

活性成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC; $K_i = 41 \pm 2$ nM, Fig. 1) の約 4.5 倍高いことを報告している¹⁾。

カンナビノイド受容体 (CB₁, CB₂) および内因性カンナビノイドの相次ぐ発見と、その役割の解明が進むにつれて、1990 年代以降、様々な疾病に対する薬理作用を期待して、現在までに多くのカンナビノイドアナログが合成され、その薬理作用が報告されている⁵⁻⁶⁾。また、それらアナログの中には、化合物 2 の様に、本来のカンナビノイドと全く異なる構造であってもカンナビノイド様の活性を有する化合物も多数見いだされている。従って、今後も化合物 1, 2 以外のカンナビノイドアナログが新たな違法ドラッグ成分として流通する可能性が危惧される。

D. 結論

本研究において、同一植物系違法ドラッグ製品中に新規違法ドラッグ成分として 2 種類の化合物を同定した。一つは、先に報告した

(1*R,S*,3*SR*)-3-[4-(1,1-dimethyloctyl)-2-hydroxyphenyl]cyclohexan-1-ol (1) であり、もう一つはインドール誘導体：

1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole (別名: JWH-018, 2) であった。化合物 2 は強力なカンナビノイド様の薬理作用を示すことが報告されており、今後化合物 1 と共に違法ドラッグ市場での流通拡大が懸念される。上記結果はまた、既知および新規違法ドラッグを判断する際の科学的データのの一つとして有用であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) Wiley JL, Compton DR, Dai D, Lainton JA, Phillips M, Huffman JW, Martin BR, *J Pharmacol Exp Ther*, 285, 995-1004 (1998).
- 2) Huffman JW, *Curr Med Chem* 6, 705-720 (1999).
- 3) Aung MM, Griffin G, Huffman JW, Wu M, Keel C, Yang B, Showalter VM, Abood ME, Martin BR, *Drug Alcohol Depend*, 60, 133-140 (2000).
- 4) Huffman JW, Mabon R, Wu MJ, Lu J, Hart R, Hurst DP, Reggio PH, Wiley JL, Martin BR, *Bioorg Med Chem*, 11, 539-549 (2003).
- 5) Pacher P, Batkai S, Kunos G, *Pharmacol. Rev.*, 58, 389-462 (2006) .
- 6) Kulkarni SK, Ninan I, *Indian J. Pharmacol.*, 33, 170-184 (2001) .

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) Uchiyama, N.; Kikura-Hanajiri, R.; Kawahara, N.; Haishima, Y.; Goda, Y. Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product. *Chem. Pharm. Bull.* 2009, in press.
- 2) Uchiyama, N.; Kikura-Hanajiri, R.; Kawahara, N.; Goda, Y. Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product. *Forensic Toxicol.* 2009, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

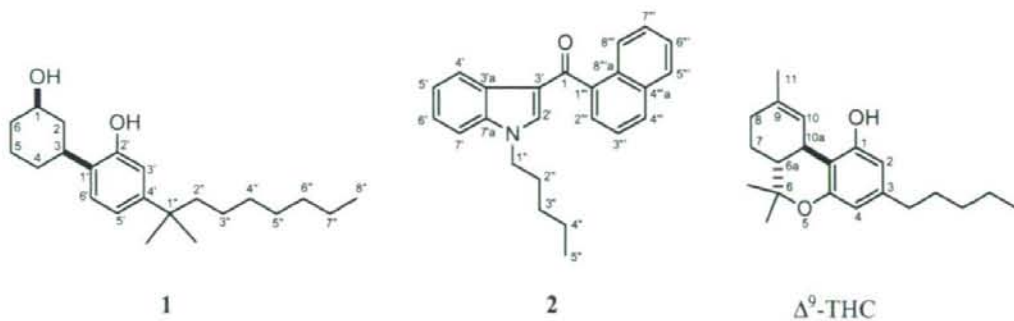


Fig. 1 Structures of detected compounds **1**, **2** and related compounds.

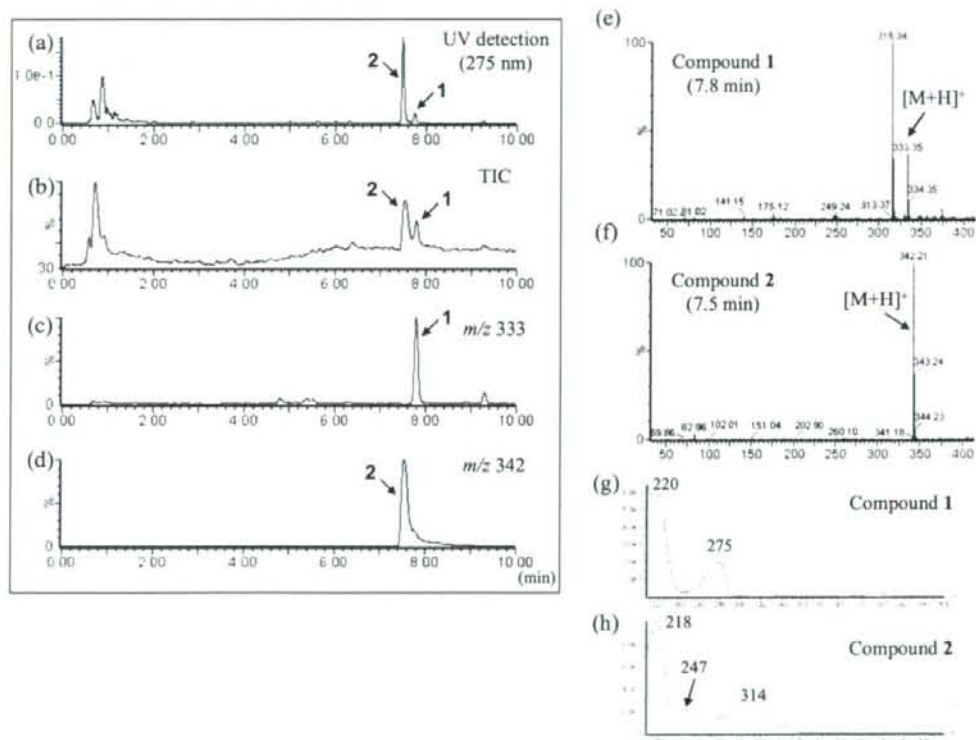


Fig. 2 HPLC-UV (a) and –MS chromatograms of the extract of the sample. Total ion chromatogram (b), mass chromatograms of the peaks at 7.8 min (**1**) (c) and 7.5 min (**2**) (d). ESI mass spectra and UV spectra of the detected peaks of 7.8 min (**1**) (e and g) and 7.5 min (**2**) (f and h).

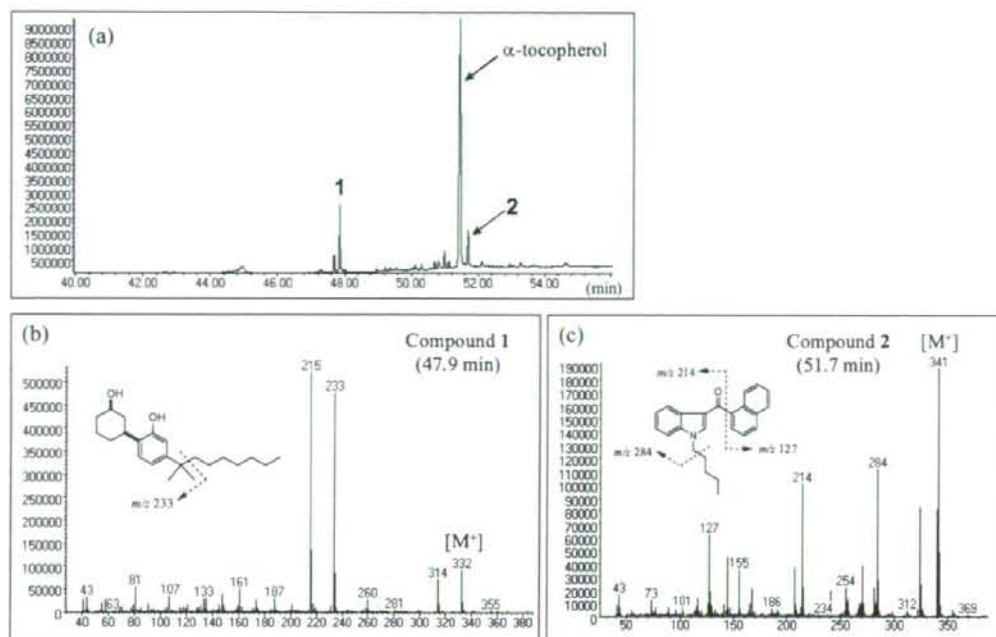


Fig. 3 GC-MS chromatogram of the extract of the sample (a) and EI mass spectra of the detected peaks of 47.9 min (I) (b) and 51.7 min (2) (c).

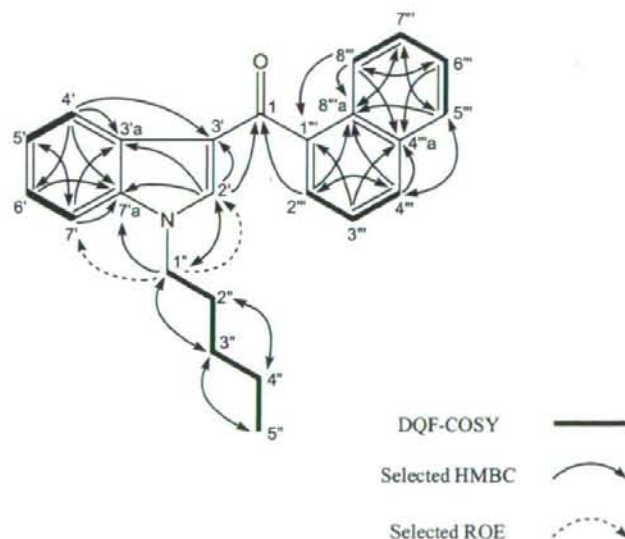


Fig. 4 Selected DQF-COSY, HMBC, and ROE correlations of Compound 2.

Table 1 NMR Data of Compound **2** in CDCl₃^a

No.	¹³ C	¹ H	HMBC ^b
1	192.0	–	–
2'	137.9	7.33, 1H, s, overlapped	1, 3', 3'a, 7'a, 1''
3'	117.5	–	–
3'a	127.0	–	–
4'	122.9	8.47, 1H, m	3', 3'a, 6', 7'a
5'	122.8	7.35, 1H, m, overlapped	7'
6'	123.6	7.35, 1H, m, overlapped	7'a
7'	110.0	7.38, 1H, m, overlapped	3'a, 5', 7'a
7'a	137.0	–	–
1''	47.2	4.05, 2H, t, <i>J</i> =7.4 Hz	2', 7'a, 2'', 3''
2''	29.5	1.79, 2H, quint, <i>J</i> =7.4 Hz	1'', 3'', 4''
3''	28.9	1.24, 2H, m, overlapped	1'', 4'', 5''
4''	22.2	1.28, 2H, m, overlapped	2'', 3'', 5''
5''	13.8	0.83, 3H, t, <i>J</i> =7.0 Hz	3'', 4''
1'''	139.1	–	–
2'''	125.8	7.64, 1H, dd, <i>J</i> =7.1, 1.3 Hz	1, 3''', 4''', 8'''a
3'''	124.5	7.51, 1H, dd, <i>J</i> =8.3, 7.1 Hz, overlapped	1''', 2''', 4'''a
4'''	129.9	7.95, 1H, brd, <i>J</i> =8.3 Hz	2''', 4'''a, 5''', 8'''a
4'''a	133.7	–	–
5'''	128.1	7.90, 1H, brd, <i>J</i> =8.3 Hz	4''', 7''', 8'''a
6'''	126.3	7.50, 1H, td, <i>J</i> =6.9, 1.4 Hz, overlapped	4'''a, 7''', 8'''
7'''	126.7	7.45, 1H, ddd, <i>J</i> =8.3, 6.9, 1.4 Hz	5''', 8'''a
8'''	126.0	8.17, 1H, brd, <i>J</i> =8.3 Hz	1''', 4'''a, 6''', 8'''a
8'''a	130.8	–	–

^a Recorded in CDCl₃ at 600 and 800 MHz (¹H) and 150 and 200 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz). ^b *J*=8 Hz, the proton signal correlated with the indicated carbons.

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：違法ドラッグ製品の分析法の開発，成分分析，分析標準品の調製
研究分担者：花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

—1-(4-Fluorophenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (*N*-Me-4-FMP) 塩酸塩標準品の合成—

研究協力者：内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

研究協力者：福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

研究要旨：蔓延する違法ドラッグに対応するため薬事法が改正され，興奮等の作用を有する蓋然性が高く，保健衛生上の危害が発生する恐れがある薬物や植物が指定薬物として指定・規制されることになった。標準品として使用する目的で，平成21年1月から指定薬物として規制された 1-(4-fluorophenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (*N*-Me-4-FMP) 塩酸塩の合成を行い，その構造確認および品質試験を行った。

A. 研究目的

標準品として使用する目的で，指定薬物の一つである，
1-(4-fluorophenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (*N*-Me-4-FMP) 塩酸塩の合成を行い，その構造確認および品質（純度）試験を行う。

B. 研究方法

1. 合成法

Scheme 1 に従い合成を行った。

2. 構造確認

N-Me-4-FMP 塩酸塩の構造確認は，核磁気共鳴スペクトル（NMR），質量スペクトル（MS），紫外線吸収スペクトル（UV），赤外線吸収スペクトル（IR），融点（mp）により行った。

3. 品質試験

品質（純度）確認は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）および薄層クロマトグラフィー（TLC）により行った。

【装置】

NMR：JEOL 製 ECA-600

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）：

[GC] Agilent 6890 / [MS] Agilent 5975

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）：

[LC] AQUITY UPLC / [MS] SQD (Waters)

純度測定用液体クロマトグラフ（HPLC）：

[LC] Shimadzu 10A VP / [PDA] Shimadzu

SPD-M10A

IR：JASCO FT/IR-6300

融点測定：柳本製作所製 微量融点測定器

TLC：TLC プレート：HPTLC plates Silica gel

60F₂₅₄ (20×10 cm, 層厚 0.2 mm Merck 製)

C. 研究結果・考察

1. 合成法

本合成により，*N*-Me-4-FMP 塩酸塩（白色結晶（7.4 g）を得た。

2. 構造確認

【NMR】各種 NMR (¹H, ¹³C, HMBC, HMQC,

DQF-COSY) を測定し、構造の同定を行った (Table 1).

【NMR 装置】 JEOL 製 ECA-600

【測定核種】 ^1H , ^{13}C

【測定溶媒】 CD_3OD

【GC-MS】カラム: HP-1MS (0.25 mm i.d. x 30 m, 0.25 μm , Agilent), 注入口温度: 200 $^\circ\text{C}$, カラム温度: 80 $^\circ\text{C}$ (1 min hold) -5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ -190 $^\circ\text{C}$ (15 min hold) -10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ -310 $^\circ\text{C}$ (5 min hold), 検出器温度: 280 $^\circ\text{C}$, キャリアーガス: ヘリウム (0.7 mL/min), イオン化: EI, 注入量: 1 μL (約 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ メタノール溶液)

上記の条件で測定を行い, 以下のマススペクトルが得られた (Fig. 1).

N-Me-4-FMP: m/z 152 [$\text{M}-15$] $^+$, 109, 83, 58

【LC-MS】 UPLC 条件

カラム: Atlantis HSS T3 (2.1 \times 100 mm, 1.8 μm , Waters), 移動相 A: 10mM ギ酸アンモニウム緩衝液 pH3, 移動相 B: アセトニトリル, A:B 95:5-80:20 (30 min) -50:50 (40 min, 5 min hold), 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40 $^\circ\text{C}$, 注入量: 5 μL , 検出: ダイオードアレイ検出器 (モニタリング波長 210, 254 nm) 及び質量検出器 質量分析条件

イオン化: ESI 法, ポジティブモード, Cone 電圧: 30V, 乾燥ガス流量: N_2 650 L/hr, 乾燥ガス温度: 350 $^\circ\text{C}$, Capillary 電圧: 3000V

上記の条件で測定を行い, 以下のマススペクトルが得られた (Fig. 2C). *N*-Me-4-FMP: m/z 168 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 【UV】 λ_{max} : 198, 214, 264 nm, λ_{min} : 210, 228 nm (Fig. 2B)

【IR】本品について, KCl 錠剤法により IR スペクトルを測定した (Fig. 3).

【mp】 160-161 $^\circ\text{C}$

品質 (純度) 試験

【TLC】TLC プレート: HPTLC plates Silica gel 60F₂₅₄ (20 \times 10 cm, 層厚 0.2mm Merck 製) 展開溶媒 A: *n*-ヘキサン/アセトン/トリエチ

ルアミン=10/10/1

展開溶媒 B: メタノール/25% アンモニア水 =200/3

検出方法: 紫外線照射 (波長 254 nm), およびヨウ化白金酸カリウム試液噴霧による呈色. 本品のメタノール溶液を用いて TLC を行った. この条件下, *N*-Me-4-FMP は単一のスポットを示し, R_f 値: 0.13 (展開溶媒 A), 0.28 (展開溶媒 B). 呈色: 白抜き (赤茶色, 展開溶媒 A), 淡紫色 (展開溶媒 B)

【純度測定用 HPLC】カラム: ODS-3 (4.6 i.d. \times 150 mm, 5 μm , GL Science), 移動相: 10mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH3) /アセトニトリル 92/8, 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40 $^\circ\text{C}$, 注入量: 5 μL , 検出: ダイオードアレイ検出器 (モニタリング波長 210, 254 nm)

N-Me-4-FMP の保持時間の約 3 倍の分析時間を面積測定範囲として面積百分率法により純度を求めたところ, 100.0 %であった (Fig. 2A).

D. 結論

指定薬物である *N*-Me-4-FMP 塩酸塩の分析用標準品を大量合成し, 構造確認および品質 (純度) 試験を行った.

E. 参考文献

特になし.

F. 健康危険情報

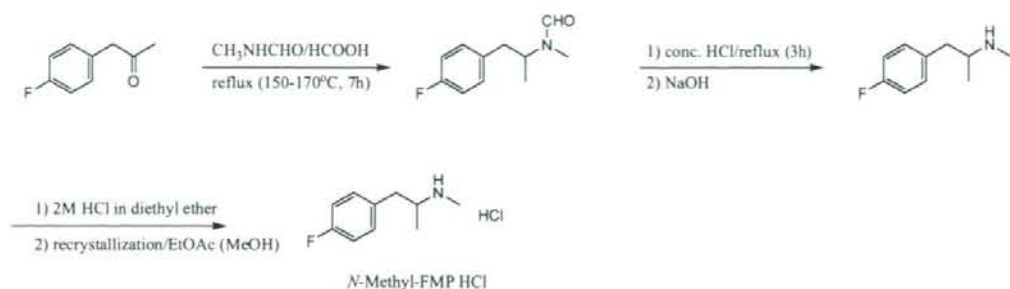
特になし.

G. 研究発表

特になし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.



Scheme 1. Synthesis of *N*-Methyl-4-FMP·HCl

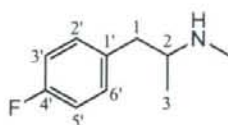


Table 1. NMR Data of *N*-Methyl-4-FMP·HCl

No.	<i>N</i> -Methyl-4-FMP·HCl in CD ₃ OD ^a		
	¹³ C	¹ H	HMBC ^b
1	39.3	3.12, 1H, dd, <i>J</i> =13.6, 5.2 Hz	2, 3, 2'/6'
		2.74, 1H, dd, <i>J</i> =13.6, 9.3 Hz	2, 3, 2'/6'
2	57.7	3.44, 1H, m	1, 3
3	15.7	1.21, 3H, d, <i>J</i> =6.5 Hz	1, 2
1'	133.1	–	–
2'	132.3	7.28 or 7.29, 1H, d, <i>J</i> =8.6 Hz	1, 3'/5', 4'
3'	116.7	7.08 or 7.10, 1H, d, <i>J</i> =8.6 Hz	1', 4'
4'	163.8	–	–
5'	116.7	7.08 or 7.10, 1H, d, <i>J</i> =8.6 Hz	1', 4'
6'	132.3	7.28 or 7.29, 1H, d, <i>J</i> =8.6 Hz	1, 3'/5', 4'
<i>N</i> -Me	30.9	2.72, 3H, s	2

^a Recorded at 600 MHz (¹H) and 150 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz). ^b *J*=8 Hz, The proton signal correlated with the indicated carbons.

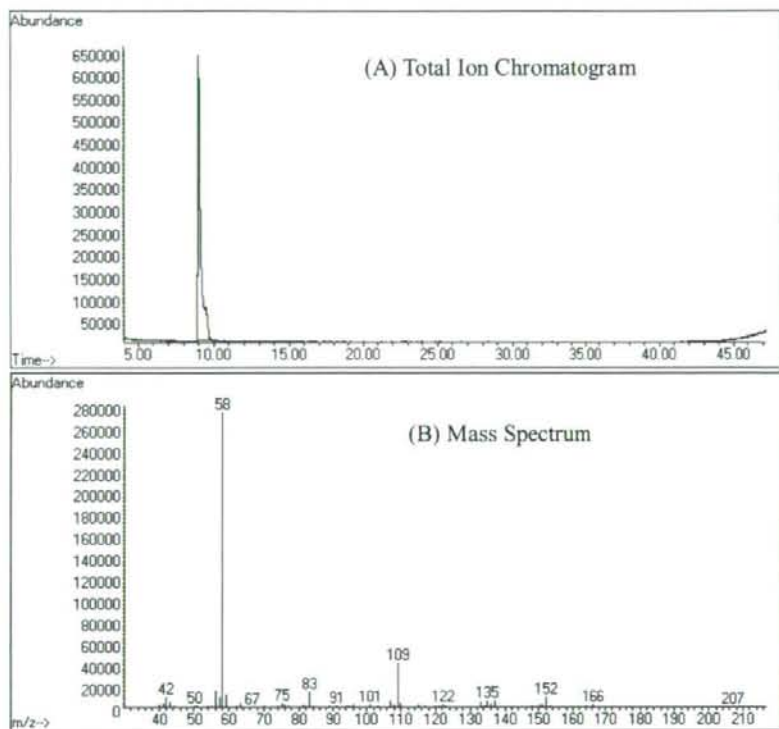


Fig. 1 GC-MS spectrum of *N*-Methyl-4-FMP·HCl.

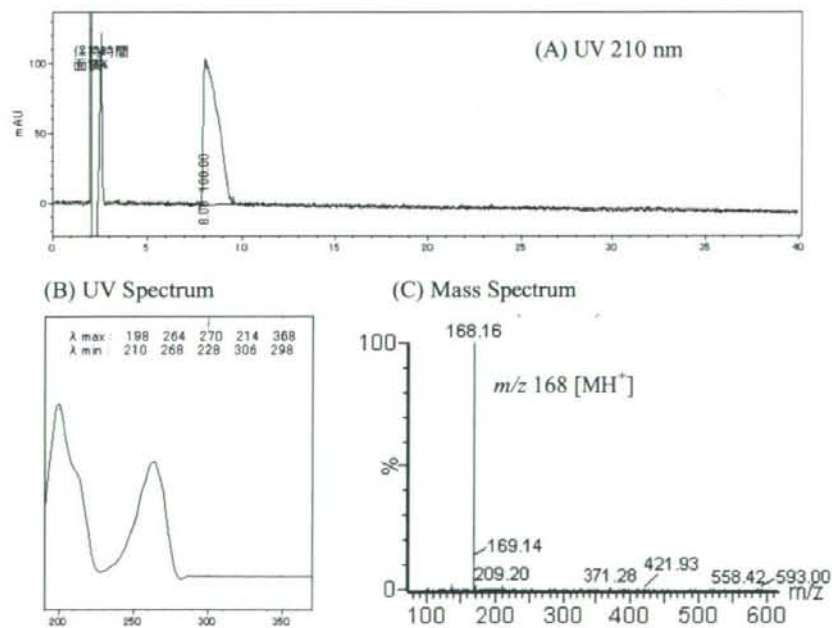


Fig. 2 LC-MS spectrum of *N*-Methyl-4-FMP·HCl.

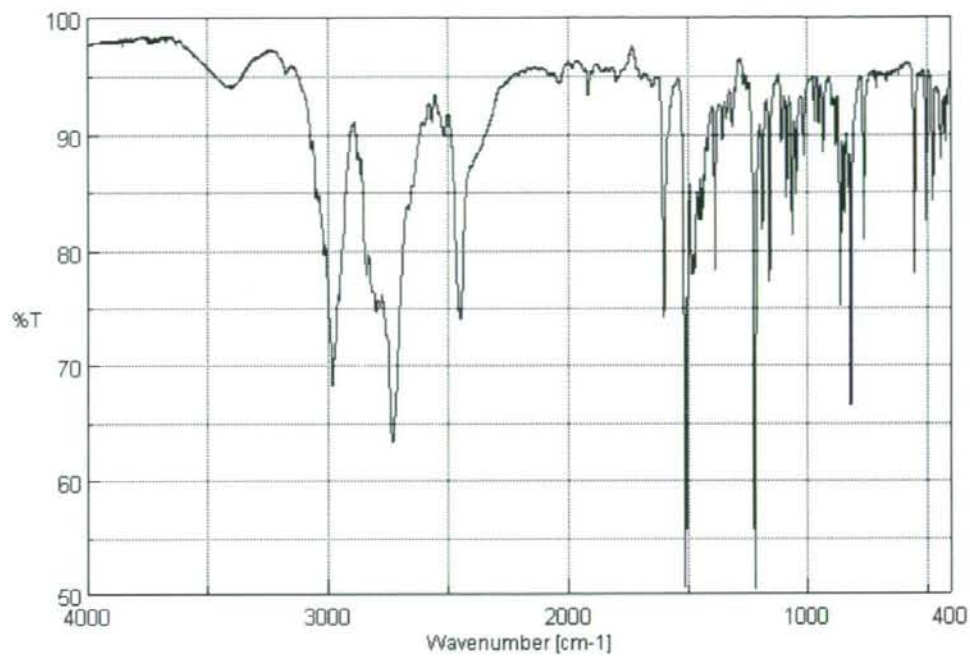


Fig.3 IR spectrum of *N*-Methyl-4-FMP-HCl.

分担研究課題：違法ドラッグ製品の分析法の開発，成分分析，分析標準品の調製
研究分担者：花尻（木倉）瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

－違法ドラッグ成分の aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay による
GPCRs 活性評価－

研究要旨：違法ドラッグは、向精神活性を期待・標榜して市場が形成されるが、実際の薬理活性については不明な点が多く、規制のための隘路となっている。本研究では、違法ドラッグ市場において流通が認められているものの、薬理学的報告が少ない 3 種類の指定薬物候補化合物 5-MeO-EIPT, DOC 及び ALEPH-2 について、G タンパク質結合受容体 (G protein coupled receptors, GPCRs) と Ca^{2+} 感受性発光蛋白エクオリンを安定に共発現する組換え細胞を用いた Aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay を行い、GPCRs (5HT2a) 活性を検討した。検討の結果、これら 3 化合物に強いセロトニンアゴニスト活性が認められ、DOC, ALEPH-2 については、コントロール化合物セロトニン以上の活性を示し、指定薬物指定が妥当と考えられた。

委託研究先
大塚製薬診断事業部
EcoScreen 開発室
飯田 満
蔽下 尚智

A. 研究目的

「指定薬物」指定には、中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚の作用を有する蓋然性が高いことが必要とされている。しかし、次々と新規製品が市場に登場する違法ドラッグに関しては、国内外を問わず、科学的な研究報告は少なく、人体に対する影響は乱用者が述べたインターネット上の記述や、化学構造等をもとに類推せざるを得ない場合が多い。従って、規制の拠り所をどのように求めるかが問題となっており、そのための迅速かつ的確な活性評価法が求められている。

我々は昨年の当研究班の報告書¹⁾において、多くの違法ドラッグの活性発現に関与すると考えられている G タンパク質結合受容体 (G-Protein coupled receptors, GPCRs) とカルシウムイオンと反応して発光 (470 nm) する性質を有するタンパク質 aequorin を安定に共発現する組換え細胞系を用い、様々な違法ドラッグ成分の GPCRs (5HT2a, D2RS, μ OPRS, κ OPRS, CB1) を介した活性について、網羅的に迅速に評価する方法を示した(図1)。今年度は、本アッセイ手法を用いて、違法ドラッグ市場において流通が認められているものの、薬理学的報告が少ない図2に示した3種類の指定薬物候補化合物
N-ethyl-*N*-isopropyl-5-methoxytryptamine (5-MeO-EIPT), 1-(4-chloro-2,5-dimethoxyphenyl)propan-2-amine (DOC) 及び 1-(4-ethylsulfanyl-2,5-dimethoxyphenyl)propan-2-amine

(ALEPH-2) について GPCRs 活性を検討した。

なお、5-MeO-EIPT は、平成 17 年 4 月に麻薬として規制された *N,N*-diisopropyl-5-methoxytryptamine (5-MeO-DIPT, FOXY) の、DOC は平成 20 年 1 月に指定薬物として規制された 1-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)propan-2-amine (DOI) の、また ALEPH-2 は平成 20 年 1 月に麻薬として規制された 2-(4-Ethylsulfanyl-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine (2C-T-2) の構造類似化合物である。これら化合物を代表とするトリプタミン系及び 2,5-ジメトキシフェネチルアミン系幻覚薬については、昨年度の当研究班の研究において、主な標的分子がセロトニンレセプターであり、強いアゴニスト活性を示すことを報告している¹⁾。そこで、5-MeO-EIPT, DOC 及び ALEPH-2 においても、セロトニン (5HT_{2a}) アゴニスト活性を中心に検討を行った。

B. 研究方法

1. 測定対象化合物

本研究で検討を行った 3 化合物の名称、略称及び構造を図 2 に記載した。

2. GPCRs を介した活性評価

活性評価は昨年度の報告書に記載した手法¹⁾により行った。

CHO-K1 細胞に、5HT_{2a} レセプター及び Aequorin の発現ベクターをトランスフェクションし、安定発現細胞株を作成した。細胞の濃度が約 1×10^5 個/mL となるように調整した細胞懸濁液に、最終濃度 2 μ M となるように VivirenTM (Aequorin の基質) を添加して、3 時間以上室温で攪拌培養したものを実験に供した。

サンプル調製は、フェノールレッドフリー D-MEM/F12 で各化合物 (10 mM 水溶液) を 100 倍希釈し、さらに各化合物の 7 段階の 10

倍希釈系列を作成し、サンプルの希釈系列溶液 10 μ L を細胞懸濁液 90 μ L に添加しアゴニスト活性を測定した (最高濃度 10 μ M)。また、ポジティブコントロール物質としてセロトニンの希釈系列を各化合物と同時に測定した。

測定結果は、ポジティブコントロールの最高活性値を 100、ネガティブコントロールの活性値を 0 とした時の相対値で表した。また、ポジティブコントロールに対する反応の 50% 及び 20% の反応に相当する化合物の濃度 (Rec50 及び Rec20) を求めた。

アンタゴニスト活性はアゴニスト活性を測定したプレートにそれぞれアゴニストのポジティブコントロールとして使用したアゴニスト (最終濃度が 2×10^{-6} M) を添加し、その発光強度を測定し評価した。また、アンタゴニストのポジティブコントロール物質としてケタンセリンを各化合物と同時に測定した。スパイクアゴニストによる活性値を 100、ブランクの活性値を 0 とした時の相対値で表した。その後さらに ATP (最終濃度が 3×10^{-4} M) を添加し、その発光強度を測定することによって非特異的な反応を評価した。発光測定は FDSS7000 (浜松ホトニクス) を用い、3 重測定で行った。

C. 研究結果

違法ドラッグ成分 5-MeO-EIPT, DOC 及び ALEPH-2 に焦点をあて、aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay を行い、各化合物の GPCRs (5HT_{2a}) 活性を検討した。表 1 に測定結果を示した。表中、+ は化合物を 10 μ M、++ は 1 μ M、+++ は 100 nM、++++ は 10 nM に希釈しても活性を表すものを示す。また、Rec50 及び Rec20 は、ポジティブコントロールであるセロトニンの最大活性値の 50% もしくは 20% を示す各化合物濃度を、

relative potency は、セロトニンの Rec20 に対する各化合物の Rec20 割合(セロトニン=1.0)を示した。

測定の結果、測定対象とした 3 化合物すべてに強いセロトニンアゴニスト活性が認められた。2,5-ジメトキシフェネチルアミン系幻覚薬である DOC 及び ALEPH-2 は特に強いアゴニスト活性を有し、コントロール化合物として使用したセロトニン以上の活性を示した。一方、これら化合物には、セロトニンアンタゴニスト活性は認められなかった。

D. 結論

違法ドラッグ市場において流通が認められているものの、薬理的報告が少ない 3 種類の指定薬物候補化合物 5-MeO-EIPT, DOC 及び ALEPH-2 について、GPCRs と Ca²⁺感受性発光蛋白エクオリンを安定に共発現する組換え細胞を用いた Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay を行い、GPCRs (5HT2a) 活性を検討した。検討の結果、これら 3 化合物に強いセロトニンアゴニスト活性が認められた。特に、DOC, ALEPH-2 については、コントロール化合物セロトニン以上の活性を示し、指定薬物指定が妥当と考えられた。

これら 3 化合物は、

2-ethylamino-1-phenylpropan-1-one
(ethcathinone), 1-(4-fluorophenyl)-N-methylpropan-2-amine (4-Me-FMP), 1-(3,4-methylenedioxyphehyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (MDPV) と共に、平成 21 年 1 月 16 日に、指定薬物として規制された。

E. 参考文献

1) 厚生労働科学研究費補助金、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 19 年度分担研究報告(花尻瑠理)。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

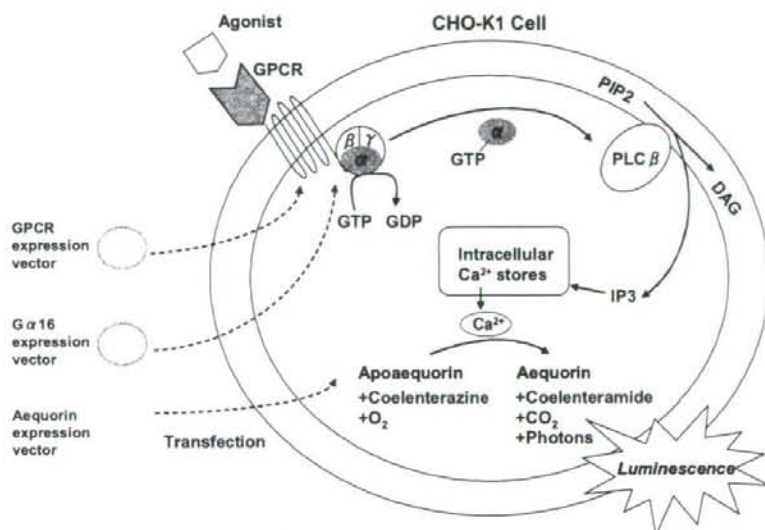


図1 Aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay の原理

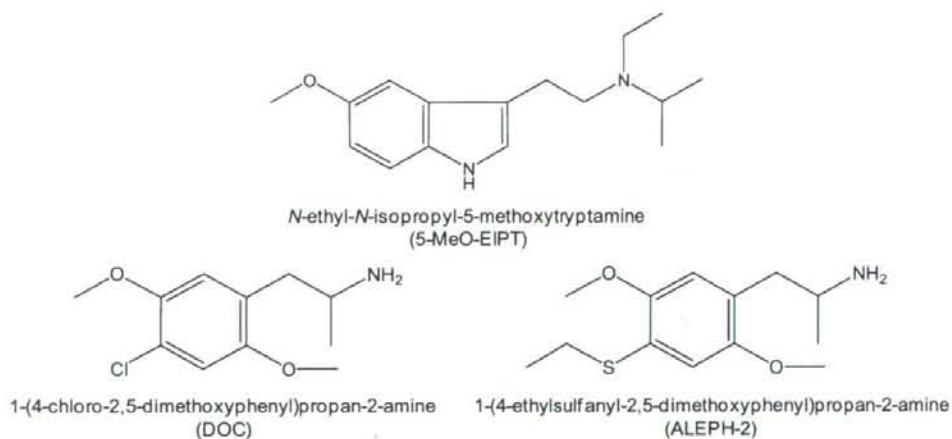


図2 測定に用いた違法ドラッグ成分

表1 対象化合物の Aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay (5HT_{2a})アッセイ測定結果

	5HT _{2a} Agonist ²⁾	REC50 (mM)	REC20 (mM)	Relative Potency ³⁾ (REC20)
Serotonin ¹⁾	++++	3.2E-07	9.1E-08	1.0
5-MeO-EIPT	+++	3.4E-06	3.2E-07	0.3
DOC	+++++	7.0E-07	3.2E-08	2.9
ALEPH-2	+++++	8.0E-07	2.6E-08	3.6

1) Positive control

2) Luminescent reactions were detected at the concentrations of 10 μM (+), 1 μM (++) , 100 nM (+++) and 10 nM (++++) of these compounds.

3) Concentrations at which a target compound shows 20% reactivity of serotonin.

() shows a relative activity ([Rec 20 of target compound]/[Rec 20 of serotonin], serotonin = 1.0).

分担研究課題：違法ドラッグ製品の簡易スクリーニング法の開発
研究分担者：豊岡 利正 静岡県立大学 教授

— HPLC-クーロアレイ検出器(CAD)による指定薬物の高感度一斉分析法の開発 —

研究協力者：関 俊哲 静岡県立大学 助教

研究要旨：蔓延する違法ドラッグ問題に対応するため、厚生労働省では、平成18年の薬事法改正に伴い、指定薬物制度を導入し、平成19年4月にトリプタミン系、フェネチルアミン系の32品目を「指定薬物」とした。本研究ではトリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系など32種類の指定薬物を蛍光標識化せず、簡便迅速、かつ高感度なスクリーニング法の開発を目的としてHPLC-クーロアレイ電気化学検出器(CAD)による高感度一斉分離検出法の開発を行った。移動相にはリン酸カリウム(KH_2PO_4)緩衝液、メタノール、アセトニトリル混合溶液を用い、カラムにはTSK-gel ODS-100V (4.6×250 mm, i.d., 3 μm , TOSOH)を使用し分離検出を行った。その結果、指定薬物31種類を一斉分離検出することができた。また、32種類の指定薬物をトリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系を含むその他、3系統にそれぞれ分類し、系統別に良好な分離を達成することができた。個々の指定薬物の最適な酸化電圧における検出限界は25pg/ml～0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。また、本法を用いて、市場で違法ドラッグとして販売されていた3種類の実試料に適用し、指定薬物を分離検出することができた。

今回開発したHPLC-クーロアレイ検出器(CAD)による指定薬物の高感度一斉分析法は、32種類の指定薬物を蛍光標識化せずダイレクトで、簡便、高感度に一斉分離検出することが可能であるため、実試料中の指定薬物の検出やヒトの生体試料にも応用できるものと考えられ、薬物乱用者の使用履歴の証明に応用できると期待される。

A. 研究目的

近年、麻薬・覚せい剤の代用として違法ドラッグが乱用されている。これらの薬物は、麻薬と薬理作用が類似しているものもあり、比較的安価に入手できるため、青少年の間で蔓延しており、健康被害や社会的弊害が懸念されている。違法ドラッグは法規制を逃れるために多様化し、一定の基本骨格を持つ様々な新規構造類似化合物が流通し、年々増加の一方を辿っている。厚生労働省では、このように深刻化する違法ドラッグ問題に対応し、

違法ドラッグ成分を予め明示し、規制根拠を明確化すると共に、流通・利用実態に即した迅速な規制を行うため、平成18年に薬事法の改正を行い、平成19年4月にトリプタミン系及びフェネチルアミン系など麻薬・覚せい剤類似化合物32品目を「指定薬物」とした。また、平成20年度にも新たに6化合物が「指定薬物」に指定された。

これまで、指定薬物の分析法は、主にLC-MS、GC-MS法が用いられてきたが、我々は昨年度、フェネチルアミン系薬物を蛍光標

識化後 HPLC で分離し測定する高感度 HPLC-FL 法を報告した。しかし、指定薬物中には標識可能な官能基を持たない化合物も多く存在している。そこで今年度は、各指定薬物とその構造中にアリルエーテル、アリルアミン、インドールなどをもち、電気化学活性を有することに着目し、HPLC-クーロアレイ電気化学検出器を用い、誘導体化を行わず簡便かつ高選択的高感度な指定薬物一斉分析法の開発を試みた。

また、実際日本市場に出回っていた3種類の違法ドラッグ BDB, JETS, Honey Flash2 に適用し、本法の有用性を確認した。

B. 研究方法

1. 試薬

指定薬物であるトリプタミン系 12 種類

(MIPT, DPT, DIPT, 5-MeO-AMT, 5-MeO-DMT, 5-MeO-DET, 5-MeO-MIPT, 5-MeO-DPT, 5-MeO-DALT, 5-MeO-EIPT, 4-OH-DIPT, 4-AcO-DIPT) の塩酸塩、フェネチルアミン系 15 種類 (2C-E, 2C-T-2, 2C-T-4, 2C-C, 2C-I, 4-FMP, MMDA-2, BDB, TMA-6, PMMA, HMDMA, DOI, DOC, ALEPH-2, *N*-Me-FMP) の塩酸塩、ピペラジン系 2 種類 (4-MPP, MDBP) 及びその他 4 種類

(Indan-2-amine, MDPV, bk-MBDB, *N*-ethylcathinone) の塩酸塩、計 33 種類を用い、それぞれ 1 mg を量り取り、300 µg/mL 水溶液を作成し、標準溶液として分析に用いた。これらの化合物の名称及び構造式は Fig.1 に示した。また、移動相としてはリン酸カリウム (KH₂PO₄, 和光純薬工業) と trifluoroacetic acid (TFA, 関東化学), acetonitrile (ACN, 関東化学), methanol (MeOH, 関東化学) を使用し、実試料としては実際市場で違法ドラッグとして販売されていた 3 種類 (BDB, JETS, Honey Flash 2) の違法ド

ラッグを用いた。H₂O は超純水装置 (PWU-200, ADVANTEC) を用いて得られた純水を使用した。

2. HPLC-CAD システム

HPLC 装置は、ポンプ (LC-20AD, Shimadzu), 脱気装置 (DGU-20A₃, Shimadzu), システムコントローラー (SCL-10AVP, Shimadzu), マニユアルインジェクター (MC MEDICAL), カラムオープン (MC MEDICAL), サンプルクーラー (MC MEDICAL) から成り、検出器にはクーロアレイ検出器 ESA 5600A (CAD, MC MEDICAL) を使用し、自動解析用ソフトとして、CoulArray 3.01 (MC MEDICAL) を用いた。カラムには Cadenza CD-C18 (4.6 mm×250 mm, i. d., 3 µm), TSK-gel ODS-100V (4.6 mm×250 mm, i. d., 3 µm), Ascentis Express C18 (100 mm×2.1 mm, i. d., 2.7 µm) を用い、カラム温度は 40℃ とした。

3. HPLC-CAD の分析条件の最適化

(a) カラムの選択

トリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系などの指定薬物 33 種類をそれぞれ 300 µg/mL に調製混合し、HPLC-CAD に注入した。カラムには Cadenza CD-C18 (4.6 mm×250 mm, i. d., 3 µm), TSK-gel ODS-100V (4.6 mm×250 mm, i. d., 3 µm), Ascentis Express C18, (100 mm×2.1 mm, i. d., 2.7 µm) 3 種類を用いて、最適なカラムの選択を行った。

(b) 移動相の検討

移動相には最適なカラムを用い、リン酸カリウム緩衝液、アセトニトリル、メタノールの混合溶液を使用した。緩衝液の濃度、pH、有機相のアセトニトリル、メタノールの割合の検討を行い、指定薬物 33 種類の一斉分離条件や指定薬物をトリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系を含むその他、の 3 系統にそれぞれ分類し、系統別に最適な分離条件の検討を行った。

(I) 最適化した HPLC-CAD の分析条件 (全種類)

装置: HPLC-CAD system

カラム: TSK-gel ODS-100V (250×4.6mm, i.d., 3µm, TOSOH)

カラム温度: 40℃, 流速: 1.0 ml/min

移動相: A=31.4 mM KH₂PO₄

/MeOH/ACN=95/4/1 (pH 3.5)

B=60 mM KH₂PO₄

/MeOH/ACN=50/40/10 (pH 3.5)

グラジエント: B. conc. 25% (0- 20 min), 10% (20.1- 60 min), 10- 70% (60- 240 min)

注入量: 10 µl

セル電圧 (mV)

#1: 0, #2: 90, #3: 180, #4: 270, #5: 360, #6: 450, #7: 540, #8: 630, #9: 720, #10: 810, #11: 900, #12: 990, #13: 1080, #14: 1170, #15: 1260, #16: 1350.

(II) トリプタミン系指定薬物

グラジエント: B. conc. 20- 60% (0- 40 min), 60- 90% (40- 55 min)

その他の条件: (I)と同様である.

(III) フェネチルアミン系指定薬物

流速: 0.5 ml/min

グラジエント: B. conc. 65% (0-10 min), 80% (10.1- 50 min)

その他の条件: (I)と同様である.

(IV) ピペラジン系及びその他の指定薬物

流速: 0.8 ml/min

グラジエント: B. conc. 55% (0- 10 min), 55- 95% (10- 15 min), 95% (15- 20 min)

その他の条件: (I)と同様である.

4. 違法ドラッグの前処理

実試料として, 実際市場で違法ドラッグとして販売されていた 3 種類 (BDB, JETS, Honey Flash 2) を用いた. 前処理では BDB を 1 mg 取り, 1 mL のメタノール:水(1:1)溶液で溶解し, 遠心後 (2000 rpm×10 min), 上清

をフィルターろ過(0.45 µm)し, ろ液を 30 µL 取り, 希釈し, HPLC-CAD で分析を行った. JETS は 1 mg 取り, 10 分ソニケーション後, その上清液を BDB と同様に操作を行った. Honey Flash 2 は液体試料であるため, 水で 10 倍希釈し, BDB と同様に操作を行った.

C. 研究結果・考察

1. 指定薬物全種類の一斉分離検出の検討

本研究ではトリプタミン系, フェネチルアミン系, ピペラジン系及びその他, などを含む 33 種類の指定薬物を蛍光標識化せず, 簡便迅速, かつ高感度なスクリーニング法の開発を目的として, 指定薬物の構造中にアリルエーテル, アリルアミン, インドール骨格などを有し, 電気化学活性を有することに着目し, HPLC-クーロアレイ電気化学検出器による一斉同時分析を試みた. まず, カラムには Cadenza CD-C18(4.6 mm×250 mm, i. d., 3 µm)を用い, 移動相にはリン酸カリウム (KH₂PO₄) 緩衝液, アセトニトリルを用い 33 種類の指定薬物の一斉分離を行ったが, 有機溶媒アセトニトリルのみでは, トリプタミン系の 5-MeO-AMT と 5-MeO-DMT, 5-MeO-MIPT と 5-MeO-DET の化合物が分離できなかった. そこで, 移動相に粘性が高いメタノールを加え, 指定薬物のカラムでの保持を増加させることにした. その結果, 分離の改善が見られ, 移動相には A: 31.4 mM KH₂PO₄ /MeOH/ACN=95/4/1 (pH 3.5), B: 60 mM KH₂PO₄ /MeOH/ACN=50/40/10 (pH3.5)とした. 種々なグラジエントの条件を検討した結果 Fig.2 A のクロマトグラムに示したように分離できず重なったピークが多く, 22 種類の化合物しか確認することができなかった. そこで, 指定薬物にはアミノ基を持つ化合物が多いことを考慮して移動相の pH を調整し, 化合物を分子型にすることでカラムで

の保持を強くし、分離の改善を図る目的として、移動相には A: 31.4 mM KH_2PO_4 /MeOH/ACN=95/4/1 (pH 9.0) に調製した。その結果、Fig.2 B のクロマトグラムに示したように 26 種類の指定薬物を確認することができたが、測定ベースラインが不安定であった。次は、移動相の極性を下げる目的として移動相に THF を加え、分離を試みた。その結果、Fig.2 C のクロマトグラムに示したように、27 種類の指定薬物を分離検出することができたが、一斉分離には至らなかった。そこで、カラムを変更し、金属不純物の少ない高純度シリカの表面にオクタデシル基を導入し徹底した残存シラノール基のエンドキャップを行っている塩基性物質で良好なピーク形状を得ることができる ODS-100V (4.6 mm×250 mm, i.d., 3 μm) を用いることにした。移動相には A: 31.4 mM K_2HPO_4 aq./MeOH/ACN=95/4/1 (pH 6.7), B: 60 mM K_2HPO_4 aq./MeOH/ACN=50/40/10 (pH 6.7) を使用した。その結果、Fig.2 D のクロマトグラムに示したように良好なピーク分離が得られ、300 分以内に 31 種類の指定薬物を一斉に同時分離検出することができた。

本条件でも一部の化合物を除いて一斉分離分析することが可能であるが、一斉分離分析に要する時間が長いなどの問題点があった。そこで、全種類の指定薬物をトリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系及びその他を含む 3 系統にそれぞれ分類し、系統別に迅速な一斉分離検出を試みることにした。

2. 各系統に分類したそれぞれの指定薬物の分離の検討

指定薬物を系統別にトリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系及びその他を含む指定薬物の 3 つのグループに分類し、それぞれについて系統別一斉分離検出の検討

を行った。

(a) トリプタミン系指定薬物

トリプタミン系指定薬物を 1.0 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、カラムには ODS-100V (4.6 mm×250 mm, i.d., 3 μm)、移動相には A=31.4 mM KH_2PO_4 /MeOH/ACN=95/4/1 (pH 3.5), B=60 mM KH_2PO_4 /MeOH/ACN=50/40/10 (pH 3.5) を使用し、グラジエントの条件で移動相 B を 20-60% (0-40 min), 60-90% (40-55 min) の条件で分析を行った。その結果、Fig.3 のクロマトグラムに示したように 20 分～55 分の間 11 種類のトリプタミン系指定薬物を良好に分離することができた。

(b) フェネチルアミン系指定薬物

フェネチルアミン系指定薬物 15 種類を 20 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、カラムには ODS-100V (4.6 mm×250 mm, i.d., 3 μm)、移動相には A=31.4 mM KH_2PO_4 /MeOH/ACN=95/4/1 (pH 3.5), B=60 mM KH_2PO_4 /MeOH/ACN=50/40/10 (pH 3.5) を使用し、分離検出条件を検討した。移動相の流速を 1.0 ml/min にした場合は、Fig.4 (I) に示したクロマトグラムから分かるように 2C-T-2 と 2C-I, 2C-E と ALEPH-2 と DOI について分離が不十分であった。また、移動相の流速を 0.7 ml/min にした場合は、Fig.4 (II) に示したクロマトグラムから分かるように 2C-T-2 と 2C-I, 2C-E と ALEPH-2 と DOI の分離に少し改善が見られたが、完全に分離することができなかった。そこで、粒子径が小さいカラム Ascentis Express C18 (100 mm×2.1 mm, i.d., 2.7 μm) を用いて検討を行った。その結果、後半部分に溶出した指定薬物の分離の改善が見られたが、ピークがブロードになってしまった。移動相の流速を 0.5 ml/min にした場合、Fig.4 (III) に示したクロマトグラムから分かるように 40 分以内に 15 種類のフェネチルアミン系指定薬物を良好に分離することができた。

(c) ピペラジン系及びその他の指定薬物

ピペラジン系及びその他の6種類指定薬物は50 µg/mlに調製し、カラムには ODS-100V (4.6 mm×250 mm, i.d., 3 µm), 移動相には A = 31.4 mM KH₂PO₄ /MeOH/ACN=95/4/1 (pH 3.5), B = 60 mM KH₂PO₄ /MeOH/ACN=50/40/10 (pH 3.5)を使用し、流速は0.8 ml/min, グラジエント条件で移動相Bを55% (0-10 min), 55-95% (10-15 min), 95% (15-20 min)で分離検出を行った。その結果、Fig.5のクロマトグラムに示したように22分以内で6種類のピペラジン系及びその他の指定薬物を良好に分離検出することができた。

3. 検出限界の検討

指定薬物全種類を Fig.6 に示したそれぞれのハイドロダイナミックポルタモグラムから最適な酸化電圧を選択し、検出限界 (S/N=5)を求めた。その結果、指定薬物の検出限界は25pg/ml~0.5µg/mlであった。

4. 実試料の測定

本法を用いて、市場に出回っていた実試料のBDB, JETS, Honey Flash中に含まれる指定薬物の測定を行ったところ、Fig.7に示したようにBDBからはBDB, JETSからは2C-I, Honey Flash2からはMMDA-2をそれぞれ感度良く検出することができた。

D. 結論

HPLC-CADによる指定薬物の簡便かつ高感度一斉分析法を確立することができた。全指定薬物の一斉分析では31種類の指定薬物を300分以内良好に分離することができた。また、32種類の指定薬物をトリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系及びその他、の3種類に系統別に分類した。系統別による一斉分析では、トリプタミン系を55分以内に11種類、フェネチルアミン系では40

分以内に15種類、ピペラジン系及びその他の系では22分以内に6種類の指定薬物を良好に分離検出することができた。このように系統別の分離検出では3種類の方法的いずれかを使うことにより、計32種類指定薬物を分離検出することができた。

更に、本法を実試料であるBDB, JETS, Honey Flash 2中に含まれる指定薬物に適用したところ、BDBからはBDB, JETSからは2C-I, Honey Flash 2からはMMDA-2を、それぞれ感度良く分離検出することができた。

本法は31種類の指定薬物を一斉に分離検出可能であるのみならず、32種類の指定薬物を系統別に一斉分離検出が可能であるため、目的に合わせてそれぞれの分離検出法を選択して使用することが可能である。更に、蛍光誘導体化など行わず、簡便かつ高感度に一斉分離検出することが可能であるため、本法は、指定薬物製品の検出やヒトの血漿、毛髪等他の生体試料への応用も可能と考えられ、薬物乱用者の使用履歴の証明に応用できるものと期待される。

E. 参考文献

特になし。

F. 健康危険情報

特になし。

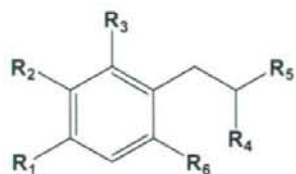
G. 研究発表

1. 論文発表

1) Jun Zhe Min, Yoshiha Shimizu, Toshimasa Toyo'oka, Shinsuke Inagaki, Ruri Kikura-Hanajiri, Yukihiro Goda: Simultaneous determination of eleven designated hallucinogenic phenethylamines by ultra-fast liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **873**, 187-194 (2008)

2. 学会発表

- 1) 関俊哲, 清水芳羽, 豊岡利正, 稲垣真輔, 花尻瑠理, 合田幸広: UFLC-蛍光法によるフェネチルアミン系指定薬物の高感度一斉分離検出法の開発, 第15回クロマトグラフィーシンポジウム, 講演要旨集, p.135-136, 静岡 (2008. 5. 31).
 - 2) 関俊哲, 畠中俊, 豊岡利正, 稲垣真輔, 花尻 瑠理, 合田幸広: UPLC-ESI-TOF-MSによる蛍光標識化指定薬物の高感度迅速一斉分析法の開発, 第19回クロマトグラフィー科学会議, 講演要旨集, p.63-64, 京都(2008. 12. 2).
 - 3) Jun Zhe Min, Suguru Hatanaka, Toshimasa Toyo'oka, Shinsuke Inagaki, Ruri Kikura-Hanajiri, Yukihiro Goda: Rapid, sensitive and simultaneous determination of fluorescence-labeled designated drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray- ionization time-of-flight mass spectrometry., The 33rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2008 Kyoto) (Kyoto), Abstract book, p.385, December 4, 2008.
 - 4) 畠中俊, 関俊哲, 豊岡利正, 稲垣真輔, 花尻 瑠理, 合田幸広: 蛍光標識化指定薬物のUPLC-ESI-TOF-MSによる迅速高感度一斉分析法の開発, 日本薬学会第129年会, 京都 (2009. 3.26).
 - 5) 山下和秀, 関俊哲, 豊岡利正, 稲垣真輔, 花尻瑠理, 合田幸広: HPLC-クーロアレイ検出器(CAD)による指定薬物の高感度一斉分析法の開発, 日本薬学会第129年会, 京都 (2009. 3. 26).
- H. 知的所有権の取得状況
特になし.



Phenethylamines

Compounds	R1	R2	R3	R4	R5	R6
2C-I	I	OCH ₃	H	H	NH ₂	OCH ₃
2C-C	Cl	OCH ₃	H	H	NH ₂	OCH ₃
2C-E	CH ₂ CH ₃	OCH ₃	H	H	NH ₂	OCH ₃
2C-T-2	SCH ₂ CH ₃	OCH ₃	H	H	NH ₂	OCH ₃
2C-T-4	SCH(CH ₃) ₂	OCH ₃	H	H	NH ₂	OCH ₃
TMA-6	OCH ₃	H	OCH ₃	CH ₃	NH ₂	OCH ₃
4-FMP	F	H	H	CH ₃	NH ₂	H
DOI	I	OCH ₃	H	NH ₂	CH ₃	OCH ₃
PMMA	OCH ₃	H	H	CH ₃	NHCH ₃	H
<i>N</i> -Me-FMP	F	H	H	NHCH ₃	CH ₃	H
DOC	Cl	OCH ₃	H	NH ₂	CH ₃	OCH ₃
ALEPH-2	SCH ₂ CH ₃	H	OCH ₃	CH ₃	NH ₂	H



Fig.1-1 Structures of tested hallucinogenic designated substances