

資 料

構造判定が困難な指定薬物の同定に資する基礎研究

岩木孝晴, 神山恵理奈, 林 真由香, 森川美空*, 伊藤宏輔*, 岩井康晴*,
曾田 翠*, 北市清幸*, 伊藤哲朗**, 田中宏幸*, 清水英徳

要 旨

麻薬や指定薬物として規制されるフェンタニル化合物の位置異性体は僅かな構造の違いにより規制対象外となる。これらは物性が類似するため識別が困難である。なかでも、アニリン環部分がフッ素置換されたフェンタニル化合物とその位置異性体との識別法は未だに十分に示されていない。本研究では、アニリン環部分がフッ素置換された2-フラニルフェンタニル、シクロペンチルフェンタニル及びシクロヘキシルフェンタニルを対象として、フッ素の結合位置が異なる異性体の識別について検討した。GC-MSによる識別では、マススペクトルによる識別は困難であったが、保持時間の違いによって識別可能であった。LC-MS/MSによる識別では、フルオロ-2-フラニルフェンタニルの異性体間でプロダクトイオンスペクトルが酷似するとともに、保持時間による識別も困難であった。

キーワード：危険ドラッグ、構造識別、フェンタニル、フッ素位置異性体

1 はじめに

フェンタニル (図1) は、オピオイド μ 受容体を選択的に作動するペリジン系鎮痛薬であり、その鎮痛作用はモルヒネの約50~100倍とされている¹⁾。

米国では1999年から2020年の22年間に56.4万人以上がオピオイドの過剰摂取で死亡するなど²⁾、その不適切な使用が社会問題となっている。一方、我が国ではフェンタニル及びその構造類似物は、麻薬及び向精神薬取締法による麻薬として、また、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律による指定薬物として指定されており、規制対象となる化合物は年々増加している。これらは化学構造式としてそれぞれ指定されているが、置換基の結合位置

が異なる位置異性体など、僅かな構造の違いにより規制対象外となる化合物は無数に存在する。規制対象物と規制対象外の位置異性体の物性が類似するため識別が困難である。

当所では、指定薬物の誤同定防止に資するための基礎研究の一環として、これまでに合成カンナビノイドの構造識別のための分析法の開発を進めてきた³⁾⁶⁾。合成カンナビノイド FUB-JWH-018 に関しては、フルオロベンジル基におけるフッ素結合位置に着目し、その異性体識別法について報告している⁴⁾⁶⁾。

フェンタニルにもアニリン環部分がフッ素置換されたフェンタニル化合物が存在し、令和4年10月末時点で5化合物が麻薬として指定されている。これは、麻薬指定されるフェンタニル化合物 (全27化合物) の約19%に相当する。しかし、これらの化合物とその位置異性体との識別法は未だに十分に示されていない。そこで本研究では、アニリン環部分がオルト位 (*o*-), メタ位 (*m*-), パラ位 (*p*-) でそれぞれフッ素置換されたフェンタニル化合物の位置異性体識別について検討した。麻薬である2-フラニルフェンタニル (2-FF)、指定薬物であるシクロペンチルフェンタニル (CPF) に規制対象外のシクロヘキシルフェンタニル (CHF) を加えた3化合物に着目し、それぞれアニリン環部分がオルト位、メタ位、パラ位でフッ素置換されたフ

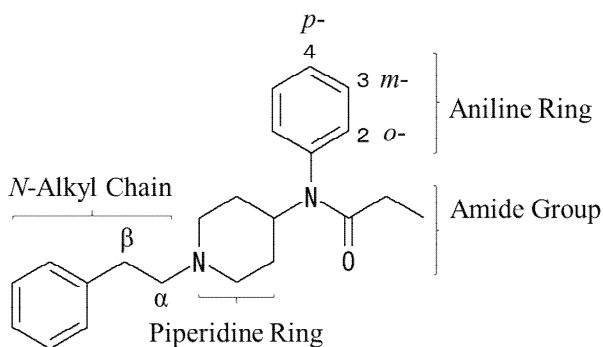


図1 フェンタニルの化学構造

ルオロ-2-フラニルフェンタニル (F-2-FF), フルオロシクロペンチルフェンタニル (F-CPF) 及びフルオロシクロヘキシルフェンタニル (F-CHF) (計9化合物)を対象化合物した(図2)。この9化合物は、令和4年10月末時点でいずれも規制対象外であるが、合成が可能であることから、今後、流通や法規制化の可能性がある。これらの化合物は入手可能な市販品がなかったため、本研究では、各化合物を合成し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)及び液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いた測定により識別を試みた。

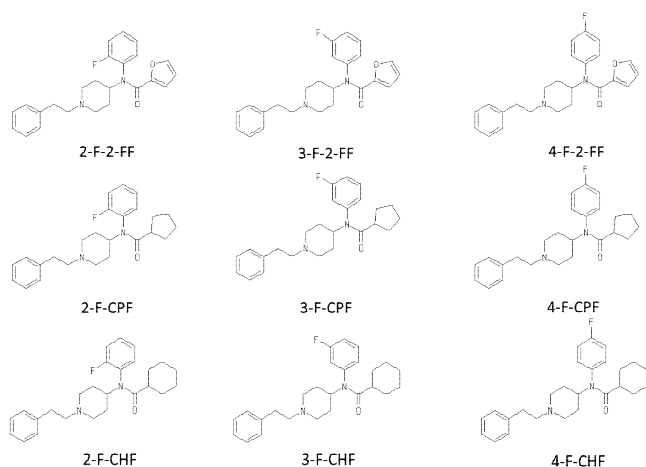


図2 識別対象のフェンタニル化合物の化学構造

2 材料と方法

2.1 試薬

クロロホルム-*d*, 99.8% (0.05vol%TMS 含有), メタノール (LC/MS 用), アセトニトリル (LC/MS 用) 及びギ酸 (LC/MS 用) は、富士フィルム和光純薬工業製を用いた。その他の試薬については、市販の特級または一級グレードのものを用いた。

2.2 フェンタニル類似化合物の合成

2-フルオロ-2-フラニルフェンタニル (2-F-2-FF), 3-フルオロ-2-フラニルフェンタニル (3-F-2-FF), 4-フルオロ-2-フラニルフェンタニル (4-F-2-FF), 2-フルオロシクロペンチルフェンタニル (2-F-CPF), 3-フルオロシクロペンチルフェンタニル (3-F-CPF), 4-フルオロシクロペンチルフェンタニル (4-F-CPF), 2-フルオロシクロヘキシルフェンタニル (2-F-CHF), 3-フルオロシクロヘキシルフェンタニル (3-F-CHF), 4-フルオロシクロヘキシルフェンタニル (4-F-CHF) は、既報⁷⁾を参考に合成した。合成した9化合物は、GC-MS 及び核磁気共鳴装置 (NMR) により構造を確認した。各成品は、メタノールに溶解して、1 µg/mL の濃度の溶液とし、分析に用いた。

2.3 分析方法

金森らの方法⁸⁾を参考に、以下の条件で測定した。

GC-MS 装置: TRACE 1310GC/ISQ LT (Thermo Fisher Scientifics 社製), カラム: DB-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 µm, J&W scientific 社製), カラム温度: 120°C (1 分保持) -15°C/分-300°C (9 分保持), キャリアガス: He (1.0 mL/分), 試料注入量: 1 µL, 試料注入: スプリットレス, 注入口温度: 250°C, トランスファーライン温度: 250°C, イオン源温度: 250°C, イオン化法: 電子イオン化 (EI (+)), 測定モード: スキャン (m/z 50-650)

LC-MS/MS 装置: 1200 Series / 6460 Triple Quadrupole MS (Agilent Technologies 社製), カラム: ZORBAX Eclipse Plus C8 (2.1×150 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies 社製), 移動相: 0.1 % ギ酸 / 0.1 % ギ酸アセトニトリル混液 (20:80), 流速: 0.18 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 5 µL, イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化 (ESI (+)), 測定モード: プロダクトイオンスキャン

NMR 装置: JNM-ECZ 400S (日本電子株式会社製, 400MHz), 測定核種: ¹H, 積算回数: 8, 溶媒: クロロホルム-*d*

3 結果及び考察

3.1 GC-MS による識別

合成した 9 化合物のうち 2-F-2-FF, 3-F-2-FF 及び 4-F-2-FF の 3 化合物について、アニリン環におけるフッ素結合位置の異なる位置異性体を識別するため GC-MS による測定を行った。保持時間の短い順から、3-F-2-FF, 4-F-2-FF, 2-F-2-FF となり、これらの 3 化合物の混合溶液を測定したところ、トータルイオンクロマトグラム上で各ピークが明確に分離した (図3)。マスペクトルでは電子イオン化法により開裂したフラグメントイオンとして、いずれも m/z 301, 258, 95 が観測された (図4)。推定される開裂様式を図5に示す。3 化合物間において、マスペクトルを比較したが、明確な差異は見られなかった。

次いで、2-F-CPF, 3-F-CPF 及び 4-F-CPF の 3 化合物及び 2-F-CHF, 3-F-CHF 及び 4-F-CHF の 3 化合物を測定した。いずれもトータルイオンクロマトグラム上で 3 化合物の各ピークが明確に分離した (図6, 7)。これらについても、それぞれ保持時間の短い順から、*m*-フルオロ体, *p*-フルオロ体, *o*-フルオロ体となった。また、同様にフッ素の結合位置によるマスペクトルの明確な差異は見られなかった (図8, 9)。これらの結果から、アニリン環部分が一つフッ素置換されたフェンタニル化合物のフッ素結合位置の異なる位置異性体は、

マスペクトルによる識別は困難であり、保持時間の違いによってのみ識別可能であることが分かった。

フェンタニル化合物を GC-MS で測定した時、多くの場合、分子イオンはほとんど観測されず、ピペリジン環に結合する *N*-アルキル鎖部分の α 炭素と β 炭素の間で開裂することが知られている⁹⁾。本研究においても、F-2-FF では、分子イオンは観測されず、*N*-アルキル鎖部分の α 炭素と β 炭素の間で開裂した m/z 301 のフラグメントイオンが比較的高い強度で観測された。続いて、ピペリジン環部分での開裂により、シクロペンチル基を持つ m/z 258 が観測された。さらに、アミド結合部分の C-N 結合が開裂した m/z 95 のフラグメントイオンは、 m/z 301 と同程度の強度で観測された(図4)。一方、F-CPF 及び F-CHF では、同様に分子イオンは観測されず、*N*-アルキル鎖部分の α 炭素と β 炭素の間で開裂した m/z 303, 317 のフラグメントイオンが比較的高い強度であったが、アミド結合部分の C-N 結合が開裂した m/z 97, 111 のフラグメントイオンの強度は比較的低かった。代わりに m/z 69, 83 が比較的高い強度で観測された(図8, 9)。

これらの結果から、アミド結合部分の置換基が芳香族である F-2-FF と飽和炭化水素である F-CPF 及び F-CHF 間で、マスペクトルの開裂パターンが異なることが分かった。いずれの化合物も電子イオン化法により、カルボニル基の酸素上の非共有電子対が電子1個を失って、ラジカルカチオンが生成される(図10)。次いで、ラジカルカチオンが、アミド結合部分の C-N 結合で開裂することによりアシリウムイオンが生成されると考えられる。F-2-FF の場合は、C-N 結合の開裂により、芳香族である2-フラニル基が結合したアシリウムイオンとなるため、アシリウムイオンが共鳴安定化する。このため、一酸化炭素の脱離によるフラニルカチオンは生成しにくく、 m/z 95 のフラグメントイオンが比較的高い強度で観測されたと考えられる。それに対して、F-CPF 及び F-CHF の場合は、C-N 結合の開裂により、飽和炭化水素鎖であるシクロペンチル基及びシクロヘキシル基が結合したアシリウムイオンとなり、置換基に芳香性をもつ2-フラニル基の場合と比較して共鳴安定化しにくい。これらのアシリウムイオンは、より安定なカチオンとなるため、一酸化炭素を脱離して、 m/z 69 のシクロペンチルカチオン及び m/z 83 のシクロヘキシルカチオンをそれぞれ生成したと考えられる。

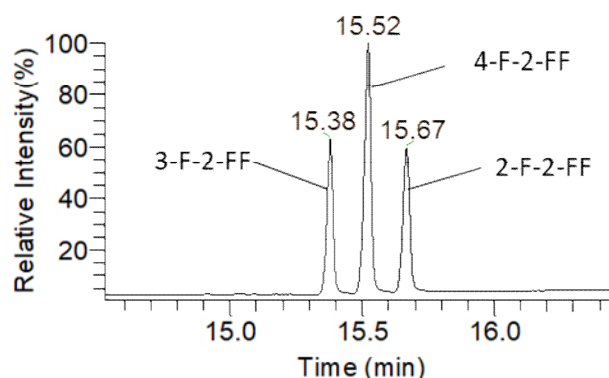


図3 GC-MS による F-2-FF のトータルイオンクロマトグラム

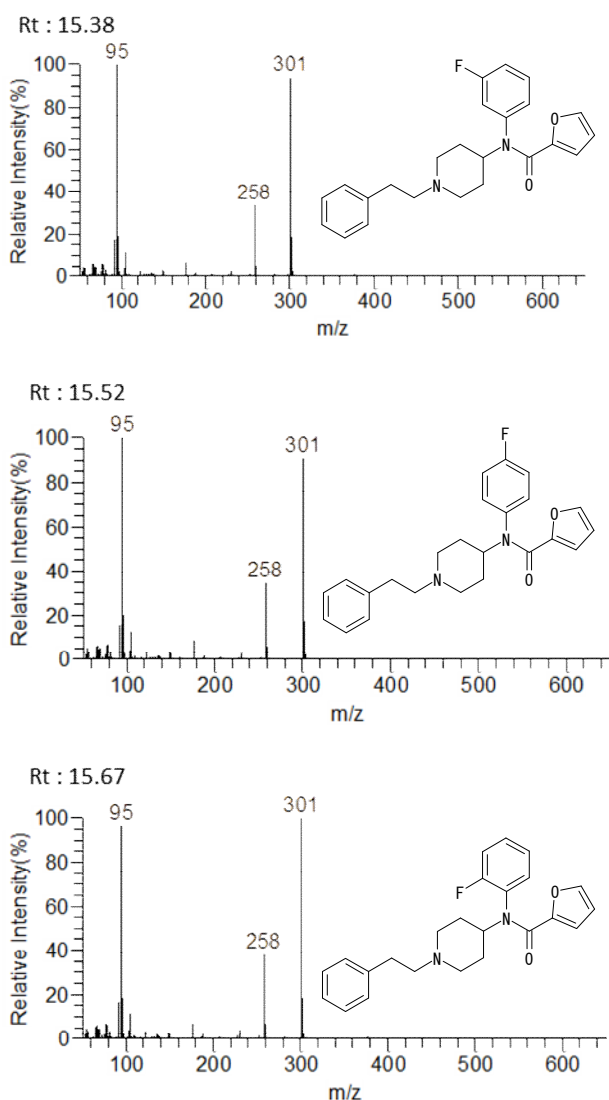


図4 GC-MS による F-2-FF の各ピークのマスペクトル

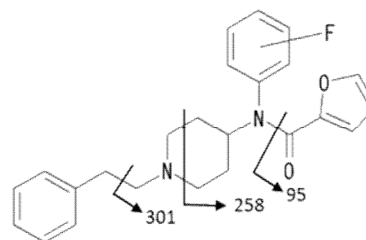


図5 GC-MS による F-2-FF の推定される開裂

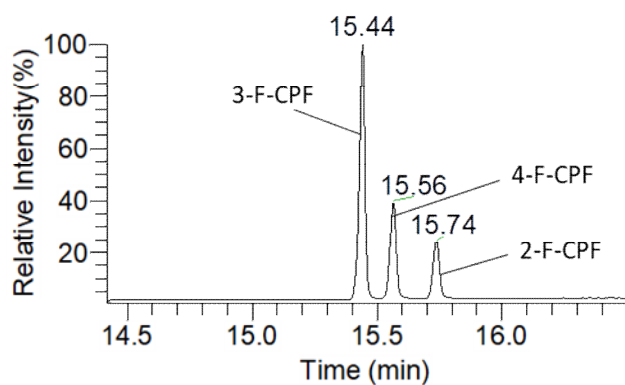


図6 GC-MSによるF-CPFのトータルイオンクロマトグラム

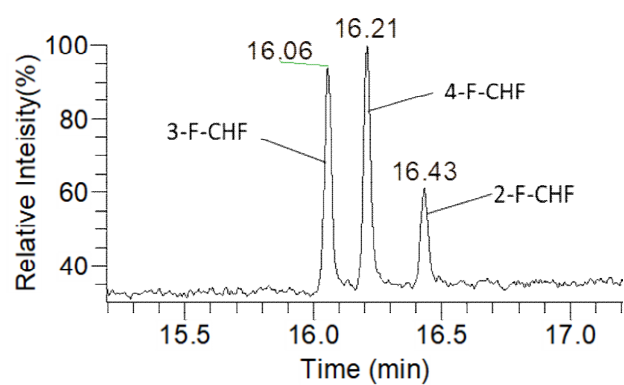


図7 GC-MSによるF-CHFのトータルイオンクロマトグラム

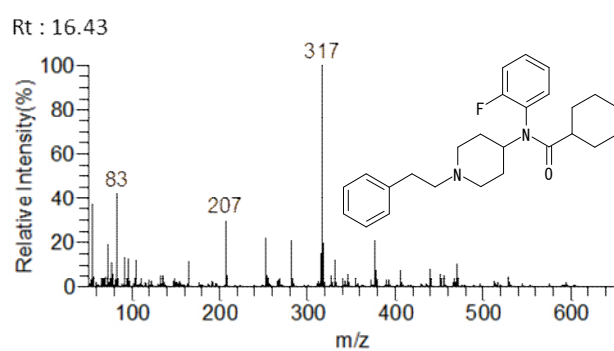
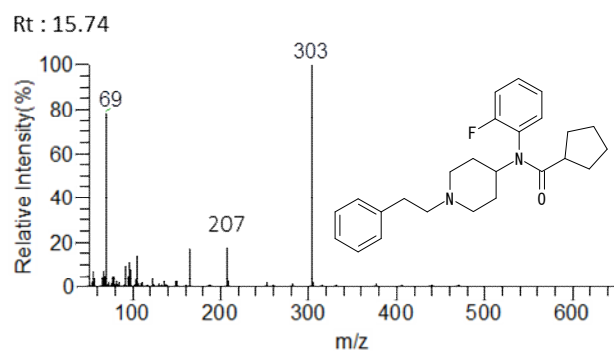
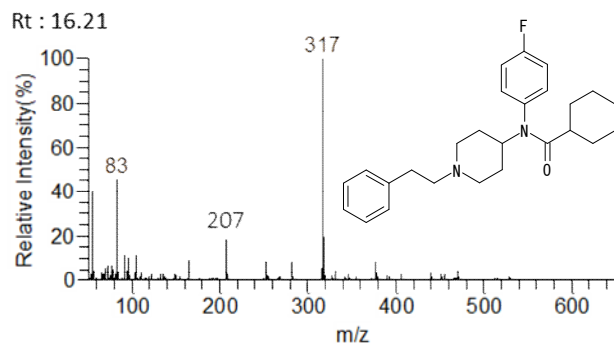
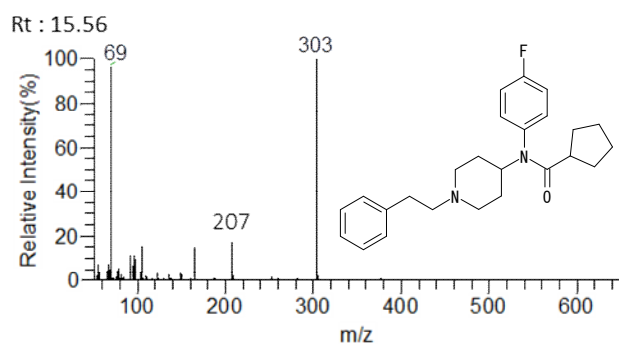
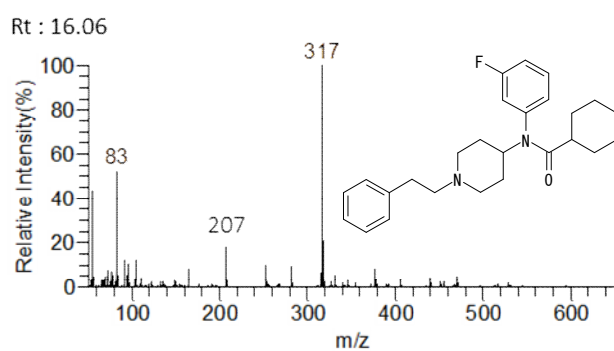
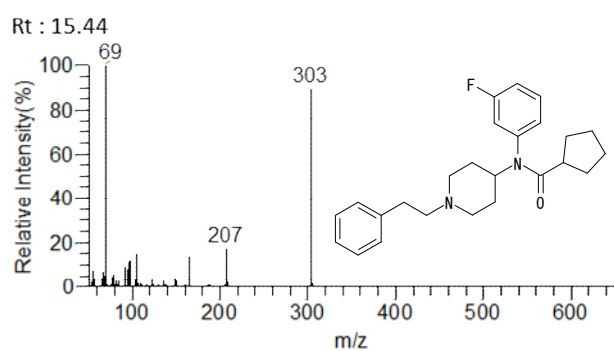


図8 GC-MSによるF-CPFの各ピークのマスペクトル

図9 GC-MSによるF-CHFの各ピークのマスペクトル

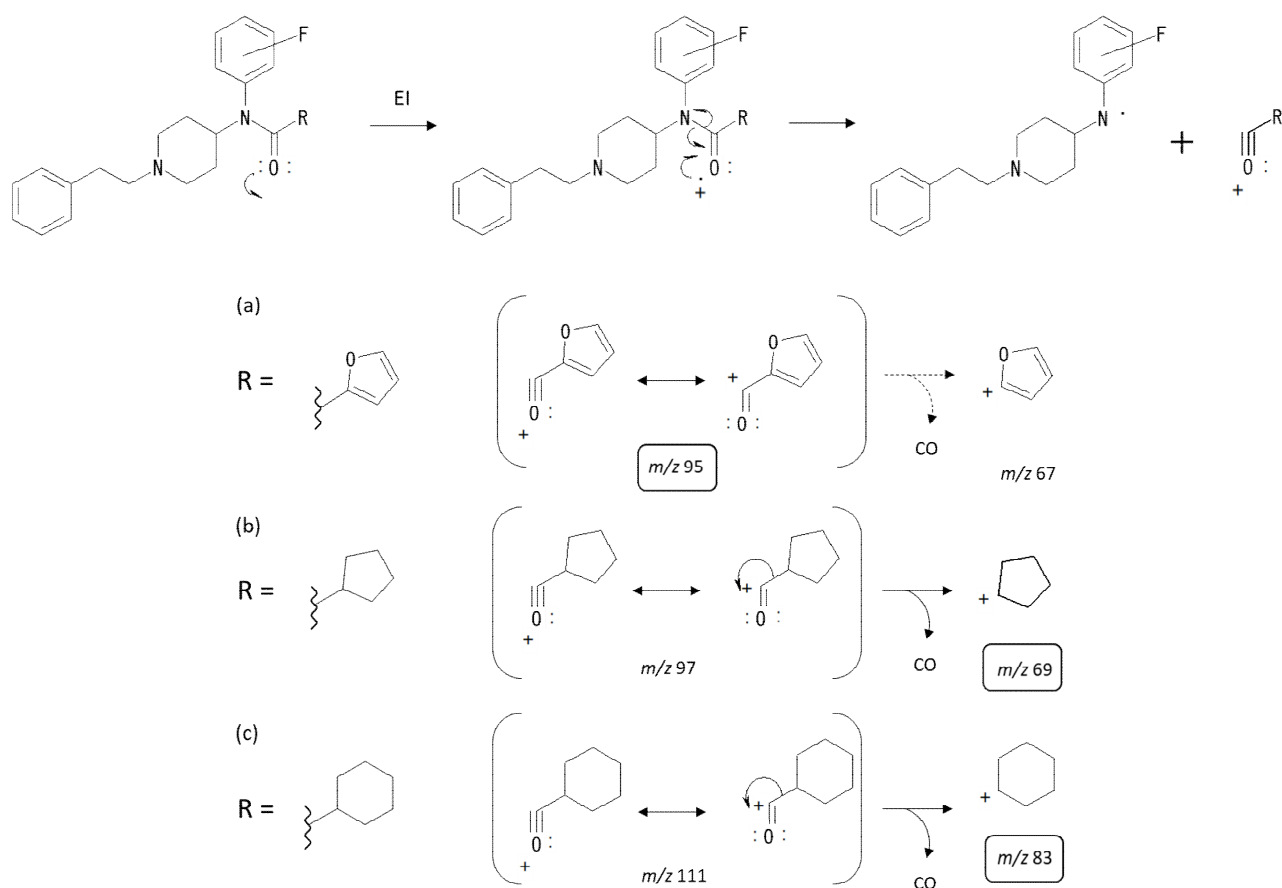


図10 GC-MSによる (a)F-2-FF, (b)F-CPF 及び (c)F-CHF の推定される開裂

3.2 LC-MS/MS による識別

GC-MS ではマスペクトルによる識別が困難であったことから、LC-MS/MS による識別ができないかを検討するため、合成した 9 化合物のうち、2-F-2-FF、3-F-2-FF 及び 4-F-2-FF の 3 化合物について LC-MS/MS による測定を行った。LC でのこれら 3 化合物の混合溶液の測定では、3-F-2-FF 及び 4-F-2-FF のピークは重なり、2-F-2-FF のピークと 3-F-2-FF 及び 4-F-2-FF のピークの分離度は 1.1 であった。カラム、流速、グラジエント条件の検討を行ったが、各ピークの完全分離には至らなかった。そこで、プロダクトイオンスペクトル測定においてプロトン化分子 $[M+H]^+$ (m/z 393, $C_{24}H_{26}FN_2O_2^+$) をプリカーサーイオンとし、コリジョンエネルギー (CE) を 5–90 eV の範囲において 5 eV ごとに変化させ、プロダクトイオンスペクトルを測定し、異性体識別を試みた。2-F-2-FF、3-F-2-FF 及び 4-F-2-FF のプロダクトイオンスペクトルの一部を図 11 に示す。いずれの化合物も主なプロダクトイオンとして、 m/z 188, 105, 77 を与えたのは、図 12 のとおり開裂した結果であると推定される。

CE を変化させても、これらの 3 化合物間の比較においてプロダクトイオンスペクトルの著しい差は見られなかった。これは、フッ素が結合したアニリン環を含まない部分でイオン化していることから、フッ素の結合位置の違いに起因した差異が見られないためと考えられた。よって、LC-MS/MS を用いて、プロダクトイオンスペクトルにより、これらの異性体を識別するのは困難であると考えられた。

4 まとめ

アニリン環部分が一フッ素置換されたフェンタニル化合物を 9 化合物合成し、フッ素結合位置の異なる位置異性体識別を試みた。GC-MS による識別では、トータルイオンクロマトグラム上の各ピークの保持時間による識別が可能であったが、マスペクトルでの識別は不可能であった。マスペクトルでは、アミド結合部の置換基の違いにより開裂パターンが異なることが分かった。また、LC-MS/MS による識別では、F-2-FF の 3 化合物間で保持時間が近接し、プロダクトイオンスペクトルが酷似することから識別不能であった。

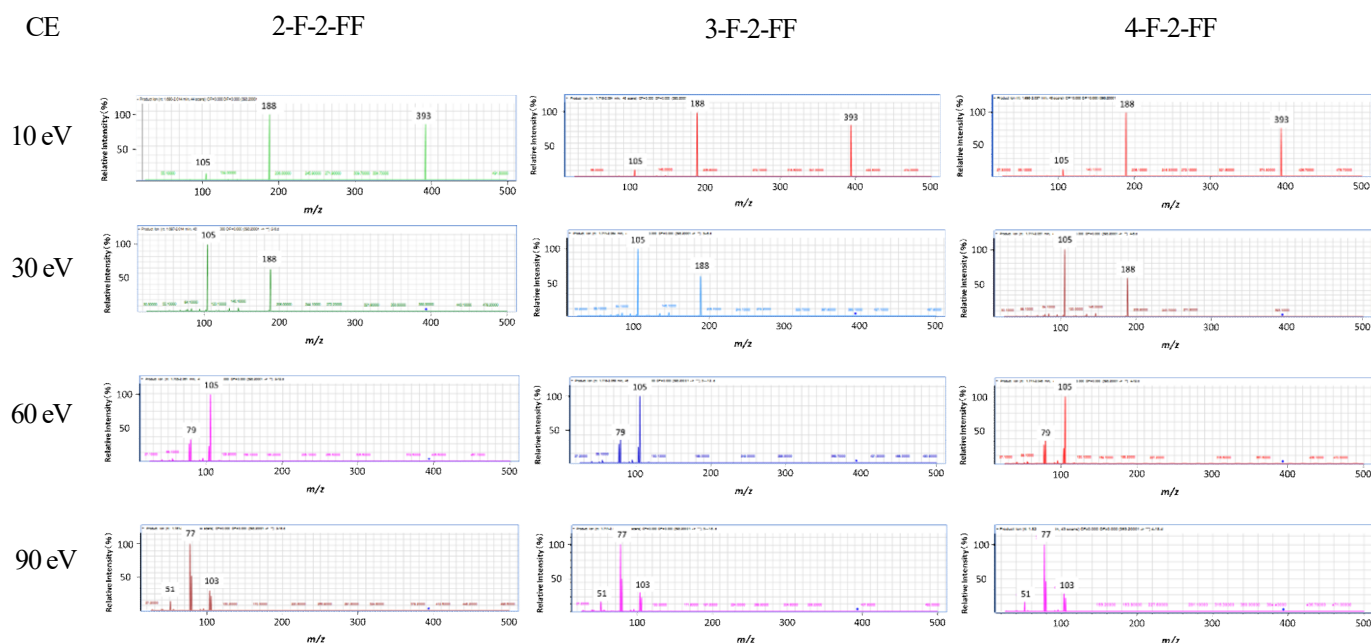


図11 LC-MS/MSによるF-2-FFのプロダクトイオンスペクトル (プリカーサーイオン m/z 393, CE : 10, 30, 60, 90 eV)

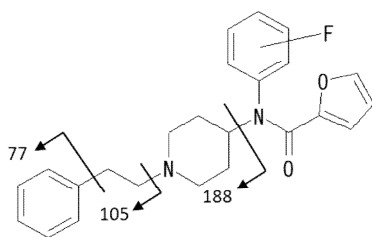


図12 LC-MS/MSによるF-2-FFの推定される開裂

GC や LC に検出器として質量分析計を用いた測定は、高感度で多くの情報が得られるため幅広い分野で普及している。危険ドラッグの検査においても、これらは汎用機器として規制薬物の同定に広く用いられるが、本研究のように位置異性体間でマススペクトルが酷似し、識別が難しい場合があることに留意しなければならない。化学構造上、規制薬物に異性体構造が考えられないか、また、同定した化合物が規制薬物の異性体ではなく、正しく同定されているかを精査する必要がある。

規制薬物を正しく同定するためには、異性体を含めた標準品の整備が重要である。しかし、これらの標準品が市販されているとは限らず、全ての標準品を揃えることは現実的に難しい。我々は、共通の基本骨格を持つ前駆体化合物の異性体を整備することがその打開策になりうると考えた。そして本研究では、フェンタニル誘導体をモデル化合物として不測の化合物が新たに出現した際、柔軟かつ迅速な対応が可能であること

を示した。本研究で合成したフェンタニル化合物をはじめ、分析対象とする化合物とその異性体を合成することは、新規に出現した化合物を正しく同定するためには有用であると考えられる。

フェンタニルは、がん疼痛に用いられる等、優れた医薬品である一方、過剰摂取により死に至る非常に危険な化合物でもある。今後、フェンタニル類似化合物の更なる流通や規制対象化合物の増加が予想されるなか、衛生研究所等の公的検査機関では規制薬物の確実な同定が求められる。本稿では、一フッ素置換フェンタニル化合物9種を分析対象とし、GC-MS, LC-MS/MSから得られた情報を集約し、異性体識別に資した。得られた分析結果を蓄積し、情報収集や検査技術の維持、向上に努めていくことで、検査を通じて、薬物の濫用による健康被害を未然に防ぎ、保健衛生の向上に寄与したい。

文 献

- 1) Vardanyan RS, Hruby VJ: Fentanyl-related compounds and derivatives: current status and future prospects for pharmaceutical applications, *Future Med Chem*, 6(4), 385-412, 2014.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention: Opioid Data Analysis and Resources, <https://www.cdc.gov/opioids/data/analysis-resources.html>
- 3) Kohyama E, Chikumoto T, Tada H, Kitaichi K, Ito T: Analytical differentiation of quinolinyl- and isoquinolinyl-substituted 1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-

- 3-carboxylates: 5F-PB-22 and its ten isomers, *Forensic Toxicol*, 35, 56–65, 2017.
- 4) Kohyama E, Chikumoto T, Furukawa R, Suenami K, Kawashima H, Tada H, Nagai H, Soda M, Kitaichi K, Ito T: Regioisomeric differentiation of synthetic cannabinoids with an *N*-fluorobenzyl indole core by gas chromatography–tandem mass spectrometry, *Forensic Chem*, 6, 28–35, 2017.
 - 5) Chikumoto T, Furukawa R, Kohyama E, Suenami K, Nagai H, Tada H, Kawashima H, Kadomura N, Soda M, Kitaichi K, Ito T: Liquid chromatography–mass spectrometry studies on the isomeric 1-fluorobenzyl-3-naphthoyl-indoles: FUB-JWH-018 and five isomers, *Forensic Toxicol*, 37, 113–120, 2019.
 - 6) Chikumoto T, Kadomura N, Matsuhisa T, Kawashima H, Kohyama E, Nagai H, Soda M, Kitaichi K, Ito T: Differentiation of FUB-JWH-018 positional isomers by electrospray ionization–triple quadrupole mass spectrometry, *Forensic Chem*, 13, Article 100157, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.forc.2019.100157>
 - 7) Valdez CA, Leif RN, Mayer BP: An efficient, optimized synthesis of fentanyl and related analogs, *PLOS ONE*, 9 (9), e108250, 2014, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108250>
 - 8) 金森達之, 岩田祐子, 辻川健治, 桑山健次, 山室匡史, 瀬川尋貴, 井上博之: TLC, GC/MS および LC/MS によるフェンタニル類 18 化合物の一斉分析, *法科学技術*, 21(2), 139-147, 2016.
 - 9) Pierzynski HG, Neubauer L, Choi C, Franckowski R, Augustin SD, Lula DM: Tips for interpreting GC-MS fragmentation of unknown substituted fentanyls, *Cayman Currents*, 28, 1-10, 2017.

Fundamental Study on Regioisomeric Differentiation for the Identification of Designated Drugs

Takaharu IWAKI, Erina KOHYAMA, Mayuka HAYASHI, Miku MORIKAWA*, Kohsuke ITO*, Kohsei IWAI*, Midori SODA*, Kiyoyuki KITAICHI*, Tetsuro ITO**, Hiroyuki TANAKA*, Hidenori SHIMIZU

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:

1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan

**Gifu Pharmaceutical University: 1-25-4 Daigaku-nishi, Gifu, Gifu 501-1196, Japan*

***Gifu University of Medical Science: 4-3-3, Nijigaoka, Kani, Gifu, 509-0293, Japan*