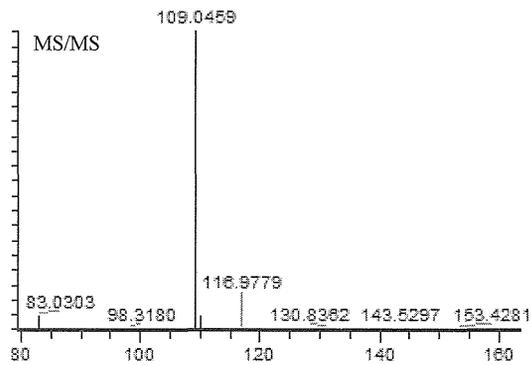
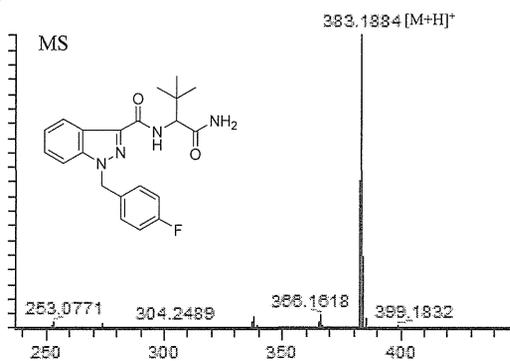


Fig 1 危険ドラッグ製品および標準試薬の DART-Orbitrap MS スペクトル

a) 製品 3



b) ADB-FUBINACA



c) ADBICA

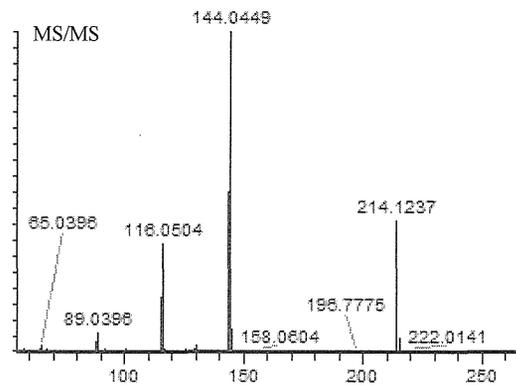
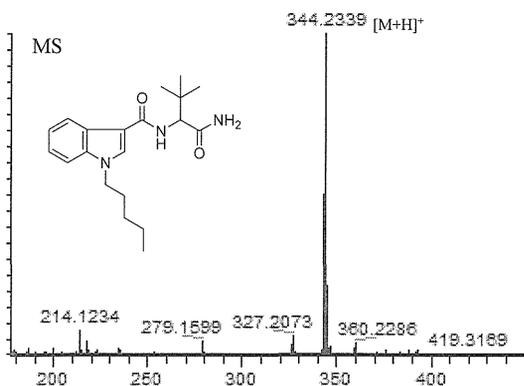
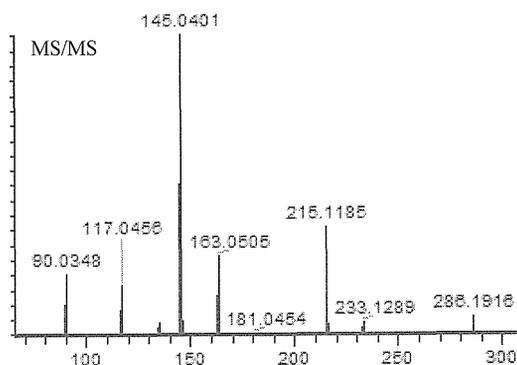
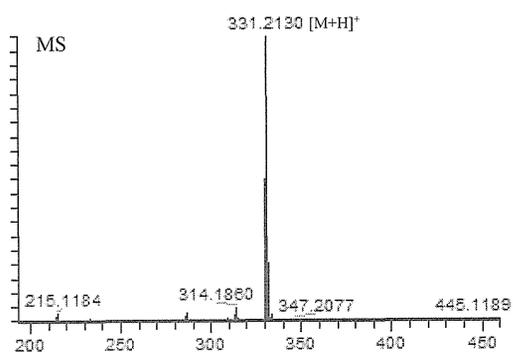


Fig 2 危険ドラッグ製品および標準試薬の DART-Orbitrap MS スペクトル

a) 製品 4



b) AB-PINACA

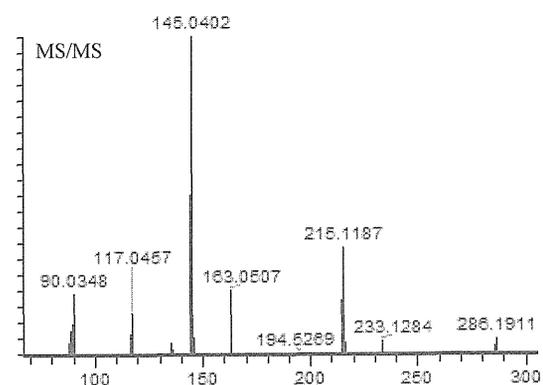
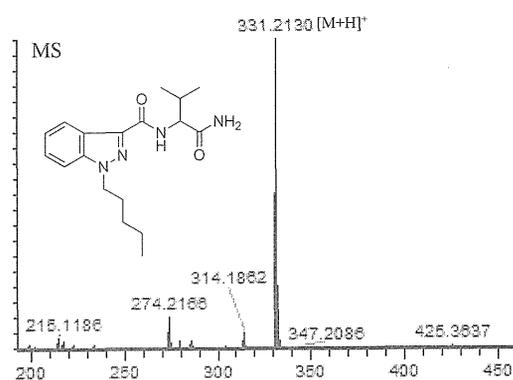
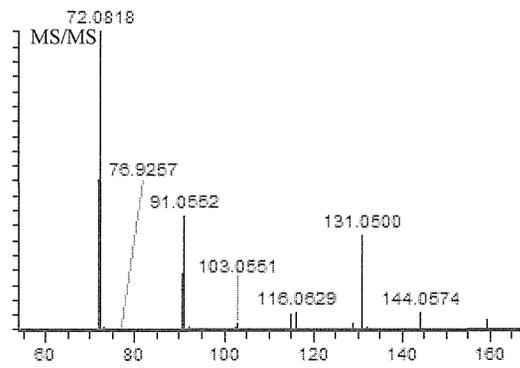
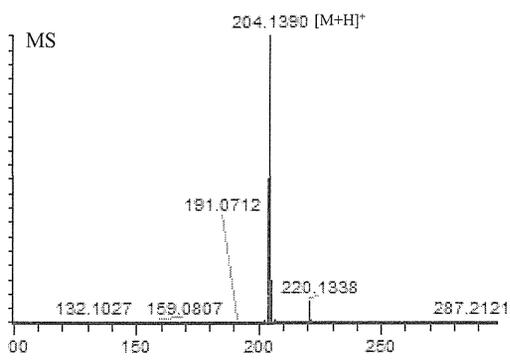


Fig 3 危険ドラッグ製品および標準試薬の DART-Orbitrap MS スペクトル

a) 製品 5



b) 2-EAPB

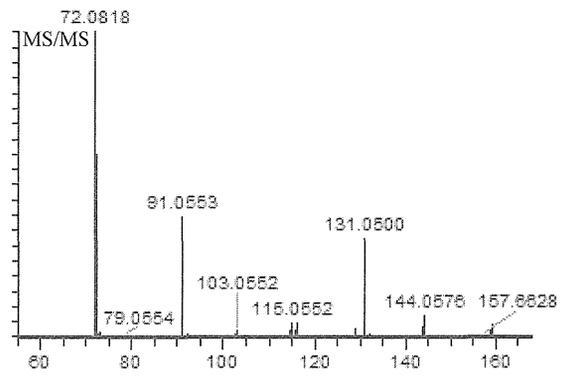
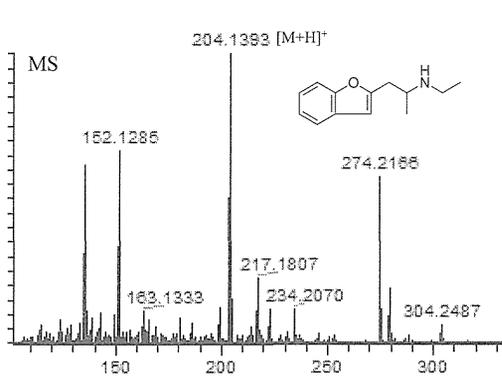
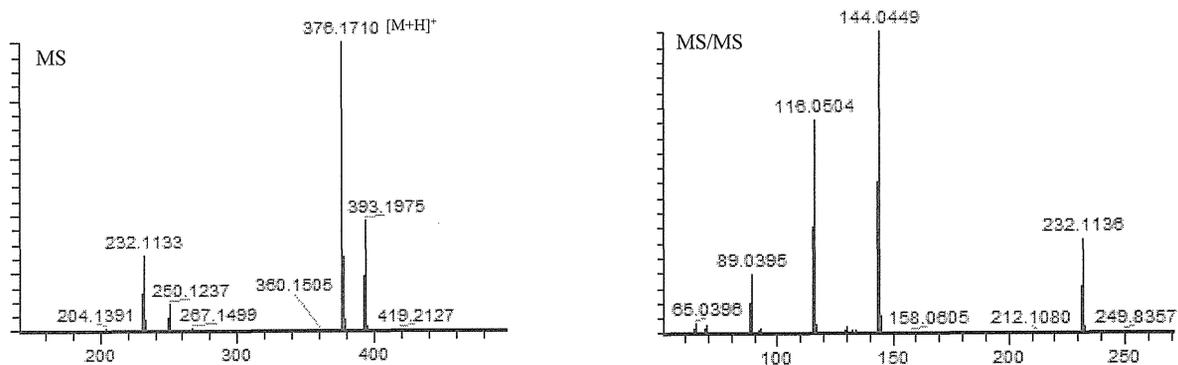


Fig 4 危険ドラッグ製品および標準試薬の DART-Orbitrap MS スペクトル

a) 製品 6



b) NM2201

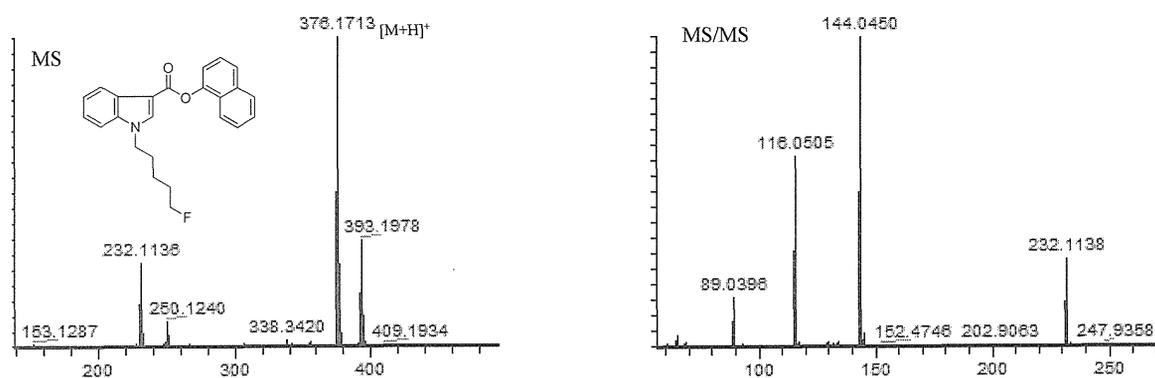


Fig 5 危険ドラッグ製品および標準試薬の DART-Orbitrap MS スペクトル

分担研究課題:新規流通未知化合物の迅速な構造決定手法に関する研究

研究分担者: 瀧野 裕之 (独)医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 栽培研究室長

—危険ドラッグの LC-NMR を用いた迅速分析法に関する研究—

今回2種類の危険ドラッグを試料として用い、その LC-SPE-NMR による迅速分析法の検討を行った。ディープエンジェルからは、目的とする2種類の化合物の NMR が観察された。一方、サンロックにおいては夾雑している別の化合物の含量が多く、目的とする化合物のピークに重なり NMR の測定を困難であったため、抽出法などの再検討が必要と思われた。しかしながら、当分析手法は、分離精製などの時間がかかる工程を省略でき、迅速に化合物の構造を確認するには適している手法と考えられた。

#### A. 研究目的

近年危険ドラッグを摂取したことが原因で引き起こされたとされる事故が多発し社会問題となっているが、それらはいわゆるハーブ類を元にした危険薬物の体内摂取により引き起こされる酪酐状態から誘発されたものと考えられている。いわゆる脱法ドラッグと呼ばれる多くのものは、規制がかかることを避け、その化学構造を微妙に変換し法を拘りぬけている。規制をかけるためには化合物の速やかな分析法の確立が急務である。

NMR ( Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: 核磁気共鳴スペクトル)は有機化合物の構造決定においては最も強力な分析手段と言えるが、近年 NMR がクライオプローブなどにより微量成分を高感度短時間で測定可能になったのを機に、その NMR に HPLC を連結し、HPLC による成分の分離後に直接 NMR を測定できる LC-NMR が急速に発展してきた。この手法においては例えば著しく不安定な化合物を HPLC で分離後に直接 NMR で構造解析を行うことや、植物エキスなどの多成分系のエキスを、化合物を単離することなく一斉に迅速に構造解析を行うことができるのが大きな利点であるが、従来の loop storage 法や on-flow 法などによれば、

HPLC の溶媒に高価な重水素化溶媒を使用する必要があり、また質量分析(MS)器を検出器に用いた場合、重水素化された質量数で検出されるなどの問題があった。最近溶媒消去技術が進歩し、軽水中でも測定が可能になってきたが、溶媒消去に伴う近傍ピークの影響などの問題が残されている。しかしながら近年固相抽出装置(Solid Phase Extraction: SPE)をさらに連結したシステムが出現し、それらの欠点を補うことが可能となった。そのため近年利用例が増えてきた LC-SPE-NMR を利用した迅速分析法が今回の研究目的には有効と考えられる(図1)。

今回、LC-SPE-NMR による脱法ドラッグの迅速分析法について検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 試料

A: ディープエンジェル(RUSH trip NEXT12 Tropicala) Diphenidine, 5-Fluoro AB-PINACA 含有

B: サンロック(Fuck you Ageha GREATIVE DESIGH)  $\alpha$ -PHP, DL-4662 含有

##### 標準品

Diphenidine, 5-Fluoro AB-PINACA,  $\alpha$ -PHP 塩酸塩, DL-4662 塩酸塩 (各 2 mg)は国立衛研生

薬部麻薬室より譲り受けた。

### 抽出方法

(方法1) 上記 2 種の脱法ドラッグ試料を粉碎せずそのまま約 50 mg をフィンガーマッシャー(ザルスタット社製)に入れて、メタノール 1.5 ml を加えて 5 分間両音波抽出を行った。抽出液は遠心フィルター(メルクミリポア社製)により濾過を行い、そのろ液を第1試料溶液とした。その残渣にメタノール 2.0 ml を加え、60°C 水浴上で約 10 分間加温し、その後超音波抽出 10 分間行い、遠心フィルターにて濾過したろ液を第2試料溶液とした。

(方法2) 試料 200 mg をそのままフィンガーマッシャー1 個につき約 50 mg 入れ、それぞれにメタノール 1.5 ml 加えてマッシャーを良く揉んだ後 60°C 水浴上で約 40 分加温した。その後超音波抽出を約 10 分行った。その後非水系シリンジフィルター(GL サイエンス社製、13N, 0.45 $\mu$ m)により濾過を行い、そのろ液を合わせてコンパクトエバポレーター(バイオクロマト社製、RAPID Extest Single Flex G2)により溶媒を一旦留去した。その後アセトニトリル 1.5 ml を加え、さらにメタノール 0.5 ml を加えて多少 60°C 水浴上で加温しながら溶解し、その後同様に非水系シリンジフィルターに通し、そのろ液を試料溶液とした。

(方法3) 上記2の方法にて得られた試料溶液を約半量までコンパクトエバポレーターにて濃縮し、試料溶液とした。

### 使用機器

#### LC-SPE-NMR

BRUKER 社製 600MHz LC-NMR(ASCEND)

HPLC 部 Agilent 1000 シリーズに SPE system を接続して用いた。

#### HPLC 条件

検出器: UV (254 nm)

カラム:

Intakt UK C18 (4.6x150mm) (条件1)

Waters Atlantis T3 3 $\mu$ m (4.6x150mm) (条件2~4)

カラム温度: 40°C

溶媒: A: 0.1% ギ酸、 B: 100%アセトニトリル

グラジエント条件:

(条件1)

0~50 min 90%A→80%A

50~60min 80%A→30%A

60~61min 30%A→90%A

61~70min 90%A

70min END

流速: 0.5ml/min

(条件2)

0~50 min 90%A→80%A

50~60min 80%A→10%A

60~61min 10%A→90%A

61~70min 90%A

70min END

流速: 0.6ml/min

(条件3) ディープエンジェル マルチトラップ用条件

0-30min 50%A→90%A

30-35min 90%A

35-36min 90%A→50%A

36-46min 50%A

流速 0.6ml/min

(条件4) サンロック マルチトラップ用条件

0-30min 85%A→70%A

30-35min 70%A

35-36min 70%A→85%A

36-46min 85%A

流速 0.6ml/min

注入量:

1 または 5  $\mu$ l (試験的検討時)

20  $\mu$ l または 40, 80, 100  $\mu$ l (SPE 分取時)

SPE カートリッジは使用前に洗浄、コンディショニングを行いトラッピングを行った。またトラッピング後は 30 分間窒素ガスで乾燥し、flow injection モ

ードで重水素化溶媒による溶出で NMR プローブに送液された。

#### LC/MS

MS 部:Orbitrap Elite (ThermoFischer Scientific)

LC 部:Ultimate 3000 シリーズに荷電化粒子検出器(CAD) Corona Ultra をスプリットにより連結

イオン源:ESI

positive mode で行った。

ただし図 26 のサンロック回収フラクションの検出においてはイオン源は APCI にて行った。

#### 標準品塩酸塩の遊離塩基の調製

$\alpha$ -PHP 及び DL-4662 は塩酸塩として提供されたため、以下に示す方法にて遊離塩基とした。

各試料 2 mg をサンプル管に入れ、10%アンモニア水約 2 ml、ジクロロメタンを約 2 ml 加え、蓋をして室温下振り混ぜた。その後精置し、下層をパスツールピペットにて採取しコンビニエバポで溶媒を留去して遊離塩基を得た。

#### C. 研究結果

国立衛研生薬部第3室から提示された抽出条件である上記の抽出方法1に従い得た第1試料溶液を LC-NMR にて分析を行った。

#### 試料 A (ディーブエンジェル)

試料 A については、条件2における LC/MS では、保持時間 55 分( $m/z$  266; diphenidine に相当)と 59 分( $m/z$  349; 5-Fluoro AB-PINACA に相当)の二つの目的ピークがクロマトグラムの後半に現れたため(図3)、SPE のマルチトラッピングを行うには不利であるため、保持時間が短くなるような濃度勾配設定を行った。LC のグラジエント条件を、Diphenidine と 5-Fluoro AB-PINACA の混合メタノール溶液を用いて LC/MS にて検討を行った。その結果初期条件を 50%A として 90%A までのグラジエント(条件3)にて 2 つのピークが 10 分以内に検出されることが分かった(図4)。またこの 2 つの化合物に由来するピークは 5-Fluoro AB-PINACA は TIC, CAD (Corona Aerosol

Detector; 荷電化粒子検出器), UV (210, 254nm) 検出のいずれにおいても顕著に検出されるのに対し、Diphenidine は LC/MS において 2 つのピークが現れたが、それらは TIC では検出されるものの、CAD では検出されず、また UV においても極めて感度が低いことが分かった。そこで条件3による HPLC 条件を用いて LC-NMR で分析条件(注入量 5 $\mu$ l: 検出 254nm)にて行ったところ、LC/MS 検討の際の HPLC プロファイルとはほぼ同じチャートを与えた。しかしながら SPE トラップのために注入量を増やしたところ(100~200 $\mu$ l)、図6に示すように、目的ピークの近傍に大きなブロードピークが現れた。これは試料溶液が 100%メタノール溶液であり、HPLC の送液溶媒(0.1%ギ酸/アセトニトリル混合溶液)と大きく異なるためにカラムに試料溶液が注入された後に、メタノールにより化合物が引かれて早く溶出してしまい起きた現象と思われた。注入量を減らし 50 $\mu$ l で注入した場合でもブロード化が起きた。このような場合は通常抽出溶媒を HPLC の展開溶媒に合わせることで解決策として考えられるが、目的物がアセトニトリルにより効率良く抽出されるかが不明であり、かつ水溶液中では目的物の析出が予想されるため、抽出条件の再検討を方法2のように行った。すなわちメタノール抽出後に溶媒を留去しアセトニトリル/メタノール混合溶媒(3:1)にて再溶解して試料溶液を調製した。それにより若干解消したもののやはり同様の現象が起きたため、最終的には本試料溶液を約半量に濃縮して(方法3)注入量を 80 $\mu$ l として行った結果、図7に示すようにブロードニングは解消された。よって、濃縮後の溶液を 80 $\mu$ l を注入量とし、この条件でマルチトラッピングを行った。

本条件で SPE へトラッピングを行い、Fr.1 ~ 3 を CD<sub>3</sub>CN で溶出し NMR を測定した。LC/MS の検討で 5-fluoro AB PINACA に一致したピークに相当する Fr.3 の <sup>1</sup>H-NMR においては、明らかな芳香環領域でのシグナルとダブルットの末端ジ

メチルに由来するシグナルを確認した(図 8~10)。標準品の NMR と比較するとそのケミカルシフト値は一致した(図 11)。また Diphenidine に相当すると思われる Fr.1 または 2 においては濃度が薄いため明確なシグナルが観察されないが、標準品のシグナルに相当するケミカルシフト値にシグナルが観測されている(図 12)。

#### 試料 B(サンロック)

試料 B においては最初に試験的に条件1を用いて HPLC クロマトグラムを取得した。その結果、UV クロマトグラム (254nm) において保持時間 39 分及び 43 分付近に顕著なピークが認められた。しかしながら 43 分付近のピークにおいては 2 つのピークが重なっていたため(図 13)、条件2にて再度検討を行った。条件2においては上記 2 つの顕著なピークは 36 分と 40 分付近に認められた(図 14)。後半のピークに重なっていたピークは 2 つのピークの間移動したため条件 2 により SPE への分取を行うこととした。この中間ピークは濃度を高くすると消失するため、溶媒中の impurity と推定された。60 分までの間では上記 2 つ以外に目立つピークは認められなかった。しかしながら条件2においては 60 分後のグラジエント戻し(10%A から 90%A に急激に戻し初期条件で安定化させる)の段階において大きな 2 つのピークを認めた。よってこれらも含めて SPE によるマルチトラッピングを行うこととした。

(Try1) 条件2において、保持時間 36 分、40 分の二つのピークの他、グラジエント戻し中に出現する 2 つのピーク(36 分、40 分)について各 20  $\mu$ l インジェクションで計 5 回のマルチトラッピングを実施した。Flow injection において、SPE に吸着させた分取ピークは最初 CD3OD にて溶出し、NMR へ移送し測定を行ったが、溶媒及び水のピークが大きく検出され double presaturation シーケンスにより溶媒を消去した後の消し残りシグナルが大きく解析が困難であった。しかしながらその NMR においては保持時間 36 分のピークから

は明らかに芳香環領域のシグナルが認められたが、保持時間 40 分のピークをトラッピングした SPE から得られた NMR では、ほとんどが溶媒と SPE 不純物に由来すると思われるシグナルのみが観測された。そこで再度マルチトラッピングを行い NMR 測定溶媒を  $CD_3CN$  に変更して再度 SPE からの溶出をした。その結果、ピーク A (DL-4662 に相当すると思われるピーク)の NMR からは 2 本のメキシルシグナルの他、芳香環由来のシグナルが認められた。しかしながらピーク B については SPE 由来と思われる不純物ピークの他、顕著なシグナルが認められなかった。

そこで確認のため、本抽出エキスを ESI-Orbitrap MS (Orbitrap Elite, ThermoScientific) により同条件にて LC 設定をし、2 種類の標準品を用いてそれぞれのピークの溶出時間と UV 吸収の確認を行った。その結果、本抽出液中には DL-4662 は感度よく検出されるが、 $\alpha$ -PHP は、本抽出液中では XIC においては  $m/z$  246  $[M+H]^+$  で検出されるが、UV ではほとんど検出されないことが分かった(図 15~17)。これは濃度による問題と考えられ、抽出が不十分であったと推定された。このことから、先行して行った LC-NMR におけるピーク B は目的とする  $\alpha$ -PHP ではないことが分かった。LC/MS との比較から、ピーク B の直後に  $\alpha$ -PHP は溶出されていると考えられた(図 17)。

そこで再度第1回目の抽出残渣にメタノールを加えて加温、超音波抽出を行った第 2 試料溶液について LCMS を再度検討した。その結果においても  $\alpha$ -PHP は UV においては検出されなかった。

そこで試料溶液の調製を方法3にて行い再度検討を行った。試料を 200mg 用いて試料溶液を作成し、その濃縮溶液を用いて LC-NMR による SPE トラッピングを行った。一回 40 $\mu$ l をインジェクションし、計 22 回のマルチトラッピングを行った(46min x22 約 17 時間)。先の LC/MS 結果と合

わせ、目的とする DL-4662 は保持時間 13 分の Fr.1、 $\alpha$ -PHP は保持時間 22 分の大きなピークの後ろ側と判断し、Fr.5 としてトラップを行った(図 18)。その Fr.5 の  $^1\text{H-NMR}$  を測定したところ、3.82、3.87ppm に明確な 2 本のメキシル基が確認された他、0.93ppm に末端メチル基由来の 3H 分のトリプレット、1.64ppm にメチレン由来の 2H 分の 6 重線、2.8ppm に 2H 分のメチレン由来の 2H 分のトリプレット、また芳香環領域に 7.0ppm に ortho-カップリングをした 1H 分のダブルレットシグナル、7.5ppm に ortho-カップリングと小さな meta カップリングをしていると推定されるブロードダブルレット、7.45ppm に meta カップリングをしていると推定される 1H 分のブロードシングレットを観測した。またその  $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC、HMBC スペクトルから推定される構造式は、1-(3,4-dimethoxyphenyl) butan-1,2-dione(図 23)と推定された。しかしながら、本化合物は DL-4662 の化学構造とは異なっている。そこで DL-4662 の標準品の NMR を塩酸塩および遊離塩基の 2 種類と比較してみたところ、どちらとも一致しなかった(図 24)。

Fr.1 についても NMR では Fr.5 と同じ NMR を与えた。そこで回収後の TLC を確認したところ、抽出エキス中の低極性画分にある 254nm 照射下で強い吸収のあるスポットが fr.1,4,5 の各フラクションにいずれも認められることが分かった(図 30)。また DL-4662 と  $\alpha$ -PHP のスポットはそれぞれのフラクションに認められるものの、非常に弱く、よって本抽出エキスにおける主成分である 1-(3,4-dimethoxyphenyl) butan-1,2-dione と推定される化合物がテーリングして各フラクションに重なっていると判断した。本化合物は天然物としては考えにくく、何らかの過程で試料中に混入されたものと考えられるが、抽出過程で長時間の超音波抽出を行っているが、本化合物の合成法で

は前駆体のオキシムを超音波処理により生成することから (Yu Liu et al., Synthesis 18, 2984-2994 (2011))、超音波抽出中に発生した可能性もある。

#### D. 考察

今回 2 種類の危険ドラッグを試料として用い、その LC-SPE-NMR による迅速分析法の検討を行ったが、ディープエンジェルからは、目的とする 2 種類の化合物の NMR が観察されたものの、サンロックにおいては夾雑している別の化合物の含量が多く、目的とする化合物のピークに重なり NMR の測定を困難にしていると思われた。解決策の一つとしては、抽出条件を変更し、極性が低い夾雑物を抽出しにくくするなどの前処理の検討が必要と思われた。しかし本夾雑化合物は抽出過程で生成している可能性も否定できず、さらなる検討が必要である。

#### E. 結論

2 種類の危険ドラッグの LC-SPE-NMR の検討においては、ディープエンジェルについては LC-NMR による検出は可能と考えられた。サンロックについてはさらなる抽出条件の検討が必要であった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし

## Outline of LC-NMR/MS and LC-SPE-NMR

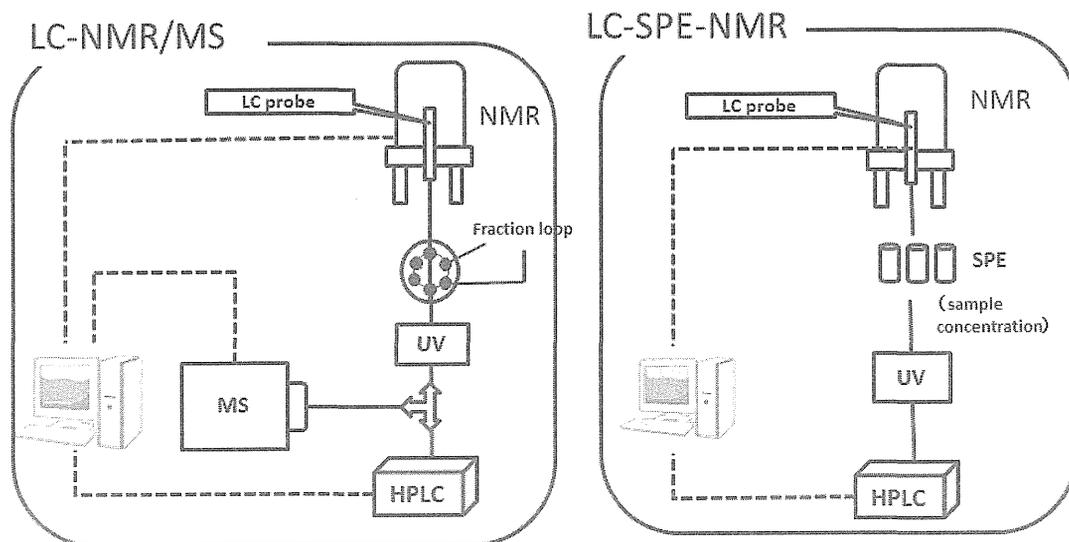


図1 LC-NMR/MS と LC-SPE-NMR の概略図

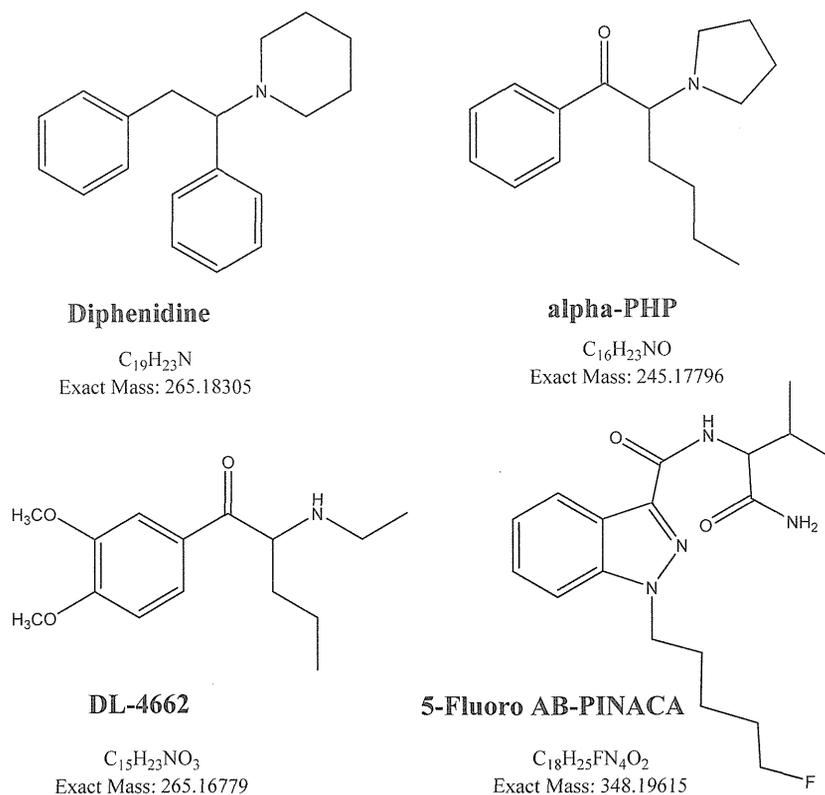


図2 試料 A,B に含有される化合物の化学構造

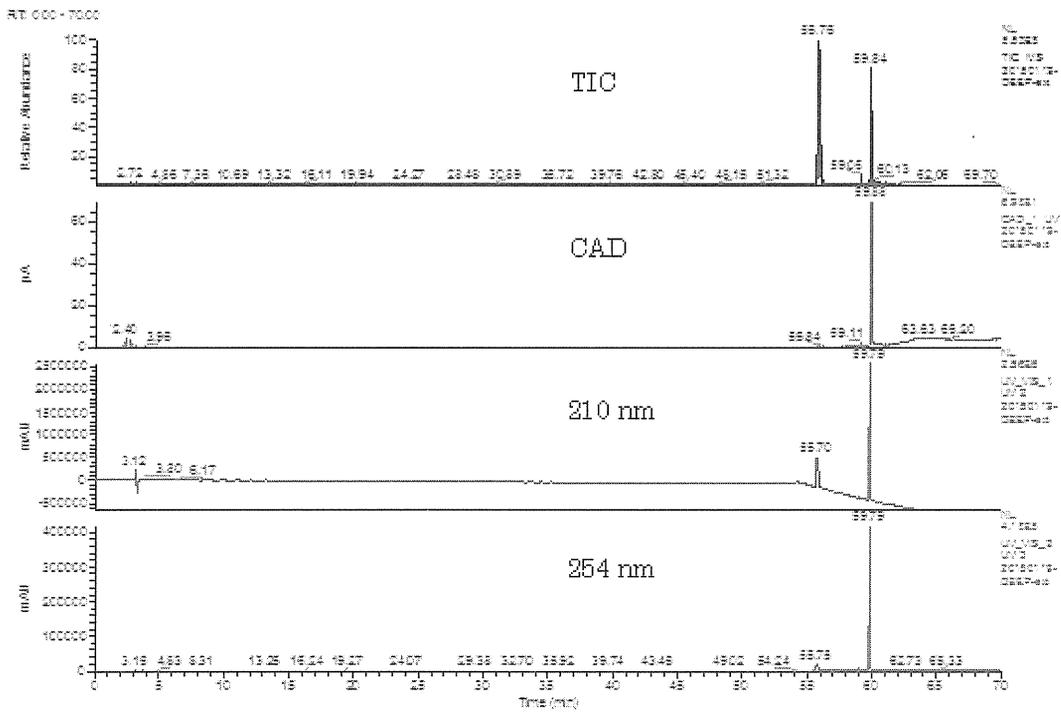


図3 試料A(DEEPANGEL)のESI-Orbitrap MS (positive mode)のTIC, CADおよびUVクロマトグラム (条件2)  
(上段より:TIC, CAD, UV (210 nm), UV (254 nm))

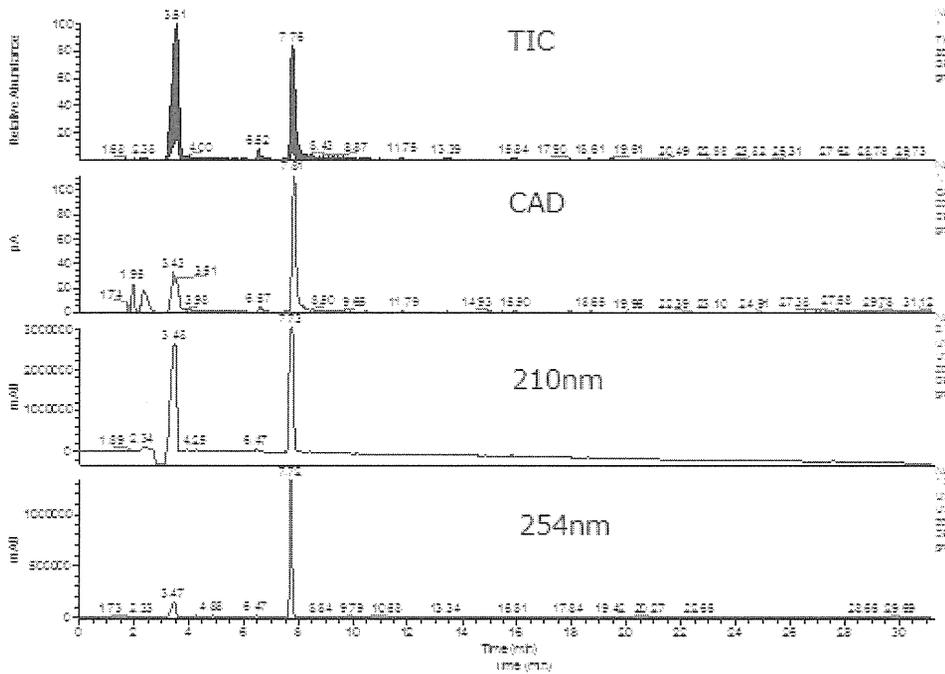


図4 試料A(DEEPANGEL)のESI-Orbitrap MS (Positive mode)のTIC, CADおよびUVクロマトグラム (条件3)

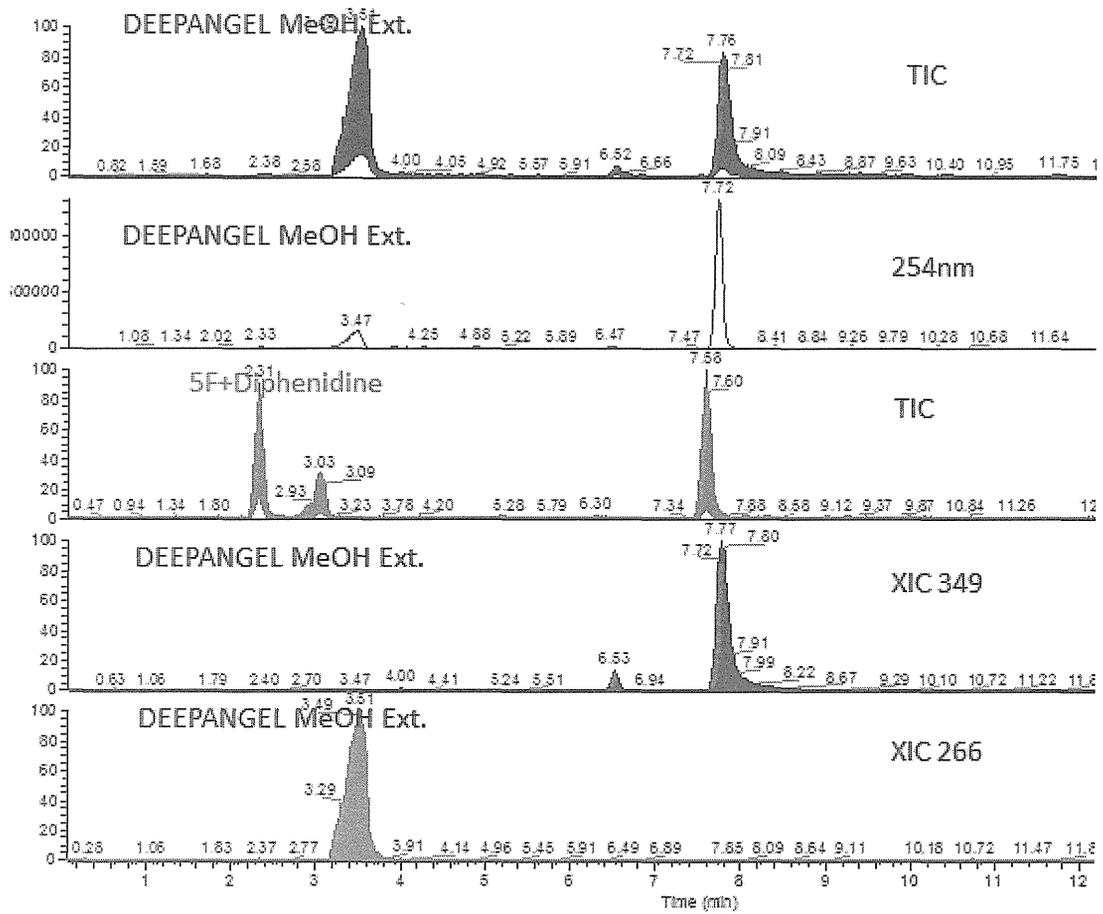


図5 試料A(DEEPANGEL)および標準品2種混合物(5-Fluoro AB CANAPA +Dipnenidine)のESI-Orbitrap MS (positive mode) TIC, XIC および UV クロマトグラム (条件3)

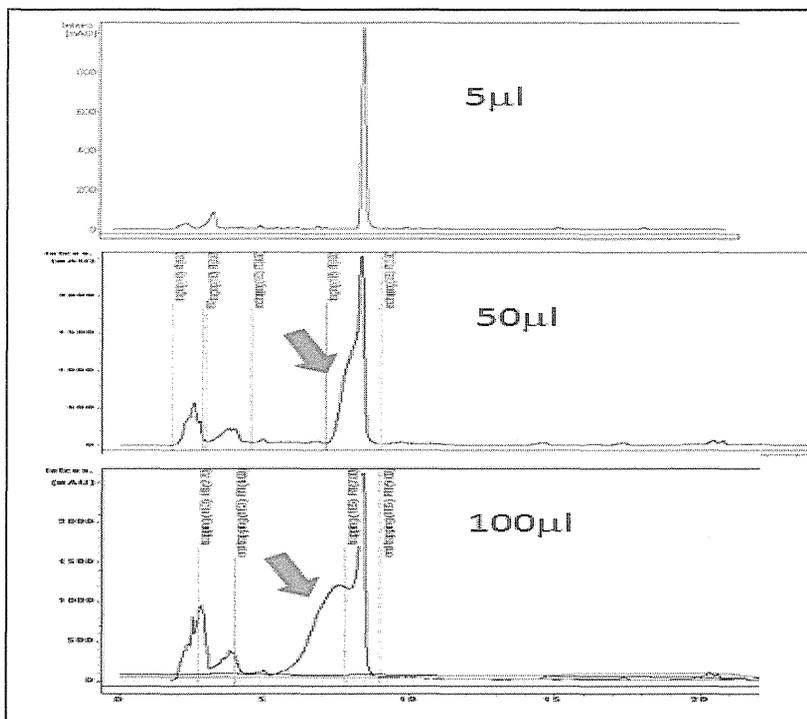


図6 試料A(DEEPANGEL)メタノール抽出溶液のLC-NMRにおける各注入量でのUV クロマトグラム(254 nm) (条件3)

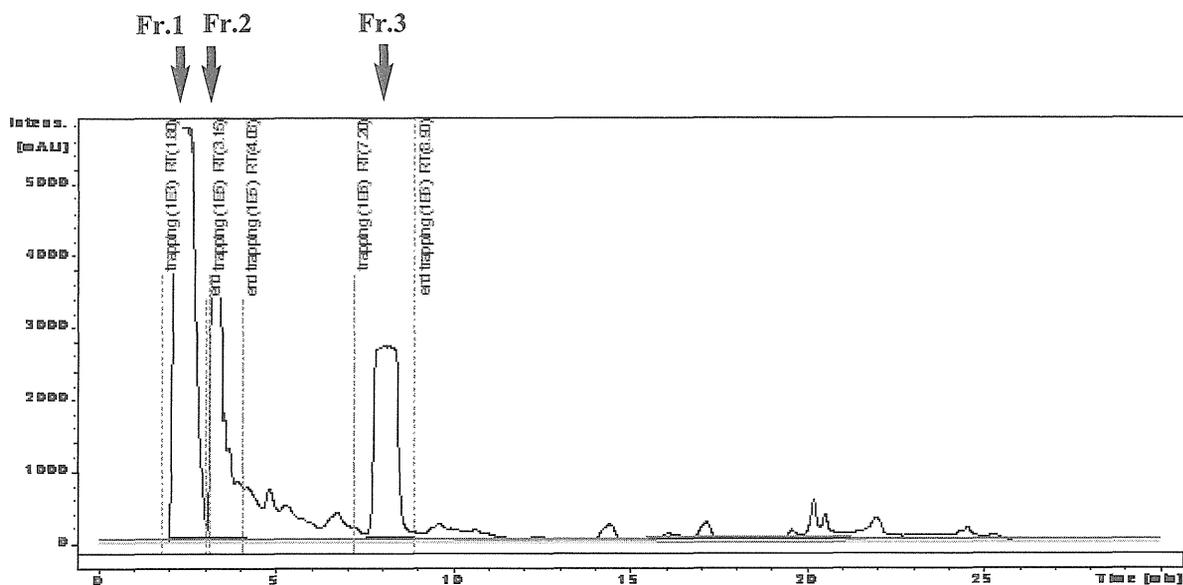


図7 試料 A (DEEPANGEL)メタノール抽出溶液の LC-NMR における  
方法3抽出 (injection: 80  $\mu$ l) での UV クロマトグラム(254 nm) (条件3)

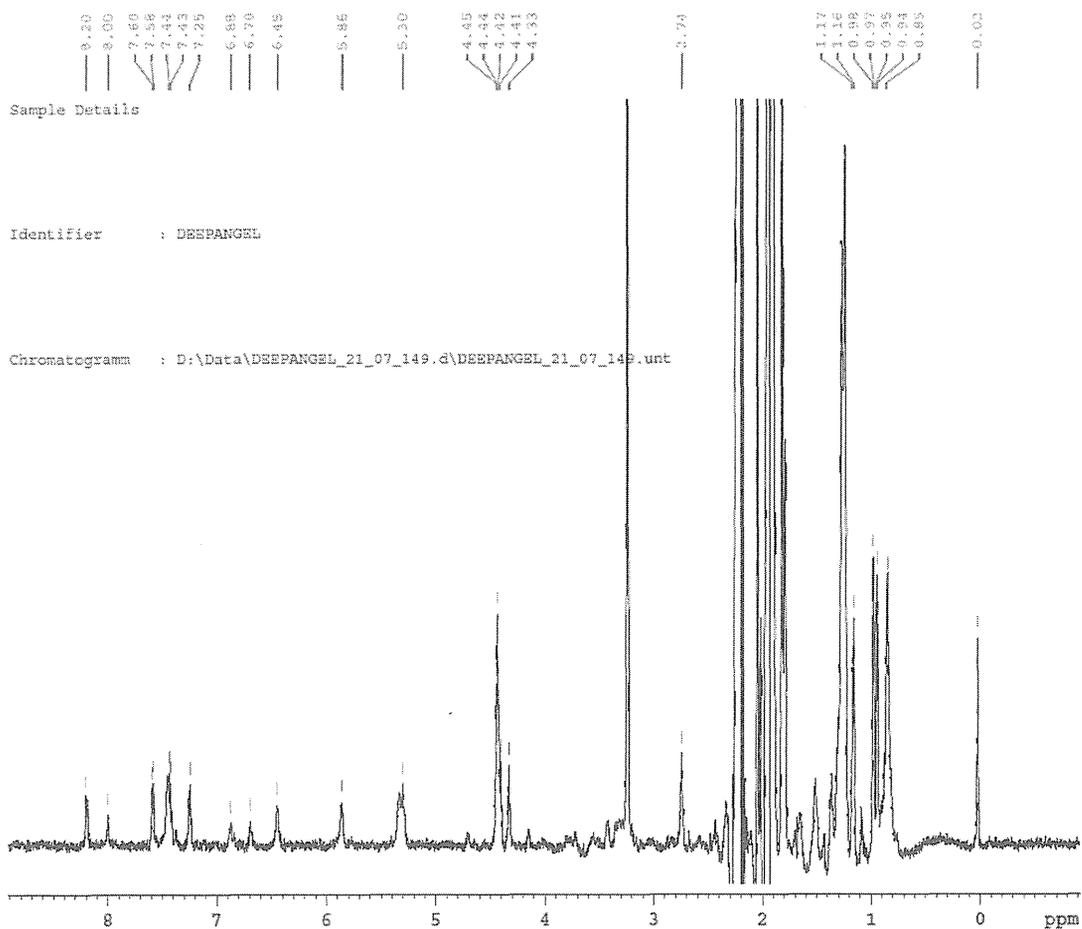


図8 試料 A (DEEPANGEL) LC-NMR における Fr.3 の  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz)

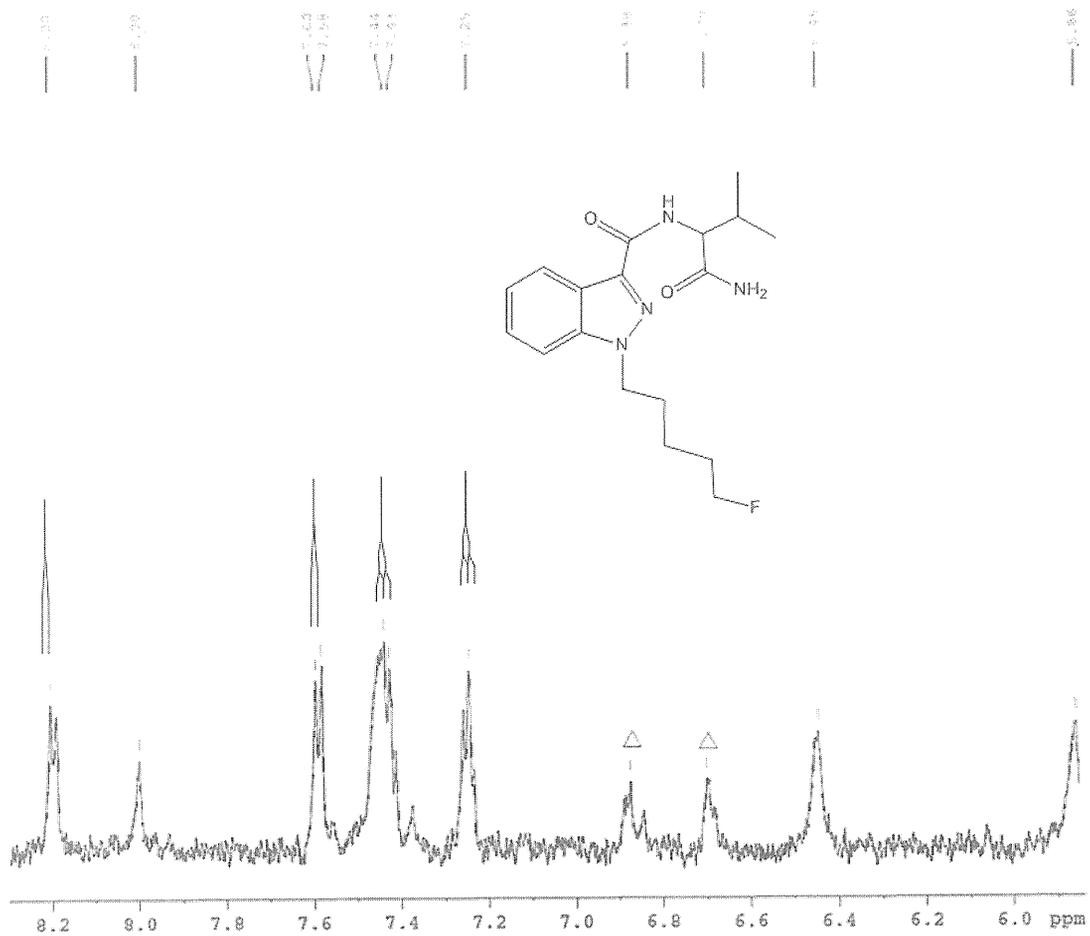


図9 試料 A (DEEPANGEL) LC-NMR における Fr.3 の  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) (拡大)

$\Delta$ 不純物由来

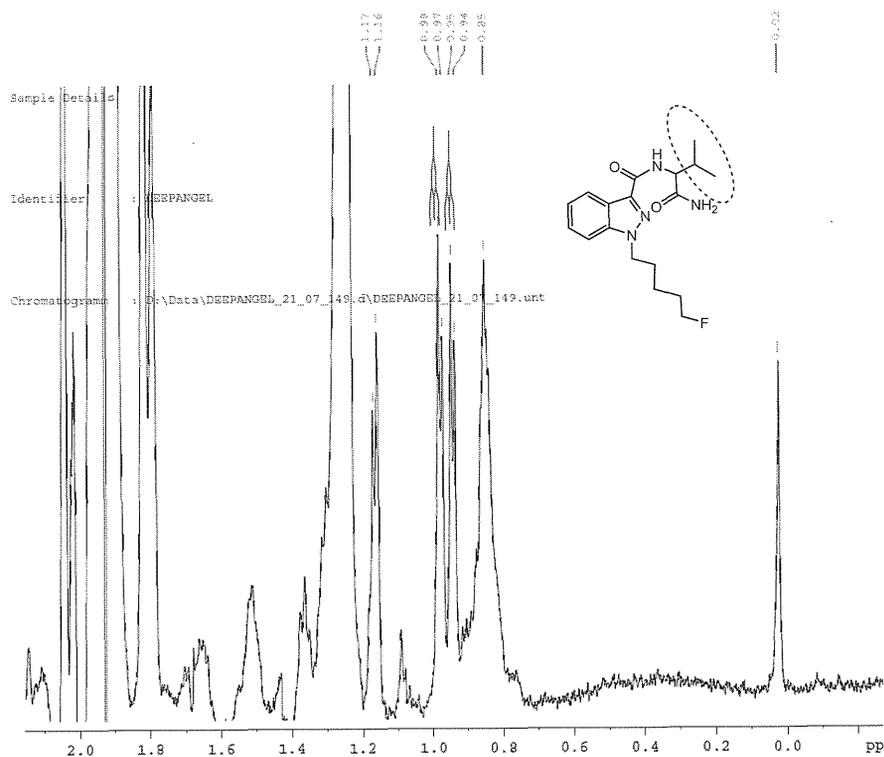


図10 試料 A (DEEPANGEL) LC-NMR における Fr.3 の  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) (拡大)

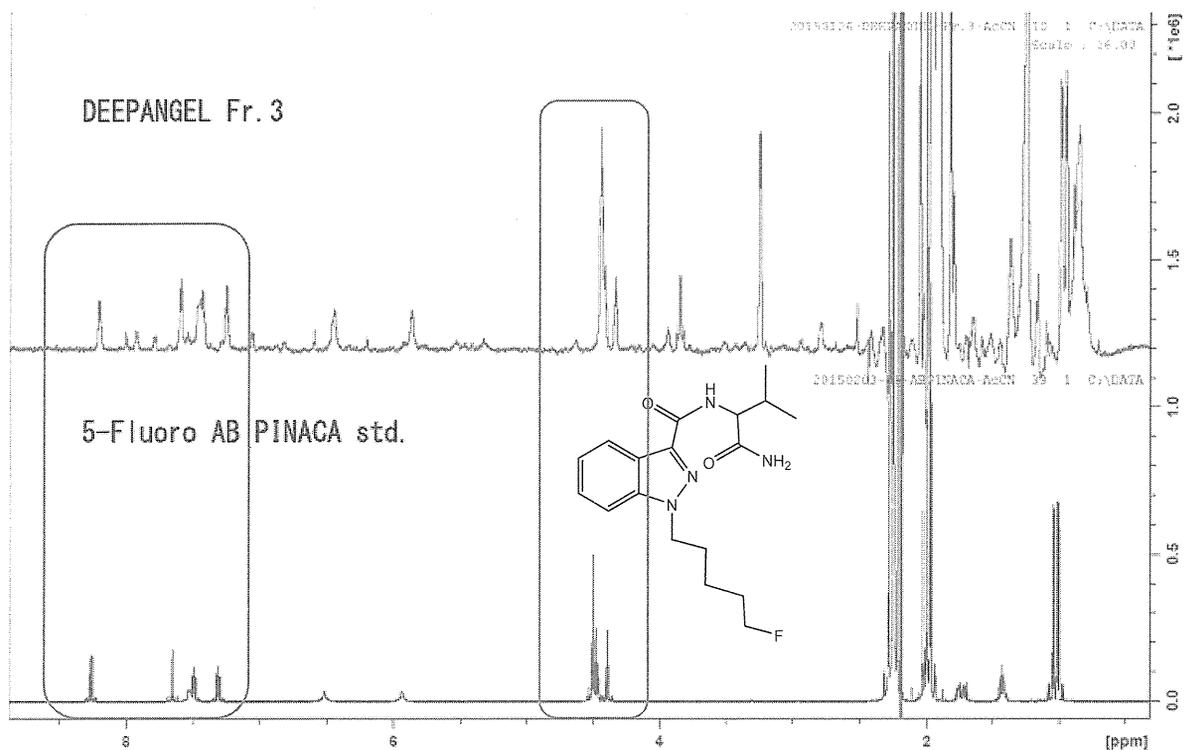


図 11 試料 A (DEEPANGEL) LC-NMR における Fr.3 と 5-F AB PINACA 標品の<sup>1</sup>H-NMR 比較

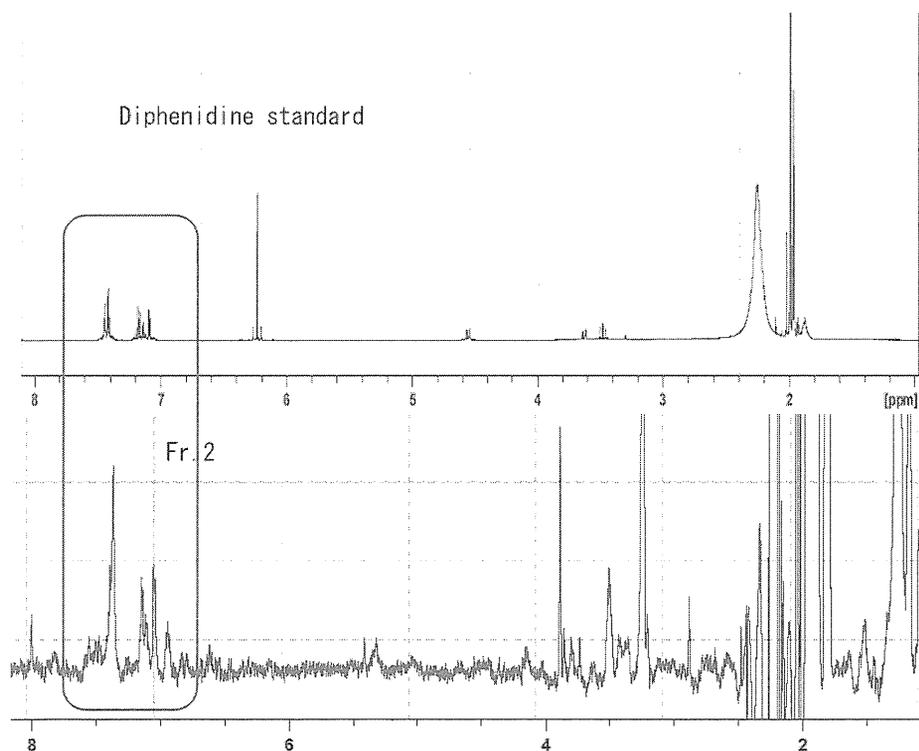


図 12 試料 A (DEEPANGEL) LC-NMR における Fr.2 と Diphenidine 標品の<sup>1</sup>H-NMR 比較

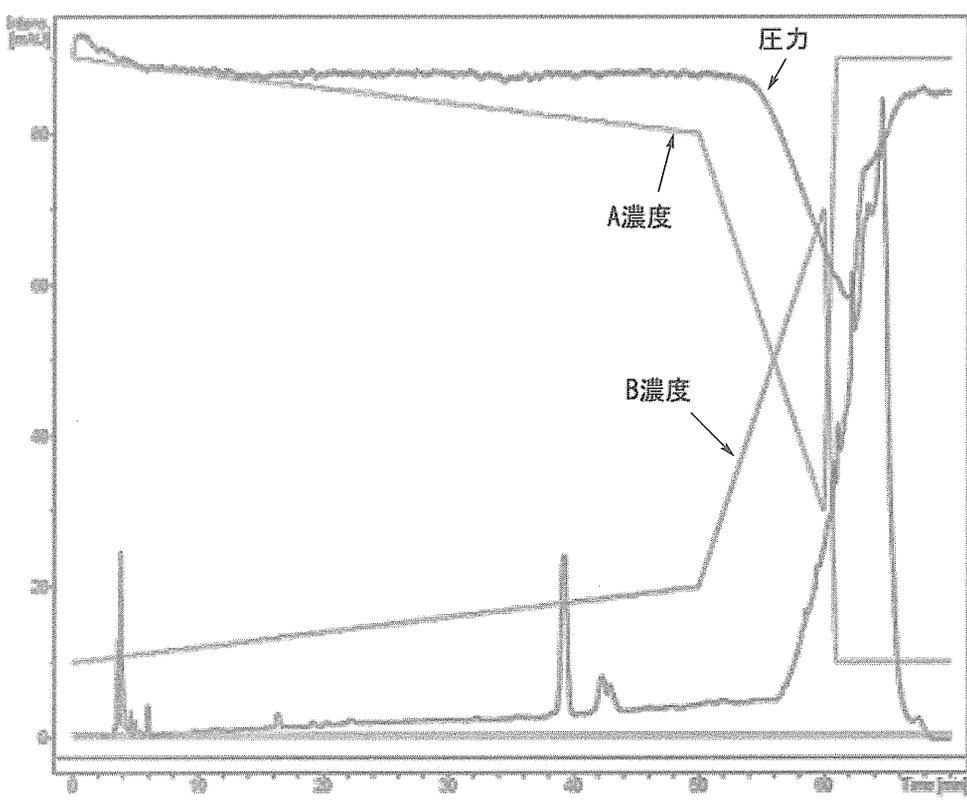


図 13 条件 1 における試料 B (サンロック) の HPLC クロマトグラム (UV 254nm)

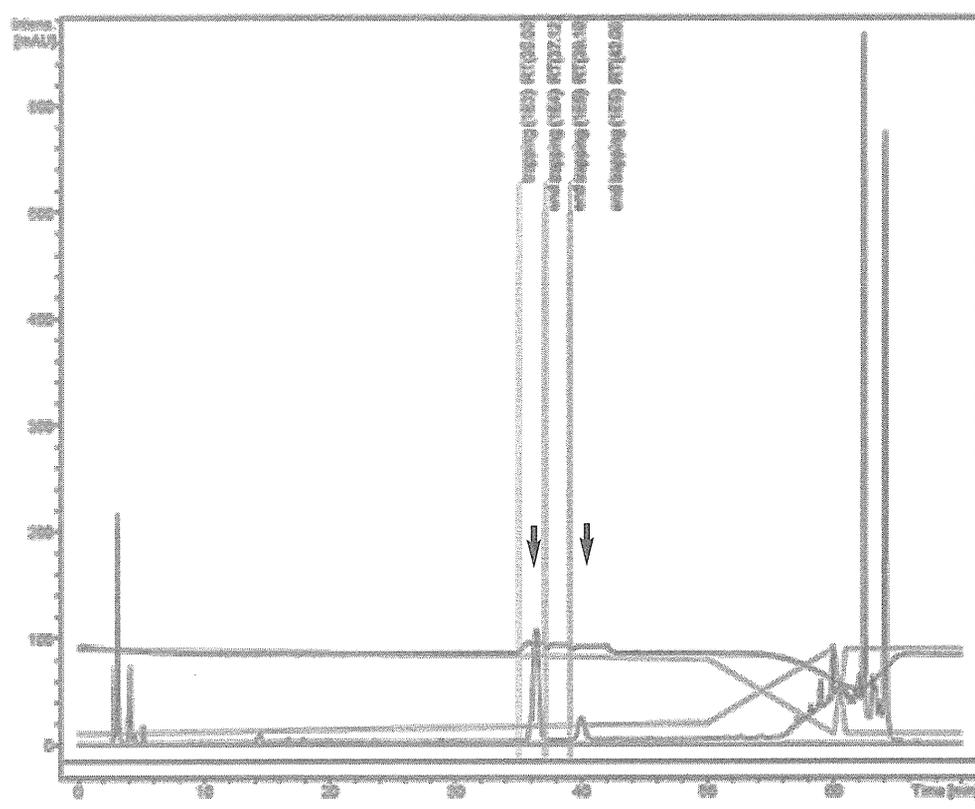


図 14 条件 2 における試料 B (サンロック) の HPLC クロマトグラム (254 nm)

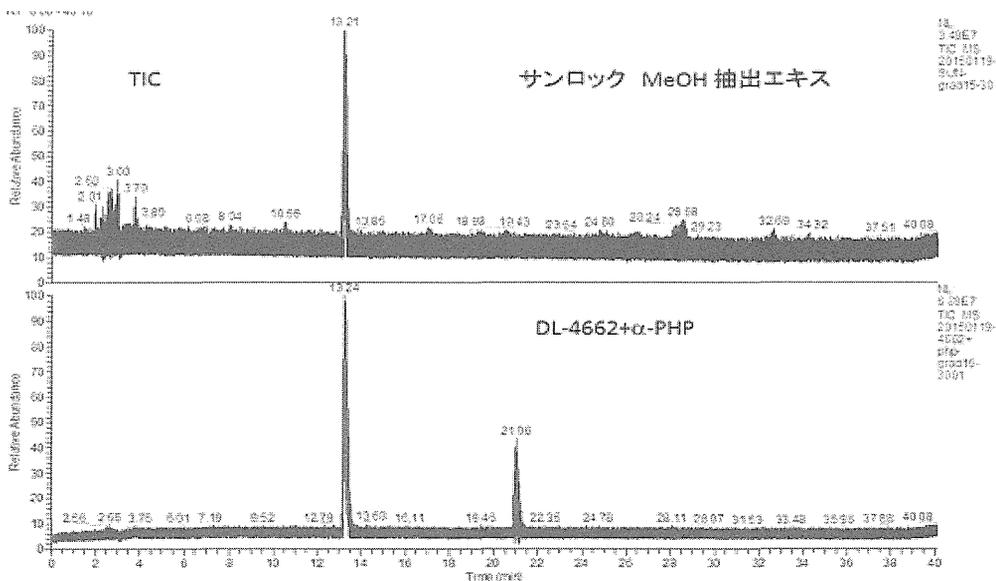


図 15 試料 B (サンロック) 及び DL-4662 と  $\alpha$ -PHP 混合溶液の LC/MS (TIC)

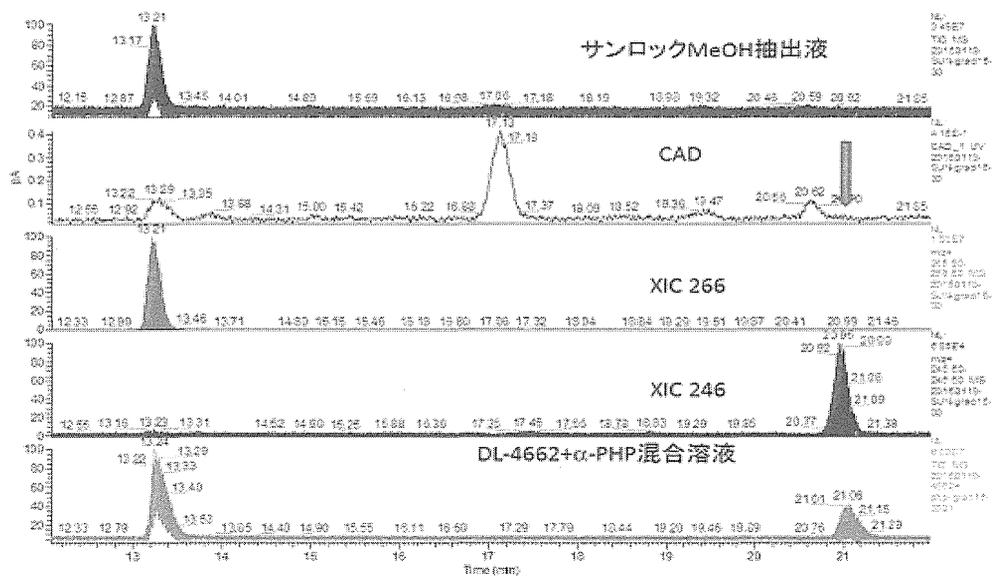


図 16 試料 B (サンロック) 及び DL-4662 と  $\alpha$ -PHP 混合溶液の LC/MS (TIC)  
(上から試料 B の TIC, CAD, XIC266, XIC246, DL-4662 と  $\alpha$ -PHP 混合溶液 TIC)