

に、本研究では、平成 21 年度に買い上げられた、インターネット上でカンナビノイド様の作用を標榜して販売されていた違法ドラッグ 9 製品について GC-MS, LC-MS および NMR 分析を行った。

B. 研究方法

平成 21 年度にインターネットを介して購入した違法ドラッグ 9 製品について GC-MS, LC-MS および NMR 分析を行った。

1. 分析試料及び試薬

平成 21 年度にインターネットを介して購入した違法ドラッグ製品(乾燥植物細片 7 製品(3 g), 黄白色粉末 2 製品(200~250 mg))を分析に供した。LC-MS の移動相に用いたアセトニトリルは HPLC グレードを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。JWH-073 および JWH-250 は Cayman chemical より購入した。定量分析において内部標準化合物(Internal standard: IS)として用いた吉草酸ベタメタゾン(β-Caryophyllene)は東京化成工業より購入した。抽出溶液の膜ろ過には、Ultrafree-MC(0.45 μm filter unit, MILLIPORE 社製)を用いた。

2. MS 測定用試料の調製法

植物細片は乳鉢で粉末化して 10 mg を使用し、MeOH 1 mL を加え、超音波下 10 分間抽出を行った。さらに膜ろ過を行い、不溶物を取り除いて測定試料とした。

3. GC-MS 分析条件

装置: Agilent 社製 6890N GC 及び 5975 MSD, カラム: HP-1MS(30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 社製), キャリアーガス: He, 0.7 mL/min, 注入法: スプリットレス, 注入量: 1 μL, 注入口温度: 200°C, カラム温度: 80°C(1 min hold) - 5°C/min - 190°C(15 min hold) - 10°C/min - 310°C(15 min hold), イオン化法: EI 法, 検出器温度: 280°C, scan range: m/z 40-550

4. LC-MS 分析条件

装置: [UPLC] Waters ACQUITY UPLC/[MS] Waters Single Quadrupole Detector(SQD), カラム: Atlantis HSST3(2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.8 μm,

Waters), ガードカラム: Van Guard column(2.1 mm i.d. × 5 mm, 1.8 μm, Waters), 移動相 A: 0.1% ギ酸水溶液, 移動相 B: 0.1% ギ酸アセトニトリル, グラジエント条件: A/B 50/50(0-3 min) - 30/70(5 min, 7 min hold), 測定波長: 190-500 nm, 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 1 μL, 検出: フォトダイオードアレイ検出器(PDA)および質量検出器

質量分析条件

イオン化: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法, Positive and negative mode, Desolvation gas flow: N₂ 650 L/h, Desolvation gas temp.: 350°C, Cone voltage: 30 V, Capillary voltage: 3000 V, scan range: m/z 150-700

5. 高分解能 MS 分析

装置: 【イオン源】Direct Analysis in Real Time (DART) / 【質量分析計】AccuTOF JMS-T100 (JEOL 製)

DART 条件: Positive mode, gas flow: He 2.0 l/min, gas temp.: 250°C, needle voltage: 3200 V, electrode 1: 100 V, electrode 2: 250 V

TOF-MS 条件: Positive mode, ion guide: 500 V, reflectron voltage: 950 V, orifice 1 voltage: 15 V, orifice 2 voltage: 5 V, ring lens voltage: 5 V, orifice 1 temp.: 80°C, mass range: m/z 100-500
質量校正: PEG600, 内部標準物質: diphenhydramine (C₁₇H₂₁NO), verapamil (C₂₇H₃₈N₂O₄)

6. NMR 測定

NMR 装置: JEOL 製 ECA-600

測定核種: ¹H, ¹³C, 測定溶媒: CDCl₃ (99.96%, ISOTEC 社製)

各種 NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC), Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC), Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy (DQF-COSY), and Rotating frame nuclear Overhauser Effect (ROE)) 測定を行った。

7. Recycle HPLC 分析条件

装置:リサイクル分取 HPLC 日本分析工業製 LC-9201, カラム: JALGEL-GS310, 移動相: CHCl_3 -MeOH (1/1), 流速: 5 mL/min, 検出: UV 検出器および RI 検出器

8. 化合物 1 および 3 の単離

試料(植物乾燥細片, 3 g)に CHCl_3 (100 ml) を加え, 1 時間室温で超音波抽出を行った. 抽出操作を 3 回行った後, 抽出液を濃縮, 乾固し, 得られた抽出エキスを Preparative TLC に付し, 展開溶媒 hexane-AcOEt (4/1) で分離を行った. TLC プレートの一部を掻き取り, CHCl_3 -MeOH (3/1) で抽出し, Fraction 1, 2 を得た. さらに, Fr. 1, 2 をそれぞれ Recycle HPLC (CHCl_3 -MeOH (1/1)) に付し, Fr. 1 から薄黄色油状化合物として **1** (41 mg) を得, また, Fr. 2 から白色粉末として化合物 **3** (111 mg) を得た.

9. 化合物 2 の単離

黄白色粉末試料 (60 mg) に CHCl_3 -MeOH (1/1) 2 ml を加えて溶解し, 膜ろ過を行い, 不溶物を取り除いた. さらに, Recycle HPLC (CHCl_3 -MeOH (1/1)) に付し, 白色粉末として化合物 **2** (31 mg) を得た.

10. 定量分析

粉末化した試料 (10 mg) に, 内部標準化合物 (Internal standard: IS) である吉草酸ベタメタゾン MeOH 溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 1 mL 加え, 超音波下 10 分間抽出を行った. さらに膜ろ過を行い, 不溶物を取り除いて測定試料とした. 定量分析は, LC-PDA において, 各化合物ごとに特定波長をモニタリングすることにより行った. JWH-251 (**1**) および JWH-250 (**2**) は 302 nm, JWH-081 (**3**) および JWH-073 (**4**) は 314 nm, 内部標準化合物は 240 nm でモニタリングを行った. 各化合物の検量線は, それぞれ 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製した標準溶液における各化合物の内部標準化合物 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に対するピーク面積比から作成した. 真度および精度 (相対標準偏差) は, 10, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 濃度について分析操

作を各濃度 3 回ずつ繰り返して測定した結果から評価した. 尚, 真度は各測定値と添加した各化合物量の差として算出した. 各製品中の含有量 (mg/g) は, 最終試料溶液の各濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) と分析に使用した試料量から算出した.

C. 研究結果・考察

1. 製品中の未知ピークの同定

今回同定した化合物の構造については Fig. 1 に示し, 違法ドラッグ製品 (No. 7) の MeOH 抽出試料の GC-MS および LC-MS 分析のスペクトルデータは Fig. 2, 3 に示した. GC-MS 分析の結果, 3 つのメインピーク (**1-3**) が観測された (Fig. 2a). 48.23 分に検出されたピーク (**1**) から主に 4 つのフラグメントイオンピーク [m/z (% relative intensity) 319 (5), 214 (100), 144 (17), and 105 (3)] が観測された (Fig. 2b). 一方, LC-MS 分析においても 3 つのメインピークが検出された (Fig. 3a, 3e). 9.0 分に検出されたピーク (**1**) は, m/z 320 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンピークが観測され (Fig. 3b, 3f), UV スペクトルは Fig. 3f に示す通り, 極大吸収は λ_{max} 246, 303 nm であった.

DART-TOFMS による化合物 **1** の HR-MS 分析では, m/z 320.19966 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ のピークが観測され, 推定組成式は $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{NO}$ であった. また, 質量差は -1.78 mmu であった.

化合物 **1** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルから, 水素数が 25 個であると考えられ, 2 個のメチル基 [δ 0.90 (3H, t, $J=7.2$ Hz) and 2.33 (3H, s)], 9 個の芳香族プロトン [δ 7.04, 7.16, 7.18, 7.19, 7.22, and 8.41 (each 1H, m), 7.28 (1H, td, $J=6.9, 1.7$ Hz), 7.30 (1H, td, $J=6.9, 1.7$ Hz) and 7.74 (1H, s)], 3 個のメチレンプロトン [δ 1.30 and 1.35 (each 2H, m) and 1.87 (2H, q, $J=7.2$ Hz)], そして, 窒素原子に結合したメチレンプロトン [δ 4.14 (2H, t, $J=7.2$ Hz)] およびカルボニルに隣接したメチレンプロトン [δ 4.20 (2H, s)] のシグナルが観測された (Table 1). また, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルから, 22 個のシグナルが観測され, 2 個のメチル基 (δ

13.9 and 20.0), カルボニル基の炭素 (δ 192.7), 窒素原子に結合した炭素 (δ 47.1) およびカルボニルに隣接した炭素 (δ 44.9) を含む 5 個のメチレン基, 9 個の芳香族炭素 (δ 109.8, 122.6, 122.8, 123.3, 126.0, 126.9, 130.3, 130.3 and 134.4), 5 個の 4 級芳香族炭素 (δ 116.2, 126.7, 134.6, 136.6 and 137.0) が観測された (Table 1). さらに 2 次元 NMR (DQF-COSY, HMQC, and HMBC) 結果から, 3 つの部分構造 (1,3-substituted indole group, 1,2-substituted phenyl group, *n*-pentyl group) が推定され, それら部分構造の繋がりには HMBC の結果から明らかとなった (Table 1, Fig. 4). インドールの芳香族プロトン (δ 7.74, H-2') はカルボニル炭素 (δ 192.7, C-1) および *n*-pentyl group のメチレン炭素 (δ 47.1, C-1'') と相関がみられた. また, カルボニル基に隣接したメチレンプロトン (δ 4.20, H-2) は, インドールの炭素 (δ 116.2, C-3') , フェニル基の 4 級炭素 (δ 134.6, C-2''') および 3 級炭素 (δ 130.3, C-6''') と相関がみられた. さらに δ 2.33 ppm に観測されたシングレットメチルプロトンは, フェニル基の C-1'' 位 (δ 137.0) および C-3'' 位 (δ 130.3) と相関がみられた (Table 1, Fig. 4). さらに, *n*-pentyl group のメチレンプロトン (δ 4.14, H-1'') を照射したところ, 芳香族プロトン (H-2', H-7') との ROE 相関が観測された (Fig. 4). また, 2 位のメチレンプロトンを照射したところ, 芳香族プロトン (H-2', H-6''') および 2'' 位のメチル基 (δ 2.33) と ROE 相関が観測された (Fig. 4). 以上の結果から, 化合物 1 は, 2-(2-methylphenyl(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)ethanone (JWH-251) と同定された (Fig. 1). さらに, 2 位のメチレンプロトン照射により, 4' 位のプロトンとも ROE 相関が見られたことから, 1 のフェニルアセチル部分はフレキシブルに動いていると考えられた. 化合物 1 は, 2005 年に Huffman らによって合成されたフェニルアセチルインドール誘導体: JWH-251 であり, カンナビノイド受容体アゴニスト活性をもつことが報告されている⁵⁾. なお, JWH-251 は, 今回違法ドラッグ成分として初めて

検出されたが, これまで検出された合成カンナビノイドである JWH-018, JWH-073 のようなナフトイルインドール誘導体とは異なる骨格の化合物であった.

次に, GC-MS 分析において 49.11 分に検出されたピーク (2) は, 主に 4 つのフラグメントイオンピーク [m/z (% relative intensity) 335 (6), 214 (100), 144 (19) and 121 (1)] が観測された. m/z 335 は $[M]^+$ の分子イオンピークと推測され, 化合物 2 の分子量は 1 より 16 小さいものの, 1 と同様に, m/z 214 にフラグメントイオンピークが観測された (Fig. 2c). 一方, LC-MS 分析において 8.0 分に検出されたピーク (2) は, m/z 336 に $[M+H]^+$ のイオンピークが観測され (Fig. 3c, 3g), UV スペクトルは Fig. 3g に示す通りであり, 前述の化合物 1 に類似していた. そこで, 1 のメキシ体である JWH-250 の標準品と比較したところ, GC-MS, LC-MS 共に, 化合物 2 と保持時間およびマススペクトルが一致した (Fig. 2e, 3i). 次に, 製品中から単離した化合物 2 の DART-TOFMS による HR-MS 分析では, m/z 336.19933 に $[M+H]^+$ のピークが観測され, 推定組成式は $C_{22}H_{26}NO_2$ であり, JWH-250 と同じであった. また, 質量差は -2.98 mmu であった. さらに, 化合物 2 と JWH-250 の標準品の 1H -NMR, ^{13}C -NMR を比較したところ, 完全に一致した. 従って, 化合物 2 は, 2-(2-methoxyphenyl(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)ethanone (JWH-250) と同定した (Fig. 1). また, JWH-250 (2) は, JWH-251 (1) と同時に Huffman らによって合成されたフェニルアセチルインドール誘導体であり, こちらもカンナビノイド受容体アゴニスト活性をもつことが報告されている⁵⁾. なお, JWH-250 (2) は, 2009 年にイギリスおよびドイツで違法ドラッグ製品から検出されている⁶⁾.

さらに, GC-MS 分析において, 53.65 分に検出されたピーク (3) のフラグメントイオンピーク [m/z (% relative intensity) 371 (100), 314 (43), 214 (40), 185 (27) and 157 (10)] は, Fig. 2d に示す

通りであるが、マススペクトルパターンは化合物 1 および 2 とは大きく異なっていた。また、LC-MS 分析において 10.6 分に検出されたピーク (3) は、 m/z 372 に $[M+H]^+$ のイオンピークが観測された (Fig. 3d, 3h)。また、UV スペクトルの極大吸収は λ max 316 nm であり (Fig. 3h)、そのスペクトルパターンはナフトイルインドール誘導体である JWH-018 や JWH-073 と類似していた²⁻⁴⁾。そこで、化合物 3 を単離し、DART-TOFMS により HR-MS 分析を行った結果、 m/z 372.19494 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、推定組成式は $C_{25}H_{26}NO_2$ であり、質量差は -1.41 mmu であった。化合物 3 の 1H -NMR スペクトルから、水素数が 25 個であると考えられ、1 個のメチル基 [δ 0.86 (3H, t, $J=7.0$ Hz)], 1 個のメキシ基 [δ 4.08 (3H, s)], 9 個の芳香族プロトン [δ 7.34, 7.35, 7.40, 7.41, 7.50, 7.52 and 8.30, 8.34 and 8.46 (each 1H, m)] および AB タイプの芳香族プロトン [6.84 (1H, d, $J=7.9$ Hz) and 7.66 (1H, d, $J=7.9$ Hz)], 3 個のメチレンプロトン [δ 1.25 and 1.31 (each 2H, m) and 1.82 (2H, quint, $J=7.3$ Hz)], そして、窒素原子に結合したメチレンプロトン [δ 4.08 (2H, t, $J=7.3$ Hz)] のシグナルが観測された (Table 1)。また、 ^{13}C -NMR スペクトルから、25 個のシグナルが観測され、1 個のメチル基 (δ 13.9), 1 個のメキシ基 (δ 55.7), 窒素原子に結合した炭素 (δ 47.1), カルボニル炭素 (δ 191.8), 3 個のメチレン基, 11 個の芳香族炭素 および 7 個の 4 級芳香族炭素が観測された (Table 1)。さらに 2 次元 NMR (DQF-COSY, HMQC and HMBC) および 1d-ROE の結果から、化合物 3 は、JWH-018 や JWH-073 と同じくアミノアルキルナフトイルインドール構造を有する化合物と考えられた (Table 1, Fig. 4)。また、メキシプロトン (δ 4.08 (3H, s)) は 4'' 位の炭素 (δ 157.0) と HMBC 相関が観測され、3'' 位のプロトンと ROE 相関が見られたことから、4''-メキシナフタレン構造を有すると考えられた (Fig. 4)。以上の結果から、化合物 3 は、1-(4-methoxynaphthalenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (JWH-081) と推定された

(Fig. 1)。JWH-081 は、1998 年に Huffman らによって合成されたナフトイルインドール誘導体であり、化合物 3 の ^{13}C -NMR データを文献値と比較したところ一致したことから、化合物 3 は JWH-081 と同定した (Table 1)⁷⁾。また、本化合物についても同様にカンナビノイド受容体アゴニスト活性をもつことが報告されている⁸⁾。

2. 定量分析

Table 2 に、JWH-251 (1), JWH-250 (2), JWH-081 (3), JWH-073 (4) の定量分析法における検量線と精度、真度および保持時間を示した。各化合物について、10-500 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で良好な直線性が得られた ($r^2 \geq 0.9931$)。化合物 1 では 3 濃度において相対標準偏差 $\leq 4.3\%$, 真度 $\leq 1.8\%$, 化合物 2 では相対標準偏差 $\leq 4.9\%$, 真度 $\leq 2.6\%$, 化合物 3 では相対標準偏差 $\leq 2.3\%$, 真度 $\leq 1.3\%$, 化合物 4 では相対標準偏差 $\leq 1.5\%$, 真度 $\leq 2.3\%$ と良好な値であった。尚、JWH-073 (4) の UV および MS スペクトルは先に報告しているので割愛したが⁴⁾、本定量法とグラジエント条件が若干異なるため、保持時間は異なる (6.8 min \rightarrow 8.3 min)。

本分析法を用いた製品中の各合成カンナビノイドの含有量を Table 3 に示した。各化合物の製品 1g あたりの含有量は、JWH-251 (1) : 3.65 ~ 18.89 mg, JWH-250 (2) : 16.90 ~ 339.68 mg, JWH-081 (3) : 32.09 ~ 83.60 mg, JWH-073 (4) : 29.61 mg であった。従って、製品中の各化合物の含有量は、製品毎にばらつきがあることが判明した。JWH-250 (2) は乾燥植物製品だけでなく粉末として高濃度に混入されている製品があった (No. 4, 5)。また、今回新たに検出された化合物 (1-3) についても各製品中に単体で混入されているものや、2~3 化合物が混入されているものがあつた。

これまでに検出された合成カンナビノイドとしては、最初に Δ^9 -tetrahydrocannabinol の誘導体である cannabicyclohexanol が多数の植物系違法ドラッグ製品から検出されたが、その後インド

ール誘導体であるJWH-018を始めとしたいわゆるJWH シリーズの化合物が検出されるようになった。Table 4に、これまで検出されたJWHシリーズの合成カンナビノイドおよび大麻の主活性成分 Δ^9 -THC のカンナビノイド受容体(CB₁-R, CB₂-R) に対する親和性を参考データとして示した。JWH-251 (1), JWH-250 (2), JWH-073 (4) のCB₁-R 親和性($K_i = 29.0, 11.0, 8.9$ nM)は、 Δ^9 -THC($K_i = 40.7$ nM)の約1~5倍程度の強さであるが、 Δ^9 -THCと比較して、CB₁-R 選択性が高いことがわかる。また、JWH-081 (3)のCB₁-R 親和性は $K_i = 1.2$ nM であり、 Δ^9 -THC の約34倍の強さを示すとともに、CB₁-R 選択性も高いことがわかる。一方、既に多くの製品からの検出が報告されているJWH-018のCB₁-R 親和性($K_i = 9.0$ nM)は、 Δ^9 -THC の約5倍程度の強さであるが、CB₁-R 選択性は低く、逆にCB₂-R 親和性の方が強いことがわかる。従って、JWH-018 のような単にカンナビノイド受容体に対する親和性を有する化合物だけでなく、化合物(1-3)のような、より強いカンナビノイド様の精神活性を示すと考えられるCB₁-R 選択性の高い化合物の流通が認められた。

D. 結論

平成21年度に買い上げられたカンナビノイド様作用を標榜した違法ドラッグ製品中からナフトイルインドール誘導体であるJWH-073と共に、新規違法ドラッグ成分として3化合物を同定した。一つは、指定薬物JWH-018のメキシ体であるナフトイルインドール誘導体:JWH-081であった。他の2化合物は、フェニルアセチルインドール誘導体であるJWH-251およびJWH-250であり、両化合物は違法ドラッグ成分としては新規骨格の化合物であった。これら3化合物は、いずれもカンナビノイド様の薬理作用を有する化合物として合成されたものであった。JWH-018を始めとしたインドール誘導体タイプのカンナビノイドアナログは、これまでに多数合成されている。また今回、化合物(1-3)のような、よりCB₁-R 選択性の高い化合物が検出

されたことから、今後、より強力なカンナビノイド様の精神活性を有する新たな合成カンナビノイドの流通が危惧される。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有用な科学的データであると考えられる。

E. 参考文献

- 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, 57, 439-441.
- 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, 27, 61-66.
- 3) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Ogata J., Goda, Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci. Int.*, 2010, in press. doi:10.1016/j.forsciint.2010.01.004.
- 4) 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)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成21年度研究分担報告「合成カンナビノイド含有違法ドラッグ製品の流通実態調査」(内山奈穂子)
- 5) Huffman JW, Szklennik PV, Almond A, Bushell K, Selley DE, He H, Cassidy MP, Wiley JL, Martin BR., 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15, 4110-4113.
- 6) EMCDDA 2009 Thematic paper — Understanding the 'Spice' phenomenon (2009). <http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_80086_EN_Spice%20Thematic%20paper%20%E2%80%94%20final%20version>

.pdf>

- 7) Huffman JW, Wu M, Lu J, A very facile S_NAr reaction with elimination of methoxide. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 4510-4514.
- 8) Aung MM, Griffin G, Huffman JW, Wu M, Keel C, Yang B, Showalter VM, Abood ME, Martin BR. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB(1) and CB(2) receptor binding. *Drug Alcohol Depend.* 2000, 60(2), 133-40.
- 9) Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 278, 989-999.

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

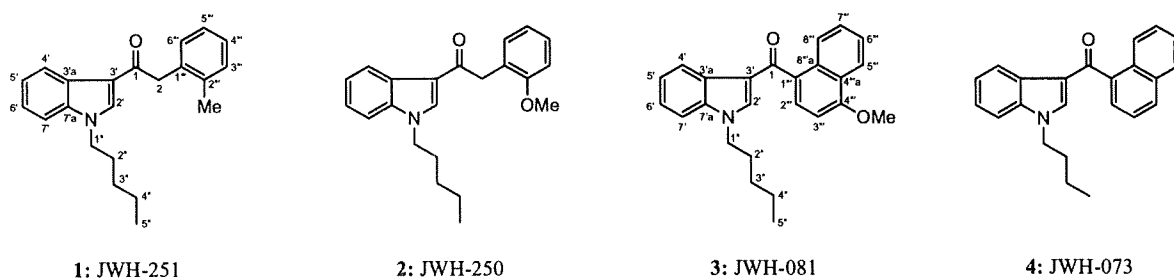


Fig. 1. Structures of detected cannabimimetic indoles

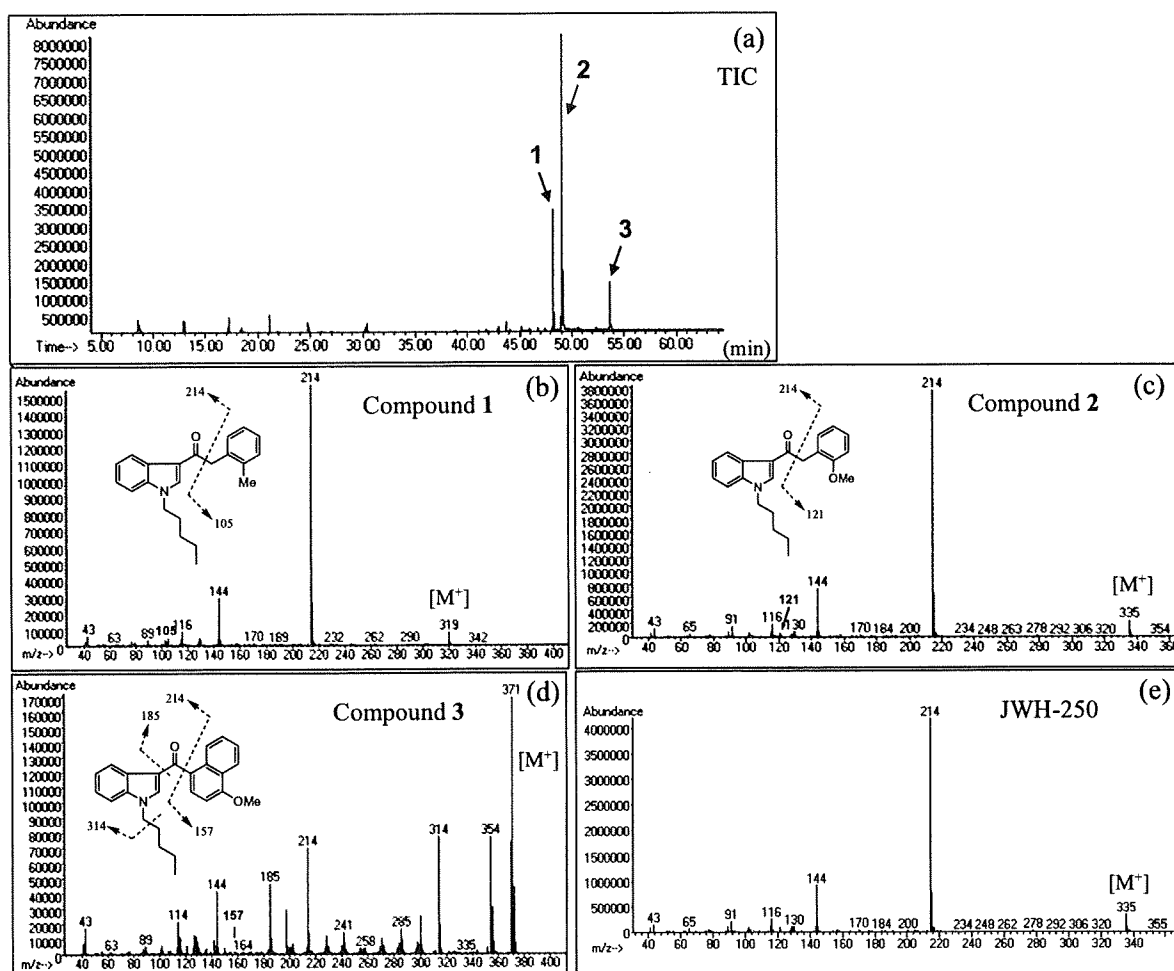


Fig. 2. GC-MS chromatogram of the extract of the product No. 7 (a), EI mass spectra of the detected peaks of 48.23 min (b, 1), 49.11 min (c, 2), 53.65 min (d, 3) and the standard of JWH-250 (e, RT: 49.11 min).

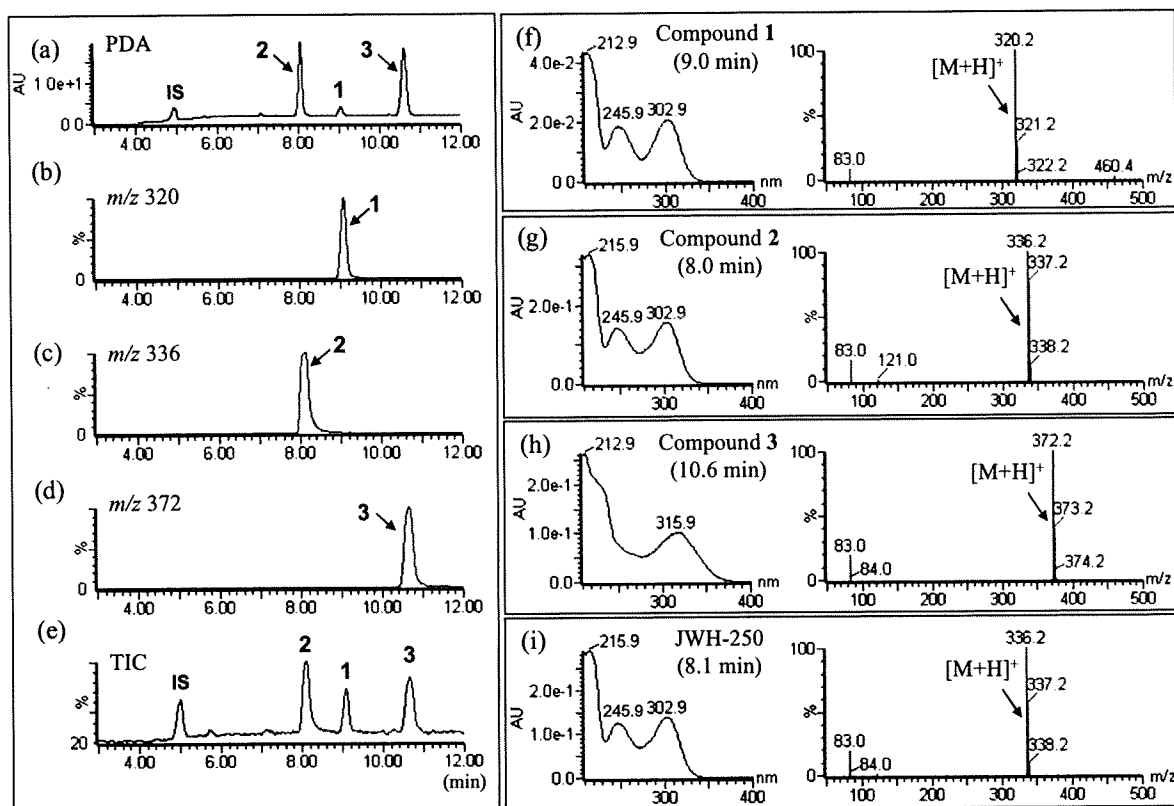


Fig. 3. HPLC-UV (a) and MS chromatograms of the extract of the product No. 7. Mass chromatograms of m/z 320 (b, 1), m/z 336 (c, 2), m/z 372 (d, 3) and total ion chromatogram (e). UV spectra and ESI mass spectra of each peak (f-h) and the standard of JWH-250 (i) are shown.

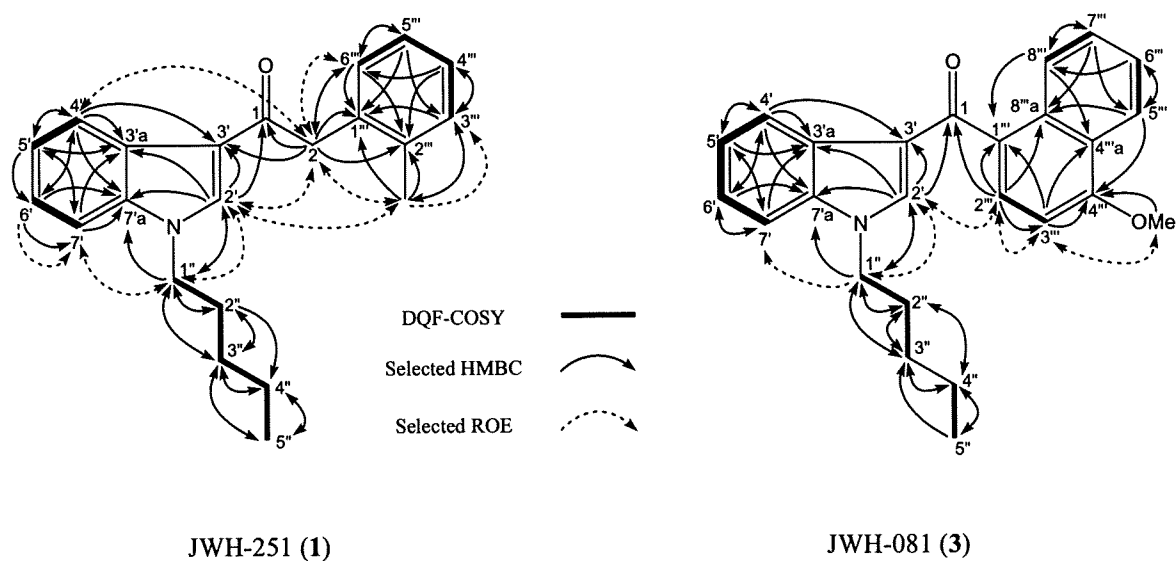


Fig. 4. Selected DQF-COSY, HMBC and ROE correlations of JWH-251 (1) and JWH-081 (3)

Table 1. NMR Data of Compounds in CDCl₃ ^{a)}

No.	JWH-251 (1)			Ref ^{c)}	JWH-081 (3)			
	¹³ C	¹ H	HMBC ^{b)}		¹³ C	¹³ C	¹ H	HMBC
1	192.7	–	–	191.7	191.8	–	–	
2	44.9	4.20, 2H, s	1, 3', 1''', 2''', 6'''	–	–	–	–	
2'	134.4	7.74, 1H, s	1, 3', 3'a, 7'a, 1''	137.4	137.4	7.41, 1H, s, overlapped	1, 3', 3'a, 7'a, 1''	
3'	116.2	–	–	117.6	117.7	–	–	
3'a	126.7	–	–	127.1	127.2	–	–	
4'	122.8	8.41, 1H, m	3', 3'a, 5', 6', 7'a	122.7	122.9	8.46, 1H, m	3', 3'a, 5', 6', 7'a	
5'	122.6	7.28, 1H, td, <i>J</i> =6.9, 1.7 Hz, overlapped	3'a, 4', 6', 7'	123.3	123.4	7.35, 1H, m, overlapped	3'a, 4', 7'	
6'	123.3	7.30, 1H, td, <i>J</i> =6.9, 1.7 Hz, overlapped	4', 7', 7'a	122.5	122.6	7.34, 1H, m, overlapped	4', 7', 7'a	
7'	109.8	7.04, 1H, m	3'a, 5', 7'a	109.9	109.9	7.40, 1H, m	3'a, 5', 6'	
7'a	136.6	–	–	136.9	136.9	–	–	
1''	47.1	4.14, 2H, t, <i>J</i> =7.2 Hz	2', 7'a, 2'', 3''	47.0	47.1	4.08, 2H, t, <i>J</i> =7.3 Hz, overlapped	2', 7'a, 2'', 3''	
2''	29.5	1.87, 2H, q, <i>J</i> =7.2 Hz	1'', 3'', 4''	29.4	29.5	1.82, 2H, q, <i>J</i> =7.3 Hz	1'', 3'', 4''	
3''	29.0	1.30, 2H, m, overlapped	1'', 2'', 4'', 5''	28.8	28.9	1.25, 2H, m, overlapped	1'', 2'', 4''	
4''	22.2	1.35, 2H, m, overlapped	3'', 5''	22.1	22.2	1.31, 2H, m, overlapped	3'', 5''	
5''	13.9	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.2 Hz	3'', 4''	13.8	13.9	0.86, 3H, t, <i>J</i> =7.0 Hz	3'', 4''	
1'''	137.0	–	–	125.5/ 125.6	125.7	–	–	
2'''	134.6	–	–	127.8	127.8	7.66, 1H, d, <i>J</i> =7.9 Hz	1, 1''', 3''', 8''', 8'''a	
3'''	130.3	7.19, 1H, m, overlapped	1''', 4''', Me	102.1	102.1	6.84, 1H, d, <i>J</i> =7.9 Hz	1''', 4''', 4'''a	
4'''	126.0	7.16, 1H, m, overlapped	2''', 3''', 6'''	156.9	157.0	–	–	
4'''a	–	–	–	131.3	131.4	–	–	
5'''	126.9	7.18, 1H, m, overlapped	1''', 3''', 6'''	122.0	122.0	8.34, 1H, m	4''', 6''', 8'''a	
6'''	130.3	7.22, 1H, m, overlapped	2, 1''', 2''', 5'''	127.2	127.4	7.52, 1H, m, overlapped	5''', 8'''	
7'''	–	–	–	125.5/ 125.6	125.7	7.50, 1H, m, overlapped	5''', 8''', 8'''a	
8'''	–	–	–	125.7	125.8	8.30, 1H, m	1''', 4'''a, 7'''	
8'''a	–	–	–	132.1	132.1	–	–	
Me	20.0	2.33, 3H, s	1''', 2''', 3'''	–	–	–	–	
OMe	–	–	–	55.6	55.7	4.08, 3H, s, overlapped	4'''	

^{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. ^{c)} Ref. 7.

Table 2 Precision and accuracy of the LC-UV analysis of detected cannabimimetic compounds

Compounds	Linear ($\mu\text{g/ml}$)	Linearity	Concentratio ($\mu\text{g/ml}$)	Precision (%)	Accuracy (%)	Retention time (min)
JWH-251 (1)	10–500	$y = 0.033x - 0.1838$ $r^2 = 0.9985$	10	4.3	-1.8	9.0
			50	0.6	0.4	
			500	0.3	1.0	
JWH-250 (2)	10–500	$y = 0.0122x - 0.0185$ $r^2 = 0.9993$	10	4.9	-1.9	8.0
			50	2.6	-2.6	
			500	0.4	1.1	
JWH-081 (3)	10–500	$y = 0.0147x - 0.1045$ $r^2 = 0.9934$	10	1.3	-0.0	10.6
			50	2.0	-1.3	
			500	2.3	-0.2	
JWH-073 (4)	10–500	$y = 0.0149x + 0.094$ $r^2 = 0.9931$	10	1.5	-2.3	8.3
			50	0.5	-0.4	
			500	0.2	1.7	

Table 3 Quantification of detected cannabimimetic compounds in the herbal products ^{a)}

Product No.	Form	JWH-251 (1) (mg/g)	JWH-250 (2) (mg/g)	JWH-081 (3) (mg/g)	JWH-073 (4) (mg/g)
1	Dried leaf (cutting)	n.d.	25.88 \pm 0.64	n.d.	n.d. ^{b)}
2	Dried leaf (cutting)	n.d.	51.47 \pm 2.88	n.d.	n.d.
3	Dried leaf (cutting)	n.d.	16.90 \pm 1.79	83.60 \pm 0.94	n.d.
4	Powder	n.d.	321.39 \pm 8.97	n.d.	n.d.
5	Powder	n.d.	339.68 \pm 28.03	n.d.	n.d.
6	Dried leaf (cutting)	18.89 \pm 4.64	n.d.	32.09 \pm 7.49	n.d.
7	Dried leaf (cutting)	3.65 \pm 0.81	41.69 \pm 8.07	34.79 \pm 7.18	n.d.
8	Dried leaf (cutting)	n.d.	30.48 \pm 0.55	40.07 \pm 1.77	29.61 \pm 0.78
9	Dried leaf (cutting)	n.d.	n.d.	47.37 \pm 7.51	n.d.

^{a)} Data given as mean \pm standard deviation, $n = 3$, ^{b)} Not detected.

Table 4 K_i values of the detected cannabimimetic indoles and Δ^9 -THC to cannabinoid receptor

Compounds	K_i (nM)		Ratio CB_1/CB_2
	CB_1	CB_2	
JWH-251 (1) ^{a)}	29.0	146.0	0.20
JWH-250 (2) ^{a)}	11.0	33.0	0.33
JWH-081 (3) ^{b)}	1.2	12.4	0.10
JWH-073 (4) ^{b)}	8.9	38.0	0.23
JWH-018 ^{b)}	9.0	2.9	3.06
Δ^9 -THC ^{c)}	40.7	36.4	1.12

^{a)} Ref. 5. ^{b)} Ref. 8. ^{c)} Ref. 9.

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

—植物系違法ドラッグ製品の成分分析及び含有植物細片の DNA 塩基配列解析—

研究協力者 菊地 博之 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究助手

緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:近年,主にインターネット等を介した違法ドラッグ製品の流通拡大,及びそれらの乱用が社会問題となっている.これらの違法ドラッグ問題に適切に対応するため,これまでに,違法ドラッグ市場に流通する製品を対象に含有成分のスクリーニングを行っている.本研究では,上記のスクリーニング試験の結果,複数の未知ピークが検出された1製品について,化学成分の分析及び含有される植物細片の植物種の同定等,製品の網羅的な分析を行った.その結果,化学成分としては,MS及びNMRなどの各種機器分析により,*N*-methyltyramine (1), (*R*)-normacromerine (2), (*R*)-macromerine (3), (*S*)-vasicine (4), harmaline (6), harmine (7), 及び麻薬成分である mescaline (5) の7種の化合物を同定した.このうち,化合物2,3,5は,幻覚性フェネチルアミン化合物である.一方,含有植物細片のDNA塩基配列解析の結果,*Peganum harmala* (ハルマラ), *Turnera diffusa* (ダミアナ)の他に,幻覚性サボテンとして知られる *Coryphantha macromeris* と同定性の高い塩基配列が検出された.検出された化合物のうち,化合物1,2,3は,*C. macromeris* に,化合物4,6,7は,*P. harmala* に由来する天然成分であると推察される.以上,製品に含まれる化学成分と,塩基配列解析により明らかとなった植物種との間に相関性が認められた.本製品には少なくとも3種以上の植物片の混入が考えられるが,本研究は,違法ドラッグ製品より *C. macromeris* と考えられる植物片が検出されたはじめての報告事例である.

A. 研究目的

昨今,主にインターネット等を介した違法ドラッグの流通拡大,及びそれらの乱用が深刻化している.これら蔓延する違法ドラッグに対応するため,興奮等の作用を有する蓋然性が高く,保健衛生上の危機が発生する恐れがある薬物や植物を厚生労働大臣が指定薬物として指定する指定薬物制度が平成19年4月から施行された.これに伴い,違法ドラッグ市場における指定薬物の流通は大幅に減少した.一方で,現行の法制度では規制対象とならない幻覚性,麻薬性を標榜する植物の樹脂や乾燥物,粉碎物などを用いた,

いわゆる植物系違法ドラッグ製品の流通拡大が認められている.

我々は,これら製品の流通実態調査を行うため,毎年,市場流通品を買い上げ,含有成分のスクリーニング調査を行っている.本研究では,LC-MS分析を行った製品のうち,複数の未知ピークが検出された1製品に着目し,化学成分の単離,同定,及び向精神活性が疑われる化学成分について定量分析を行った.更に,製品に含有される植物細片の植物種を同定するために,DNA塩基配列解析を行った.

B. 研究方法

1. 試料

平成 20 年度にインターネット上で流通していた植物系違法ドラッグを分析対象製品とした。なお、本製品は乾燥植物細片の混合物 (3 g) で販売されていた。また、DNA 塩基配列解析に使用した *Coryphantha macromeris* (大分丸として販売) は、平成 21 年 6 月にインターネットを介して購入した。

2. 試薬

Mescaline は過去に報告した方法で合成したものをを用いた¹⁾。Harmaline 及び harmine は Aldrich 社より購入した。Lidocaine は SIGMA 社製を使用した。その他試薬は HPLC グレードまたは試薬特級に準じたものをを用いた。また、膜ろ過フィルターは、UltraFree-MC (0.45 μm , Millipore 社製) をを用いた。

3. LC-MS 及び GC-MS 分析用試料の調製

試料 (5 mg) を測りとり、内部標準物質 (lidocaine, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含有するメタノール (10 mL) を加え、10 分間超音波抽出を行った。得られた抽出液をフィルターろ過したものを LC-MS, GC-MS 分析に供した。

4. LC-MS 測定条件

[LC 条件]

装置: Waters UPLC-SQD, カラム: Atlantis HSS T3 (2.1 \times 150 mm, 1.8 μm , Waters 社製), 移動相: A = 0.1% ギ酸水溶液, B = 0.1% ギ酸 (メタノール: アセトニトリル = 1:1), グラジエント条件: A/B 95/5 (0 min)-liner gradient- 80/20 (15 min)-liner gradient-20/80 (25 min, 25 min, hold), 流速: 0.3 mL/min, 注入量: 1 μL , カラム恒温相温度: 40 $^{\circ}\text{C}$ 検出: ダイオードアレイ検出器

[MS 条件]

イオン化法: ESI 法, ポジティブモード

Capillary: 3 kV, Cone voltage: 30 V, Source temp.: 120 $^{\circ}\text{C}$, Desolvation temp.: 350 $^{\circ}\text{C}$, Cone gas flow: 50 L/hr, Desolvation Gas Flow: 650 L/hr, Scan mode mass range: m/z 50-500

5. GC-MS 測定条件

装置: Agilent 社製 6890N GC 及び 5975 MSD, カラム: HP-1MS (30 m \times 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm , Agilent 社製), キャリアーガス: He, 0.7 mL/min, 注入法: スプリットレス, 注入量: 1 μL , 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), イオン化法: EI 法, 検出器温度: 280 $^{\circ}\text{C}$, scan range: m/z 40-550.

6. NMR 分析

NMR 装置: JEOL 製 ECA-600, 測定核種: ^1H , ^{13}C , 測定溶媒: methanol- d_4 (99.96%) (ISOTEC 社製), 各種 1D 及び 2D NMR 測定を行った。

7. 成分の単離, 同定

試料 (9 g) にメタノール (1000 mL) を加え、超音波抽出を行った。得られたメタノール抽出物 (3.9 g) をアンモニア水溶液にて塩基性 (pH 10) とした後、酢酸エチル (300 mL \times 3) で溶媒分配を行った。次に、酢酸エチル可溶部 (913.1 mg) を分取 HPLC (カラム: Inertsil ODS-3, 250 mm \times 20 mm (GL Sciences), 流速: 5.0 mL/min, 移動相: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 水溶液/アセトニトリル (70:30)) に付し, Fr. 1A-1C に分画した。Fr. 1A (231.9 mg) を再度, 分取 HPLC (カラム: Inertsil ODS-3, 250 mm \times 20 mm, 流速: 5.0 mL/min, 移動相: 0.1% TFA 水溶液 / アセトニトリル (88:12)) に付し, 化合物 1 (7.7 mg), 2 (9.8 mg), 3 (8.2 mg), 4 (8.0 mg) を単離した。各化合物の化学構造は, NMR 及び高分解能 MS などの各種スペクトル分析, 及び文献値との比較により同定した。各々の化合物のスペクトルデータは, 以下の通りである。

Compound 1 (*N*-methyltyramine): ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} 2.69 (3H, s, *N*-Me), 2.87 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H_2-1), 3.18 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H_2-2), 6.76 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, $\text{H}-3'$, $5'$), 7.08 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, $\text{H}-2'$, $6'$); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} 32.5 ($\text{C}-1$), 33.7 (*N*-Me), 51.8 ($\text{C}-2$), 116.8 ($\text{C}-3'$, $5'$), 128.0 ($\text{C}-1'$), 130.8 ($\text{C}-2'$, $6'$), 157.9

(C-4'); DART-TOFMS m/z 152.1054 $[M+H]^+$ (calculated for $C_9H_{14}NO$, 152.1075).

Compound 2 ((*R*)-normacromerine): $[\alpha]_D^{20}$ -18° (c 1.0, EtOH); 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_H 2.73 (3H, s, *N*-Me), 3.15 (2H, m, H2-2), 3.82 (3H, s, OMe-4'), 3.84 (3H, s, OMe-3'), 4.87 (1H, overlapped), 6.96 (2H, br s, H-5', 6'), 7.03 (1H, br s, H-2'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C 33.6 (*N*-Me), 56.4 (OMe-3'), 56.5 (OMe-4'), 56.6 (C-2), 69.8 (C-1), 110.6 (C-2'), 112.9 (C-5'), 119.6 (C-6'), 134.8 (C-1'), 150.6 (C-4'), 150.7 (C-3'); DART-TOFMS m/z 212.1291 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{11}H_{18}NO_3$, 212.1287).

Compound 3 ((*R*)-macromerine): $[\alpha]_D^{20}$ -44° (c 2.0, ethanol); 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 2.98 (6H, s, *N*-Me), 3.07 (1H, br d, $J = 12.3$ Hz, H-2a), 3.30 (1H, br t, $J = 12.3$ Hz, H-2b), 3.88 (3H, s, OMe-4'), 3.90 (3H, s, OMe-3'), 5.12 (1H, br d, $J = 9.6$ Hz, H-1), 6.85 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.89 (1H, br d, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 6.99 (1H, br s, H-2'); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C 43.1 (*N*-Me), 45.4 (*N*-Me), 55.9 (OMe-3', 4'), 65.3 (C-2), 68.2 (C-1), 108.8 (C-2'), 111.1 (C-5'), 117.9 (C-6'), 132.2 (C-1'), 149.0 (C-4'), 149.3 (C-3'); DART-TOFMS m/z 226.1444 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{12}H_{20}NO_3$, 226.1443).

Compound 4 ((*S*)-vasicine): $[\alpha]_D^{20}$ -38° (c 0.5, $CHCl_3$); 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_H 2.11 (1H, m, H-2a), 2.65 (1H, m, H-2b), 3.67 (1H, m, H-1a), 3.75 (1H, m, H-1b), 4.80 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-8a), 4.88 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-8b), 5.11 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-3), 7.13 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.20 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-8), 7.26 (1H, br t, $J = 7.7$ Hz, H-7), 7.34 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C 30.8 (C-2), 47.5 (C-9), 51.9 (C-1), 72.5 (C-3), 118.2 (C-8a), 118.3 (C-4a), 128.3 (C-8), 128.4 (C-7), 130.5 (C-6), 132.2 (C-4a), 164.8 (C-3a); DART-TOFMS m/z 189.1024 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{11}H_{13}N_2O$

189.1028).

8. 定量分析

各化合物を, Table 1 に示す濃度範囲にメタノールで段階希釈したものをキャリブレーションスタンダードとした. また, 内部標準物質としては, lidocaine (0.5 $\mu g/mL$, final conc.) を使用した. 定量値は, 各濃度に調製した分析対象化合物と内部標準物質の擬分子イオンピーク $[M+H]^+$ のピーク面積比から検量線を作成した. なお, 各化合物の擬分子イオンピークは以下の通りである. (*R*)-normacromerine; m/z 212, (*R*)-macromerine; m/z 226, mescaline; m/z 212, harmaline; m/z 215, harmine; m/z 213, lidocaine; m/z 235.

9. DNA 塩基配列解析

試料 (20 mg) を液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen) を用い粉砕した. 粉砕した試料から, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いてゲノミックDNAを抽出した. これを鋳型として核rDNAに存在するITS領域, 葉緑体DNAの*trnL-F*, 及び*rpl16*イントロン領域の3か所をPCR増幅した. 各領域で保存性の高い配列を基にして作製された下記のプライマーを用い, PCR酵素にEx Taq (Takara) を使用してPCR反応を行った. プライマーの塩基配列及びPCR反応条件は, それぞれ以下の通りである. ITS-S, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; ITS-AS, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; trn-S, 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'; trn-AS, 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'; rpl16-S, 5'-GCTATGCTTAGTTGTTGACTCGTT-3'; rpl16-AS, 5'-CGTACCCATATTTTTCCACCACGA-3'. PCR反応条件; 95°C for 3 min, 30 cycles at 95°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 2 min, 72°C for 10 min. PCR反応溶液からポリエチレングリコールを用いて未反応のプライマー及びdNTPを除いた後, pMD20-Tベクター (Takara) にライゲーションしサブクローニングを行った. コロニーPCRにより挿入DNA断片のバン

ドを確認後、BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI)を用いて、塩基配列を決定した。得られた塩基配列について、DDBJ/EMBL/GenBank BLAST検索を用い植物種を同定した。

C. 研究結果

1. 製品の LC-MS, GC-MS 分析

試料のメタノール抽出物について LC-MS 分析を行ったところ、トータルイオンクロマトグラム (TIC)において、2.1, 3.7, 4.1, 4.3, 8.4, 17.1, 17.7 分 (保持時間) に 7 種のピーク (peak 1-7) が認められた (Fig. 2)。これらのうち、peak 5-7 は、各々の標品と UV スペクトル、保持時間、及びマススペクトルの比較によりそれぞれ、mescaline (5), harmaline (6), harmine (7) と同定した (Fig. 1)。次に、同試料について、GC-MS 分析を行った。Fig. 3 に示すように、TIC において保持時間 22.5 分に主要なピーク (Peak 3) が認められた。本ピークは、マススペクトルにおいて、 m/z (% relative intensity) 225 (0.9), 207 (8.1), 192 (7.8), 58 (100) にイオンピークが観察された。

2. 未知ピークの単離, 同定, 及び定量分析

LC-MS 分析で検出された未知ピーク (peak 1-4) の化学構造を明らかにするために、これら成分の単離を試みた。本製品のメタノール抽出物について、上述の方法に従い分画を繰り返す行い、4 種の化合物 (1-4) を単離した。各化合物は、各種スペクトル分析、及び文献値との比較により、それぞれ、*N*-methyltyramine (1), (*R*)-normacromerine (2), (*R*)-macromerine (3), (*S*)-vasicine (4) と同定した²⁻⁵⁾ (Fig. 1)。このうち、化合物 2 及び 3 は、動物実験において、向精神作用を示すことが報告されている^{3, 4)}。更に、製品から検出された成分のうち、向精神活性が疑われる化合物 (2, 3, 5, 6, 7) について、製品中での含有量を明らかにするため、LC-MS を用いて定量分析を行った。Table 1 に示すように、各分

析対象化合物の直線式は、当該濃度範囲において良好な直線性 ($R^2 > 0.990$) を示した。得られた検量線から算出した試料中の成分含量は、それぞれ、5.3, 1.8, 0.8, 5.8, 2.1 mg/g product であった。

3. 含有植物細片の同定

植物の鑑別、同定に多く用いられる *trnL-F*、及び ITS 領域を標的に PCR 増幅し、これらの塩基配列を国際塩基配列データベースに登録されている配列と比較した。製品に含まれる植物細片から DNA を抽出し、上記の領域について PCR 増幅を行った。得られた塩基配列について相同性検索を行ったところ、*trnL-F* 及び ITS 領域の両領域において、*Pegunum harmala*, *Turnera diffusa* と高い相同性を示す配列が検出された。一方、製品から検出された 7 種の化学成分のうち、フェネチルアミン化合物 2 及び 3 は、主に *Coryphantha* 属植物 (サボテン科) の含有成分として単離されている^{3, 4)}。しかし、*Coryphantha* 属植物については、*trnL-F*、ITS 領域の塩基配列がデータベースには報告されていないため、*Coryphantha* 属植物 (*C. elephantidens* (accession no. AY545231), *C. pallida* (AY545232), *C. durangensis* (AY545230)) の 3 種で報告されている *rpl16* イントロン配列と相同性検索を行った⁶⁾。その結果、Fig. 4 に示すように、製品から得られた DNA 増幅断片と上記 3 種の *Coryphantha* 属植物の間には、高い相同性は認められなかった (85%以下)。次に、*Coryphantha* 属植物で入手が可能であった *C. macromeris* (和名: 大分丸) について同様に、*rpl16* イントロン配列を比較したところ、非常に高い相同性 (99%) が認められた。以上のことから、本製品には、*P. harmala*, *T. diffusa* の他に、幻覚性サボテンとして知られている *C. macromeris* が含まれていることが強く示唆された。

D. 考察

本製品に含まれる植物細片の DNA 塩基配列

解析から、少なくとも3種の植物種 (*P. harmala*, *T. diffusa*, *C. macromeris*) が存在することが示唆された。一方、成分分析より明らかとなった7種の化学成分は、化合物1, 2, 3は *C. macromeris*, 化合物4, 6, 7は *P. harmala* に由来する天然成分であると考えられる。また、化合物6及び7はモノアミンオキシダーゼ (MAO)阻害作用を示すため、2,3,5との同時摂取により、幻覚効果が高められる可能性がある。更に、麻薬成分である化合物5が、製品から微量検出されたが、その基原植物と考えられる peyote (*Lophophora williamsii*) または San pedro (*Trichocereus pachanoi*) に由来するDNA断片は検出されなかった。このため、上記サボテンの植物片を混入しているのではなく、抽出エキス等を添加している可能性が示唆された。また、DNA塩基配列解析により明らかとなった *T. diffusa* は、違法ドラッグ市場において、向精神活性を意図して汎用されているが、その化学成分については不明な点が多い。本植物については、更なる検討が必要である。

以上のように、本製品から検出された化学成分とDNA塩基配列解析の結果は、概ね良好な相関性が認められた。本製品は、向精神作用等を期待して、幻覚性サボテン (*C. macromeris*) の植物片を混入させたと考えられるが、違法ドラッグ市場では初めての検出事例である。

E. 結論

違法ドラッグ市場に流通している製品の成分分析、及びDNA塩基配列解析を行った。化学成分としては、幻覚性フェネチルアミン化合物 (*R*)-normacromerine (2), (*R*)-macromerine (3), 麻薬成分である mescaline (5) など7種の化合物が検出された。一方、DNA塩基配列解析の結果、違法ドラッグ市場において汎用される植物 (*P. harmala*, *T. diffusa*) に加え、幻覚性サボテンとして知られている *C. macromeris* が含まれることが明らかになった。

このように、種として法規制の対象とならない、新たな植物系違法ドラッグの流通拡大が危惧されるため、継続して監視を強化していく必要がある。

F. 参考文献

- 1) Ono M, Shimamine M, Takahashi K, *Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci.* 91, 33-35 (1976).
- 2) Sato H, Sakamura S, Obata Y, *Agr. Biol. Chem.* 34, 1254-1255 (1970).
- 3) Keller W, *J. Pharm. Sci.* 61, 147-148 (1972).
- 4) Hodgkins JE, Brown SD, Massingill JL, *Tetrahedron Lett.* 14, 1321-1324 (1967).
- 5) Joshi BS, Newton MG, Lee DW, Barber AD, Pelletier, SW, *Tetrahedron: Asymmetry*, 7, 25-28 (1996).
- 6) Butterworth CA, Wallace RS, *Am. J. Bot.* 91, 1086-1098 (2004).

F. 研究発表

1. 論文発表

Kikuchi H., Uchiyama N., Ogata J., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Chemical constituents and DNA sequence analysis of a psychotropic herbal product. *Forensic Toxicology*, accepted (2010).

2. 学会発表

菊地博之, 内山奈穂子, 緒方潤, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 植物系違法ドラッグ製品の成分分析及び植物種の遺伝子解析, 日本生薬学会第56回年会.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

H. 特許取得

特になし

I. 実用新案登録

特になし

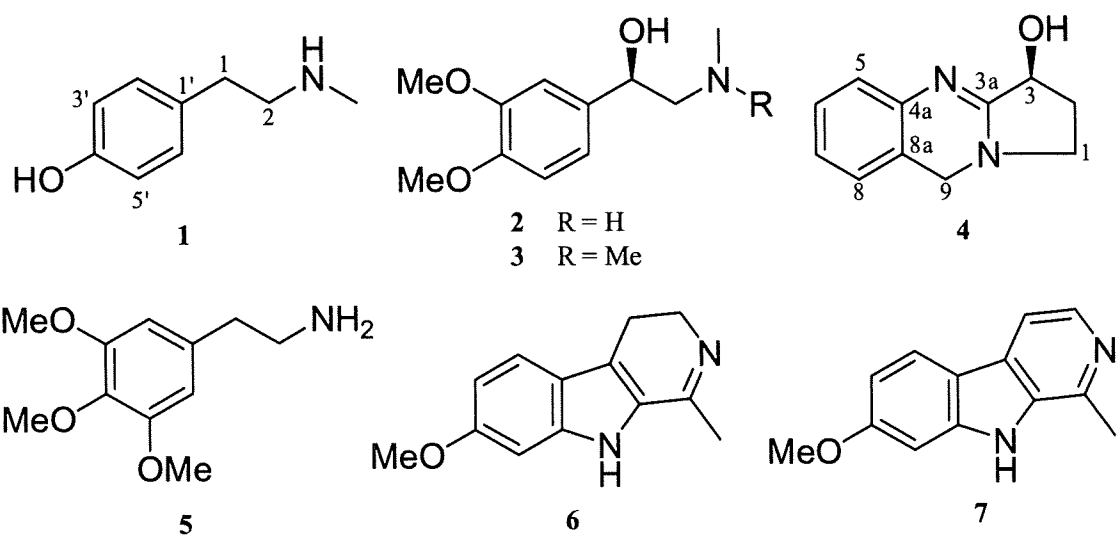


Fig. 1 Chemical structures of compounds detected in the herbal product.

1, *N*-methyltyramine; **2**, (*R*)-normacromerine; **3**, (*R*)-macromerine; **4**, (*S*)-vasicine; **5**, mescaline; **6**, harmaline; **7**, harmine

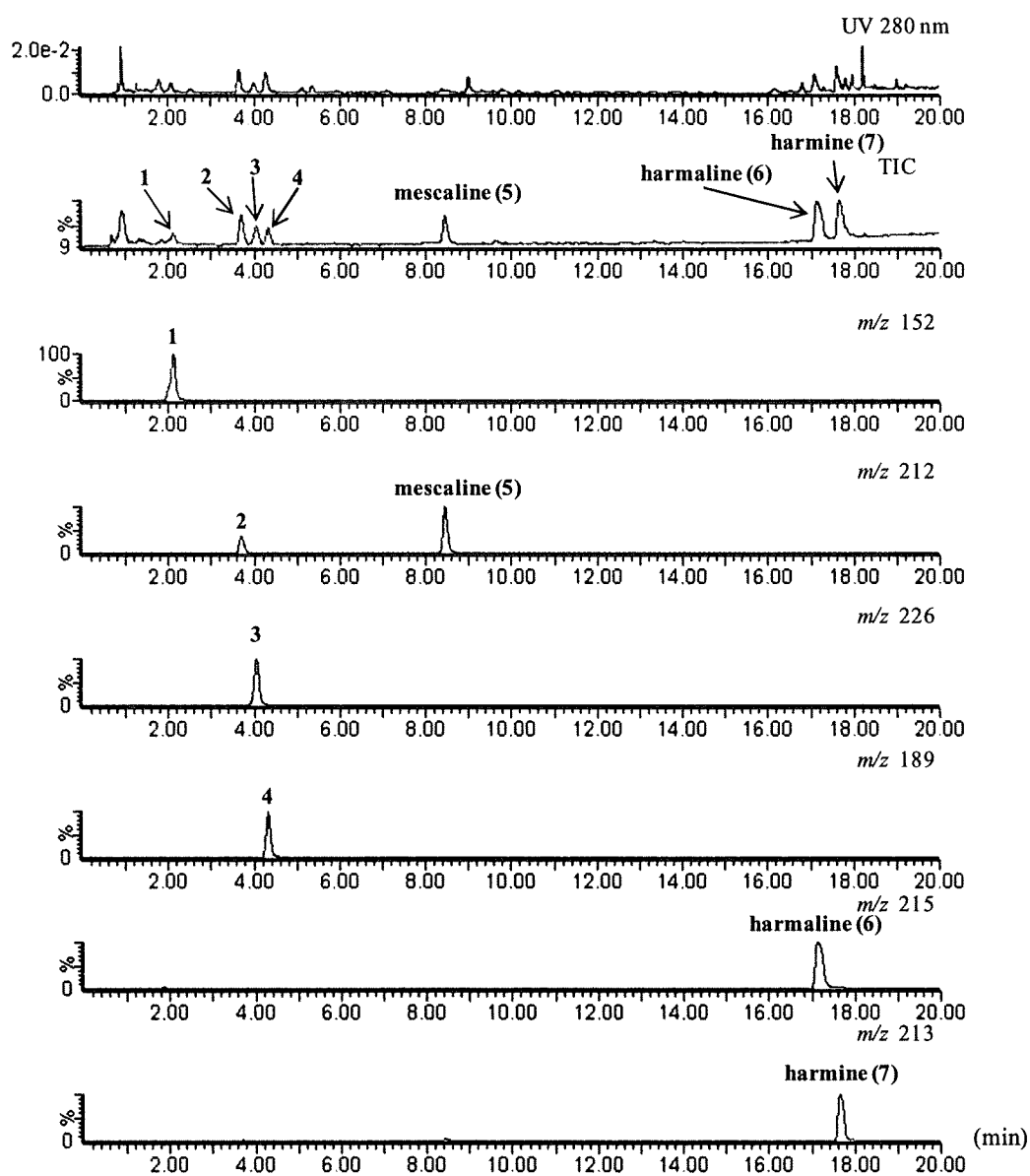


Fig. 2 Ultraviolet UPLC chromatogram, total ion chromatogram (TIC) and mass chromatograms of the methanol extract from the plant sample. The peaks at m/z 212, 215 and 213 were identified as the $[M+H]^+$ ions of mescaline (5), harmaline (6) and harmine (7) in comparison with each authentic standard. The peaks at m/z 152, 212, 226 and 189 were also identified as compounds 1-4, respectively, which were identified by various methods without authentic standards.

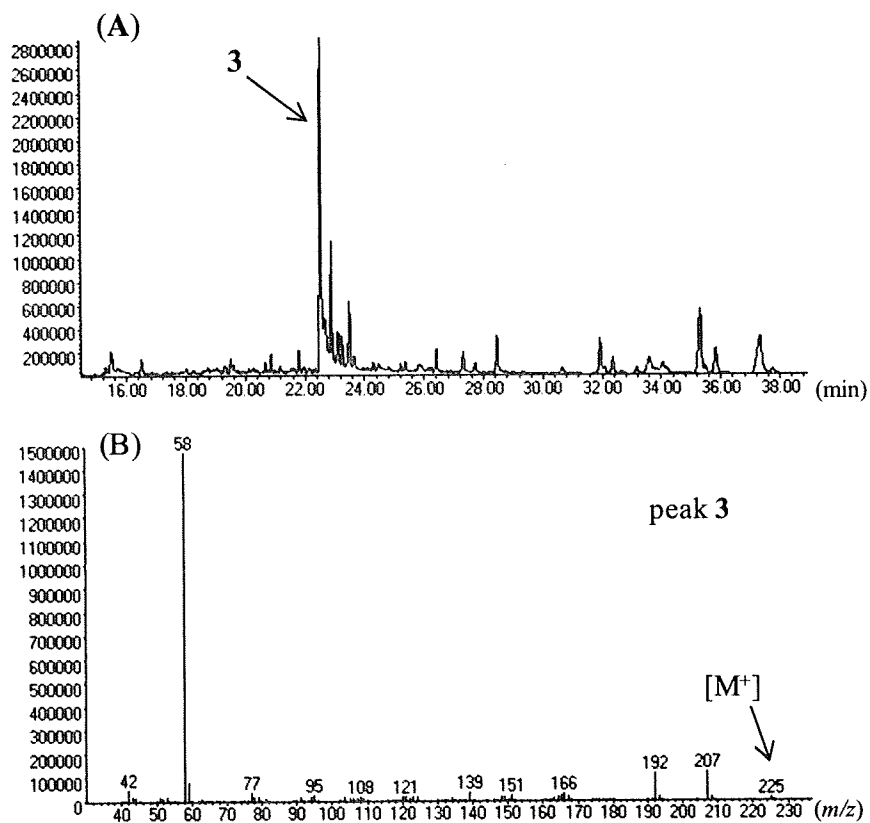


Fig. 3 GC-MS analysis of the methanol extract from the plant sample.

(A) TIC of 10 mg/ml of the sample solution; (B) Mass spectrum of the peak detected at 22.5 min

Herbal product	320:ATCCTAATGA TTCATTGGAA AGGATGGCGG AAAGAACCAA AGACCTAATT ATCTATTCTG AAAAGTGATA AACTAATCCT	399
<i>C. macromeris</i>	320:.....	396
<i>C. durangensis</i>	321:.....	400
<i>C. elephantidens</i>	320:.....	399
<i>C. pallida</i>	320:.....	399
Herbal product	400:ATAAACTGA AATAGATATA GAAAGAGTAA ATATTCGCTC GCGAAAAATC CTTTTTATTI GGATTGCTCT TATTTAATTC	479
<i>C. macromeris</i>	397:.....	476
<i>C. durangensis</i>	401:.....	480
<i>C. elephantidens</i>	400:.....	479
<i>C. pallida</i>	400:.....	479
Herbal product	480:TAGCAATGCA ATCTAAATAA ATATATCTAT ACAAATAAAA AATAAAAAAT ACAAATTAAT TCGATTCTAA TTAGA-ATTC	558
<i>C. macromeris</i>	477:.....	555
<i>C. durangensis</i>	481:.....	558
<i>C. elephantidens</i>	480:.....	555
<i>C. pallida</i>	480:.....	555
Herbal product	559:AATTCTAAA TATTCATATT CA-----	580
<i>C. macromeris</i>	556:.....	577
<i>C. durangensis</i>	559:TGA.GAAT.T C.AGG.ATC. ATTGATTAG TGTAT-TATT ACATGTATAT CTTAATTCAA TATTATTATT TTATTCATTT	637
<i>C. elephantidens</i>	556:T...GA.T-- ---T.GTG. ATT-ATTACA TGTATATCTT AATTCATAT TATTATTTTA T-TCAITTTG AAAITTTAT--	625
<i>C. pallida</i>	556:T...GA.T-- ---T.GTG. ATT-ATTACA TGTATATCTT AATTCATAT TATTATTTTA T-TCAITTTG AAAITTTAT--	625
Herbal product	580:-----	580
<i>C. macromeris</i>	577:-----	577
<i>C. durangensis</i>	638:TGAAATTTAT GATATATTA TCCATAAATG AATTTCAAAT TCGATTCTAA TTAGAATPCA ATTTCTAAAT ATTCATATTC	717
<i>C. elephantidens</i>	626:-GATATAT-T AATCCATAAA TGAATT--TC GAATTCGATT CTAATTCGAA TTCAATTTCT AAATAITTCAT ATTCA-----	696
<i>C. pallida</i>	626:-GATATAT-T AATCCATAAA TGAATT--TC GAATTCGATT CTAATTCGAA TTCAATTTCT AAATAITTCAT ATTCA-----	696
Herbal product	581:-ATAAAAATT TCAATTTTTT CATTGCGAG GAGCCGATG AGAAGAAACT CTCATGTCCG GTTCTGTAAT AGAGATGGAA	659
<i>C. macromeris</i>	578:.....	656
<i>C. durangensis</i>	718:A..C.....GA.....	797
<i>C. elephantidens</i>	697:.....GAG.....	775
<i>C. pallida</i>	697:.....GAG.....	775

Fig. 4 Multiple alignments of *rpl16* intron sequences from the herbal product and the plants of *Coryphantha* species. Identical sequences are indicated by (·); gaps (-) are introduced to obtain maximum similarity.

Table 1 Parameters of the calibration curves and the contents for the five targeted compounds in the product

Compound	Range (µg/ml)	Equation	Correlation coefficient (r^2)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Content (mg/product)
(R)-Normacromerine (2)	0.05 - 10	$y = 0.0256x - 0.0017$	0.998	0.5	1.0	5.3
(R)-Macromerine (3)	0.05 - 10	$y = 0.0724x + 0.0037$	0.991	0.5	1.0	1.8
Mescaline (5)	0.05 - 10	$y = 0.2847x - 0.0017$	0.995	0.1	0.1	0.8
Harmaline (6)	0.05 - 10	$y = 0.5838x + 0.0258$	0.997	0.05	0.1	5.8
Harmine (7)	0.05 - 5.0	$y = 1.2613x + 0.0234$	0.998	0.05	0.05	2.1

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) correspond to concentrations giving signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively

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

—4-メチルメカチノンの*in vitro*モノアミン神経伝達系への影響—

研究協力者:蜂須賀暁子 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 室長

研究要旨:活性未知の新規流通違法ドラッグ成分 4-メチルメカチノンについて,ラット脳線条体及び大脳皮質から粗シナプトゾームを調製し,前シナプス側におけるモノアミン(ドパミン,セロトニン,ノルエピネフリン)の再取り込み阻害及び遊離促進活性を測定し,*in vitro*モノアミン神経伝達系への影響を検討した.検討の結果,構造類似化合物メタンフェタミン(覚せい剤)及びメカチノン(麻薬)と同様に,4-メチルメカチノンに前シナプス側でのドパミン,セロトニン,ノルエピネフリンの再取り込み阻害及び遊離促進活性が認められた.以上の結果より,4-メチルメカチノンは,中枢作用を有する蓋然性が高い化合物であることが明らかとなった.

A. 研究目的

我々は,活性未知の違法ドラッグ成分について,トリプタミン系化合物や2,5-ジメキシフェネチルアミン系幻覚剤等の標的となるセロトニン受容体,モルヒネやサルビノリン A 等の標的となるオピオイド受容体,大麻成分等の標的となるカンナビノイド受容体等の G タンパク質結合受容体(G protein coupled receptors, GPCRs)に着目して,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,各化合物の GPCRs 活性の特性を検討している.そして,違法ドラッグ成分の GPCRs を介した中枢活性について,網羅的に評価している.しかし,本アッセイ法は,モノアミントランスポーターが関与すると考えられる覚せい剤を代表としたフェネチルアミン系興奮剤については適用できない.

本研究では,ラット脳線条体及び大脳皮質から粗シナプトゾームを調製し,活性未知の新規流通違法ドラッグ成分 4-メチルメカチノンについて,

前シナプス側におけるモノアミン(ドパミン:DA,セロトニン:5HT,ノルエピネフリン:NE)の再取り込み阻害及び遊離促進活性を測定し,*in vitro*モノアミン神経伝達系への影響を検討した.また,測定結果を,構造類似化合物メタンフェタミン(覚せい剤)及びメカチノン(麻薬)の結果と比較した.

B. 研究方法

1. 薬物

試験対象薬物:4-メチルメカチノン塩酸塩

陽性対照薬物:メタンフェタミン塩酸塩(覚せい剤),メカチノン塩酸塩(麻薬)

2. 実験動物

日本エスエルシーより購入した SD ラット(♂,10週齢)を実験に供した.

3. *in vitro*モノアミン神経伝達物質の測定

①再取り込み阻害実験

ラット脳の線条体(DA)及び皮質(5HT, NE)から粗シナプトゾームを調製した. ついで 96 ウエルプレート中で,種々の濃度の試験対象薬物(4-