

メチルメトカチノン)または陽性対照薬物(メタンフェタミン, メトカチノン)を含む溶液中で, これらのシナプトゾームと³H 標識モノアミン(DA, 5HT または NE)とを, 37°Cで反応した. 急速吸引ろ過により反応を停止すると共に, 取り込んだ³Hモノアミンをガラスフィルターに回収して, 洗浄後, 液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し, 非特異的取り込み量を差し引き, 薬物を含まない時の取り込み量を 100%とした. 各薬物濃度について得られた結果より, 再取り込み阻害曲線を作成し, 50%取り込み阻害濃度(IC₅₀ 値)を求めた. (参考文献 1)-3))

②遊離促進実験

粗シナプトゾームの調製は①と同様に実施した. シナプトゾームに³H 標識各モノアミンを 25°Cで定常状態になるまで取り込ませた後, 96 ウエルプレート中で, 薬物を加えて, 一定時間遊離反応を行った. 次に, 急速ろ過・洗浄後, ろ紙上の放射活性を測定した. 非特異的取り込み量を差し引き, 各薬物濃度での結果から遊離促進曲線を作成した. (参考文献 1)-3))

(倫理面の配慮)

動物実験は, 国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による倫理審査の承認を経て, 当所動物管理室の協力を得て, 動物福祉・愛護の精神に基づいて, 適切な実験計画及び適正な実験手技のもとで実施した.

C. 研究結果・考察

①再取り込み阻害実験

4-メチルメトカチノンは, DA, 5HT 及び NE の再取り込みをいずれも阻害し, IC₅₀ 値はそれぞれ 8.1×10^{-7} M, 2.9×10^{-6} M 及び 4.1×10^{-7} M であった.

構造類似化合物メタンフェタミン(覚せい剤)及びメトカチノン(麻薬)の測定結果と比較すると, 4-メチルメトカチノンは, DA 及び NE に対して, これら規制化合物と同様の再取り込み阻害作用を示した. メタンフェタミンの DA 及び NE に対する IC₅₀ 値は, それぞれ 1.6×10^{-7} M 及び 6.0×10^{-8} M で

あり, 4-メチルメトカチノンよりも 5~7 倍強い阻害を示したが, メトカチノンの IC₅₀ 値はそれぞれ 5.3×10^{-7} M 及び 3.0×10^{-7} M となり, 4-メチルメトカチノンと同程度であった. 一方, 5HT に対しては, 4-メチルメトカチノンは, メタンフェタミン(8.7×10^{-6} M) より 3 倍, メトカチノン(6.6×10^{-5} M) よりも約 23 倍強い阻害活性を示した.

②遊離促進実験

4-メチルメトカチノンは, 構造類似化合物メタンフェタミン(覚せい剤)及びメトカチノン(麻薬)と同様に DA 及び NE の遊離作用を促進した. 5HT に対しては, メタンフェタミン及びメトカチノンよりもやや強い遊離促進作用が認められた.

D. 結論

ラット脳シナプスゾームを用いて 4-メチルメトカチノンのモノアミン神経伝達系に対する影響を *in vitro* 試験法により検討した結果, 前シナプス側での DA, 5HT, NE 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-メチルメトカチノンは, 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.

E. 参考文献

- 1) R. B. Rothman *et. al.*, *European journal of Pharmacology*, 479 (2003) 23-40.
- 2) R. B. Rothman *et. al.*, *Life Sciences*, 78 (2005) 512-518.
- 3) F. Nagai *et. al.*, *European journal of Pharmacology*, 559 (2007) 132-137.

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

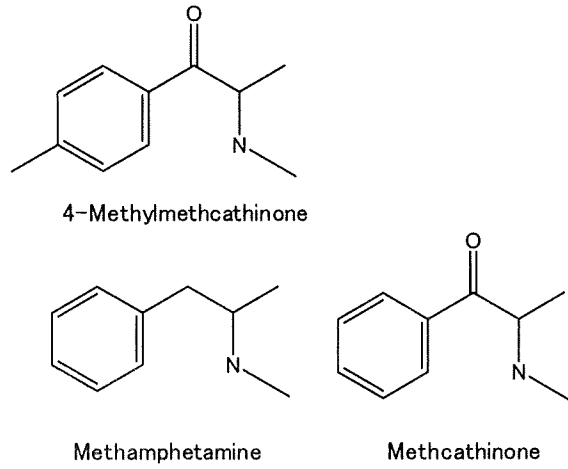


図1 実験に使用した薬物の構造

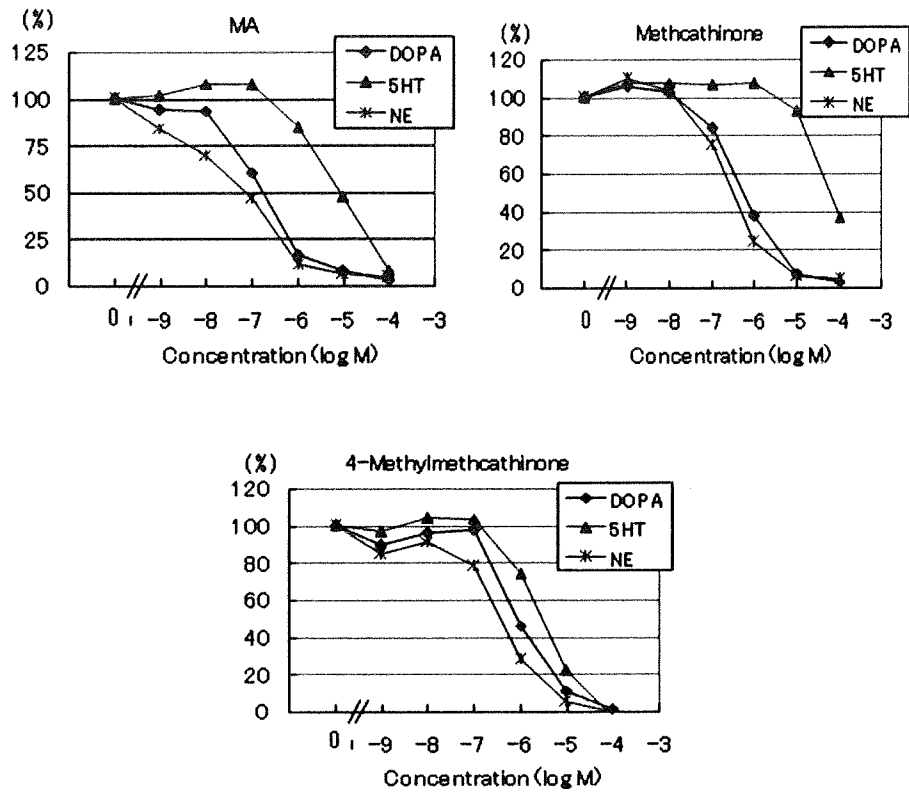


図2 メタンフェタミン(MA), メカチノン及び4-メチルメカチノンによるモノアミン神経伝達物質の再取り込み阻害(n=3)

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

—違法ドラッグ製品から大麻由来成分を検出した事例について—

研究要旨:違法ドラッグ市場に流通する新規違法ドラッグ成分の調査を目的として,インターネット上で代表的な違法ドラッグ販売サイトから代表的な製品を購入し,成分分析を行った.その結果,1製品から,合成カンナビノイドであるカンナビシクロヘキサノール(平成21年11月20日より新規に指定薬物として規制)と共に,大麻(もしくはその加工品)の含有が認められた.本分析結果は,向精神活性を標榜して販売される植物系違法ドラッグ製品から実際の大麻が検出されたはじめての事例であった.

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 主任研究官

緒方 潤

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

河村 麻衣子

国立医薬品食品衛生研究所生薬部

菊地博之

国立医薬品食品衛生研究所生薬部

麻様作用を標榜して販売されていた植物系違法ドラッグ製品(いわゆる「スパイス」関連製品)の成分分析を行い,世界に先駆けて,高活性の合成カンナビノイド *cannabicyclohexanol* が違法ドラッグ製品に含有されていることを明らかにした^{1),2)}.また,関連製品の流通実態調査を行い,その他成分の同定及び合成カンナビノイド含有量調査を行ってきた^{3),4)}.これらの結果は,指定薬物部会において,候補化合物を指定薬物に指定するための判断根拠となる科学的データとして提示され,平成21年11月より,合成カンナビノイド3化合物を含む6化合物が新たに指定薬物に指定され規制された.

今回,これら一連の「スパイス」関連製品流通実態調査を行う過程で,1製品から実際に大麻取締法で厳しく規制される大麻(もしくはその加工品)が検出されたので報告する.

A. 研究目的

指定薬物制度制定後,現在(平成22年3月)45化合物1植物が指定薬物として規制されており,違法ドラッグ販売数は表面上激減した.しかし一方で,近年,医薬品開発途上でメディシナルケミストリーによって大量に誕生した特定の受容体に対し高い活性を有する化合物が,違法ドラッグ市場に新たに登場している.これら化合物の中には,カンナビノイド受容体に強い活性を示す合成カンナビノイドアナログや内因性カンナビノイドのように,既存の違法ドラッグと構造や活性が全く異なるものも存在し,現場に混乱を来している.

我々は昨年度の本研究班報告書において,大

B. 研究方法

1) 試料

購入製品:2009年5月下旬にインターネットを通じて購入.3g入り5袋

製品形態:密封された袋(アルミシール)内に,図

1 に示した通り、数種類の乾燥植物細片の混合物が入っていた。

Web 上記載内容:「すぐ来る刺激系アッパーが長く続くイメージのお香です。皮膚感覚も敏感になり、エロ系ラブに最適。ケミカル一切なしのオールナチュラルでこの強さだと、お値段もそれなりに上がってくるのですが、日ごろの感謝をこめてお客様にできるだけお安くご提供させて頂きました。エロ系ブースターとしてダミアナとミックスして焚いてもよい感じになりますのでお勧めです！」

2) 分析法

抽出操作

製品 10 mg を粉末状にし、メタノール 1 mL を加えて 10 分間超音波下抽出を行った。抽出物を遠心分離 (5 min, 3000 rpm) した後、膜ろ過を行い (Ultrafree-MC, 0.45 μm filter unit, Millipore), 測定試料とした。

GC-MS 分析

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

注入口温度: 200°C, スプリットレス, 検出器温度: 280°C, イオン化法: EI

カラム温度: 80°C (1 min hold) $-$ 5°C/min $-$ 190°C (15 min hold) $-$ 10°C/min $-$ 310°C (5 min hold)

LC-MS 分析

カラム: Atlantis HSS T3 (2.1 i.d. \times 100 mm, 1.8 μm , Waters 社製) 及び Van Guard column (2.1 i.d. \times 5 mm, 1.8 μm , Waters 社製)

移動相: A 0.1%ギ酸水溶液, B 0.1%ギ酸 アセトニトリル/メタノール (1:1)

A:B 95:5 $-$ 80:20 (15min) $-$ 20:80 (25 $-$ 50min)

流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C,

注入量: 1 μL

検出: ダイオードアレイ検出器及び質量検出器
質量分析条件

イオン化: ESI法, ポジティブ及びネガティブモード

Capillary: 3 kV, Cone voltage: 20 V, Source temp.: 120°C, Desolvation Temp.: 400°C,

Cone Gas Flow: 50 L/hr, Desolvation Gas Flow: 800 L/hr, Scan mode mass range: m/z 50-400

C. 研究結果・考察

購入製品の内容物 (植物細片) について、メタノール抽出物を GC-MS により成分分析した。その結果、合成カンナビノイドである

cannabicyclohexanol (平成 21 年 11 月 20 日より新規に指定薬物として規制) と共に、大麻由来活性成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) 及び cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) の含有が認められた (図 2)。そこで、LC-MS により改めて分析を行ったところ、LC-MS 分析においても、これら成分の含有が認められた。これらのピークは、 Δ^9 -THC, CBD 及び CBN の分析用標準化合物との保持時間及びマススペクトル, UV スペクトルの一致をもって確認した。GC-MS 測定結果を図 3 に、LC-MS 測定結果を図 4 に示した。なお、本報告書には検出の詳細を示さないが、その他成分として、本製品から、macromerine, normacromerine, mescaline (Peyote (*Lophophora williamsii*), San pedro (*Trichocereus pachanoi*) 等のサボテンに含有される幻覚性を示す麻薬成分), harmine, harmaline (*Peganum harmala* 等の植物に含有されるモノアミノキシダーゼ阻害活性を示す成分) が検出された (図 2)。Macromerine, normacromerine は、*Lepidocoryphantha* 属等のサボテンに含有される幻覚性を示すフェネチルアミン系化合物である⁴⁾。Peyote や San pedro 等のサボテンに含有される代表的なフェネチルアミン系幻覚薬 mescaline よりも作用は低いが、モノアミノキシダーゼ阻害活性を示す harmine, harmaline と同時摂取することにより、作用が増長することが懸念される。なお、本製品から検出された上記化合物の各定量分析結果詳細については、別途報告した⁵⁾。

一方、本製品に含有されている植物細片混合

物について、遺伝子分析を行うと共に、顕微鏡試験における形態学的な特徴を調査した。その結果、植物細片混合物の一部（主に植物片を含む黒色の樹脂状塊）より、大麻取締法で規制される *Cannabis sativa* L.と推定される遺伝子断片が検出された。また、大麻の剛毛の可能性が考えられる組織が観察された。これら遺伝子分析及び顕微鏡試験の詳細は、本研究報告書「植物系違法ドラッグ製品いわゆる“ブレンドハーブ”の基原植物について」(緒方潤)に記載した⁶⁾。

D. 結論

違法ドラッグ市場に流通する新規違法ドラッグ成分の調査を目的として、インターネットで代表的な違法ドラッグ販売サイトから製品を購入し、成分分析、植物細片混合物の遺伝子分析及び形態観察を行った。その結果、1 製品から大麻もしくはその加工品が検出された。本結果は、向精神性を標榜して販売される植物系違法ドラッグ製品から、実際の大麻が検出されたはじめての事例であった。

E. 参考文献

- 1) N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, N. Kawahara, Y. Haishima, Y. Goda, Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product. *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 57, 439-441.
- 2) N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, N. Kawahara, Y. Goda, Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product. *Forensic Toxicol.* 2009, 27, 61-66.
- 3) N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, J. Ogata, Y. Goda, Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci. Int.*, 2010, in press.
- 4) H. Kikuchi, N. Uchiyama, J. Ogata, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda, Chemical constituents

and DNA sequence analysis of a psychotropic herbal product. *Forensic Toxicology*, 2010, in press.

5) 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「乱用薬物の分析・同定に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「違法ドラッグ製品から検出された大麻成分及び合成カンナビノイド等の分析」(菊地博之)

6) 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「植物系違法ドラッグ製品いわゆる“ブレンドハーブ”の基原植物について」(緒方潤)

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 購入製品の内容物

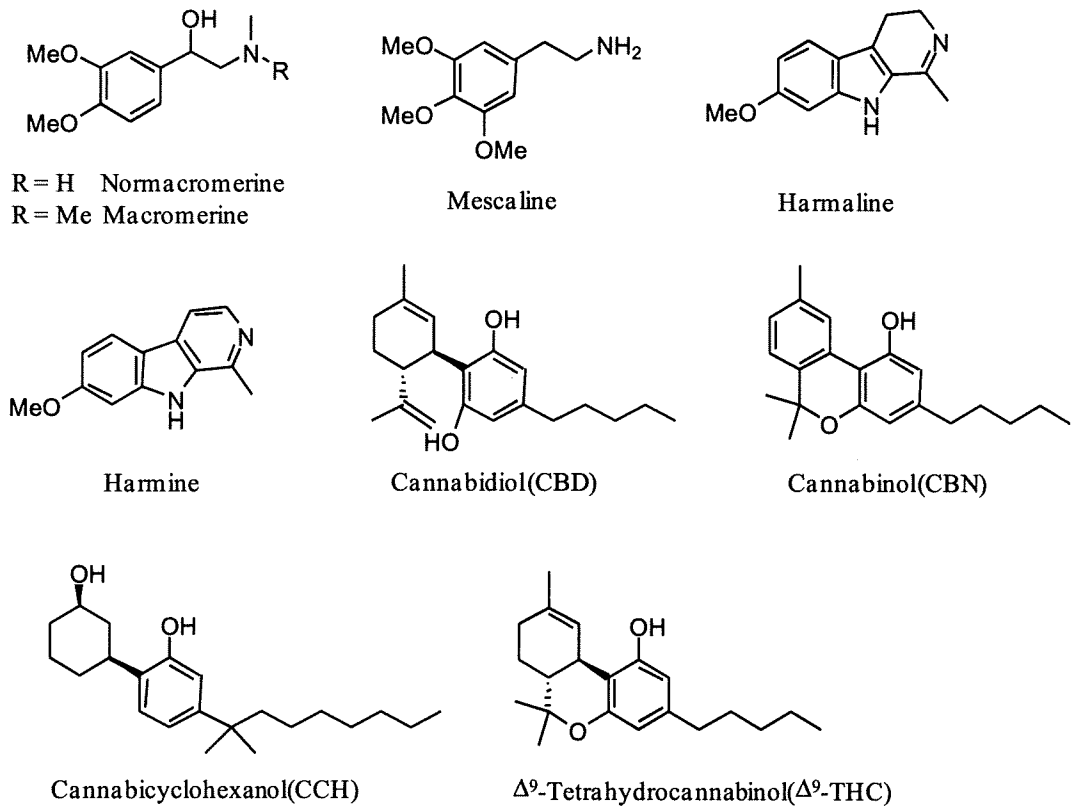


図2 検出化合物の化学構造

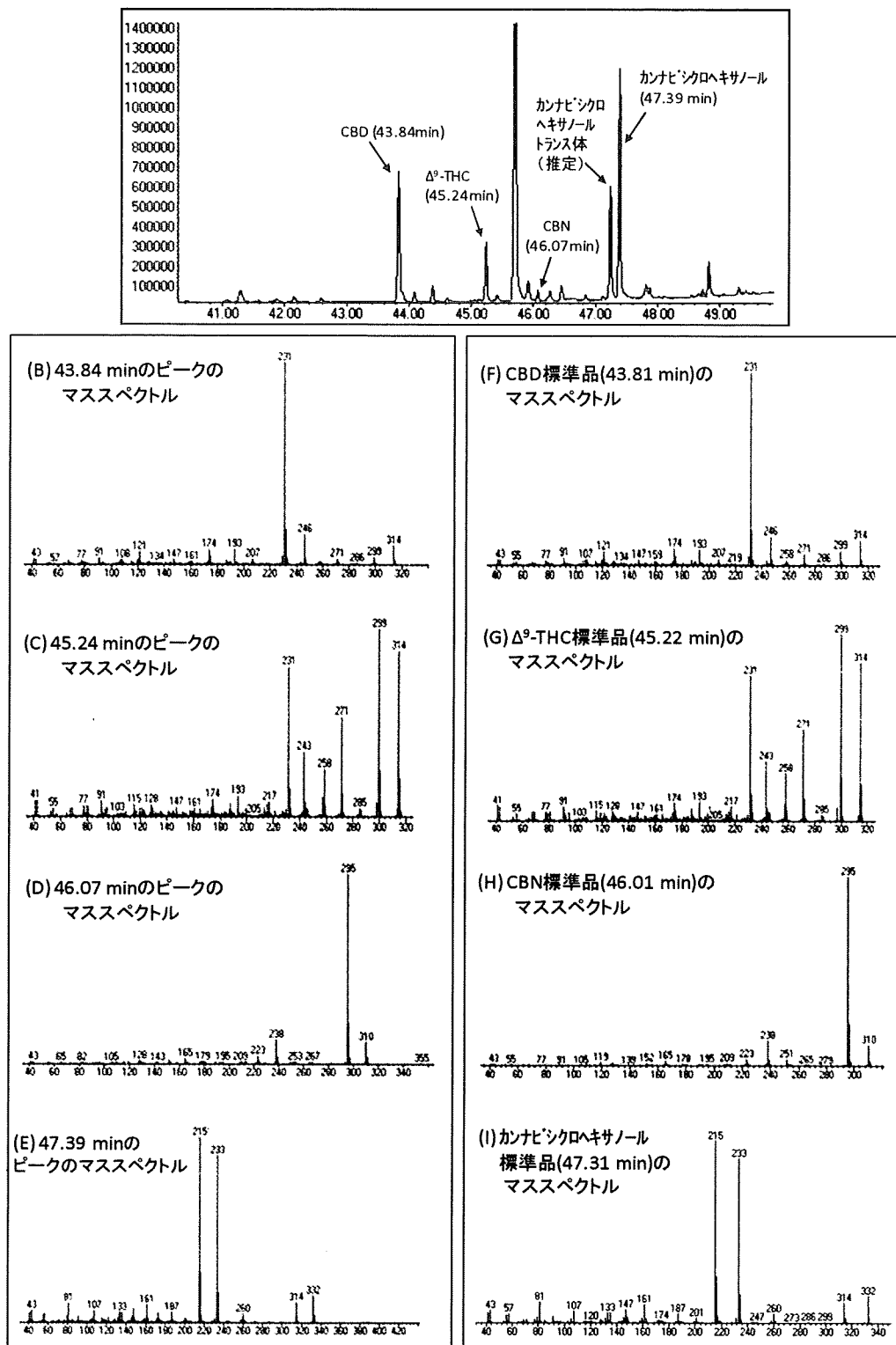


図3 製品のメタノール抽出物のGC-MS測定結果及び各分析用標準品のマススペクトル

(A);製品のメタノール抽出物のGC-MSトータルイオンクロマトグラム, (B)-(E);各ピークのマスペクトル, (F)-(I);CBD, Δ^9 -THC, CBN, カンナビシクロヘキサノールの各分析用標準品の保持時間とマスペクトル
 *45.71minに検出されたピークは *Angelica gigas* (オニノタケ, 韓当帰)等に含有される植物成分デクルシン(decursin)の異性体と推測された。

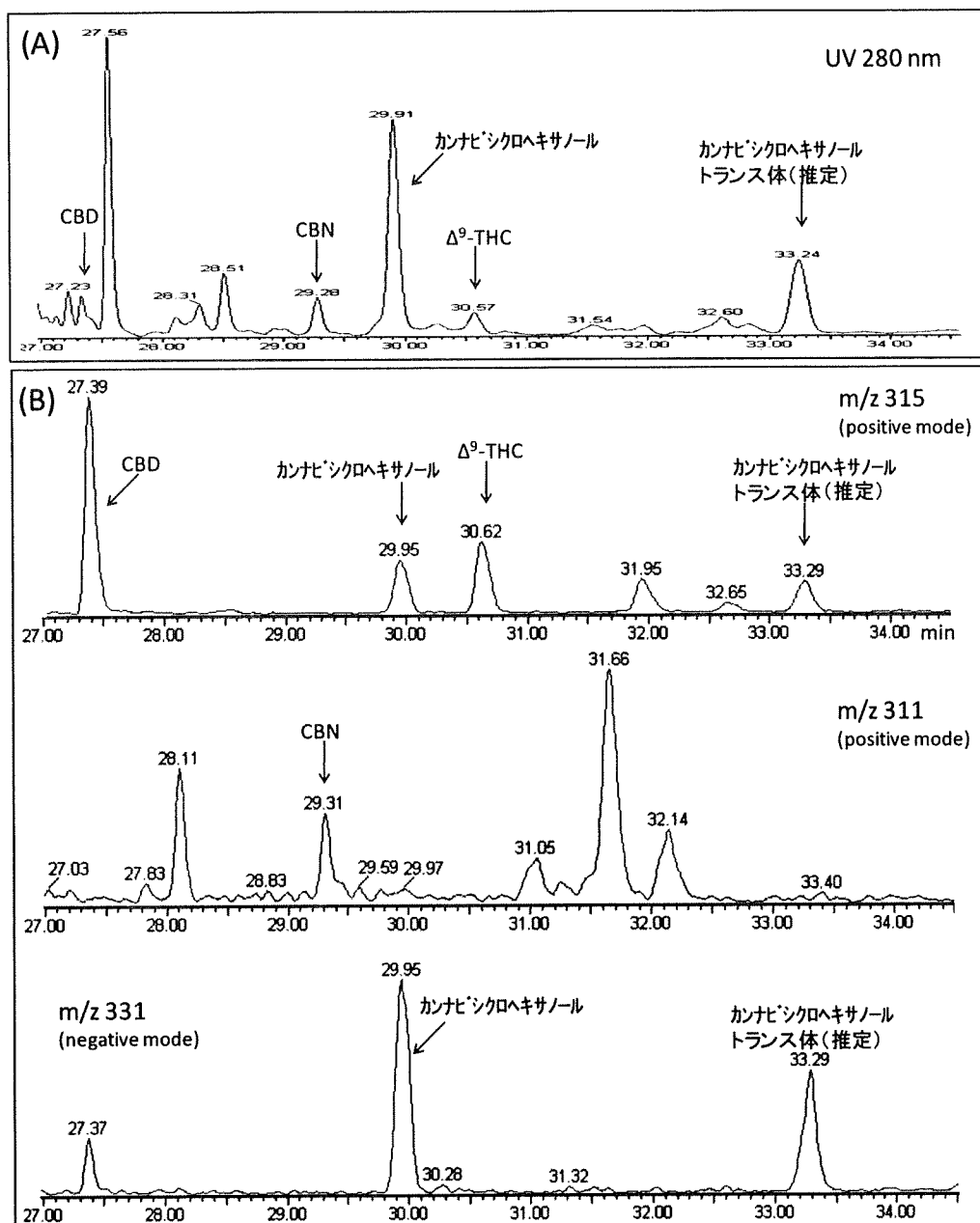


図 4 製品のメタノール抽出物の LC-MS 測定結果

(A) UV280 nm におけるクロマトグラム

(B) m/z 315 (Δ^9 -THC, CBD の $[M+H]^+$ 及びカンナビシクロヘキサノールの $[M+H-H_2O]^+$ に相当), m/z 311 (CBN の $[M+H]^+$ に相当) 及び m/z 331 (カンナビシクロヘキサノールの $[M-H]^-$ に相当) のマスクロマトグラム

* 各ピークは, Δ^9 -THC, CBD, CBN 及びカンナビシクロヘキサノールの分析用標品との保持時間及び UV, マススペクトルの一致により確認した。

分担研究課題:違法ドラッグの分析に関する研究

研究分担者 豊岡 利正 静岡県立大学 教授

—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—

研究協力者 関 俊哲 静岡県立大学 助教

研究要旨: 近年, 麻薬・覚せい剤類の代用として, 違法ドラッグが乱用され, 大きな社会問題になっている. 厚生労働省では違法ドラッグの流通・乱用実態に即した迅速な規制を行うため, 平成 19 年 4 月にフェネチルアミン系及びピペラジン系薬物など 32 品目を「指定薬物」と指定した. 現在, 46 品目が「指定薬物」として規制されている. これまで我々は, フェネチルアミン系指定薬物の UFLC-FL 法, 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を開発してきたが, 生体試料への適用では, 内因性物質の妨害により分離が困難で, 分析時間が長いなどの問題点があった. そこで本研究では, 生体試料に適用可能な迅速かつ高感度なスクリーニング法の開発を目的とし, フェネチルアミン系及びピペラジン系指定薬物 16 種類について UPLC-ESI-TOF-MS 法による一斉分析法の開発を行った. 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) により蛍光標識した 16 種類の指定薬物(麻薬として規制された 3 化合物を含む)は, カラムに ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1.7 μ m, 100 mm \times 2.1 mm I.D.), 移動相には 0.1% ギ酸水溶液とアセトニトリル:メタノール(20:80)混合液を使用することで 8.5 分以内に感度良く, 良好に分離することができた. 各化合物の検量線は良好な直線性を示し, 日内・日間変動は 1.69%—12.97%で良好な再現性を示した. また, ヒト血漿・尿試料に 16 化合物を添加し分析を行ったところ, ヒトの 0.1 mL あたりの血漿及び尿での検出限界(S/N>3), 定量限界(S/N>10)はそれぞれ 0.30—150 pmol と 1.0—500 pmol, ヒト血漿での回収率は 87.7%—107.4%であった.

本法は, 指定薬物を高感度且つ短時間で一斉分離検出することが可能であるため, 違法ドラッグ中の指定薬物成分の定性・定量分析及びヒト血液, 尿, 毛髪等の生体試料への応用が可能と考えられ, 薬物乱用者の使用歴の証明に応用できると期待される.

A. 研究目的

麻薬・覚醒剤類の代用として, 様々な化学物質や植物が乱用され, これらの製品は「違法ドラッグ(脱法ドラッグ)」と呼ばれ, 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の流通は, 年々増加している. 厚生労働省では, 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・乱用実態に即した迅速な規制を行うために, 平成 18 年に薬事法の改正を行い「指定薬物制度」を導入し, 平成 19 年 4 月にトリプトファン系, ピペラジン系及びフェネチルアミン系麻薬・覚醒剤類似化合物, 亜硝酸エステル類などの 32 品目を「指定薬物」と指定した. 現在, 46 品目が「指定薬物」として規制されている.

これまで, 指定薬物の分析法には主に LC-MS, GC-MS 法が用いられてきたが, 我々は昨年まで

にフェネチルアミン系指定薬物の蛍光標識化 UFLC-FL 法, 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について報告してきた。しかし, 生体試料への適用では内因性物質の妨害により分離が困難で, 分析時間が長いなどの問題点があった。そこで本研究では, 生体試料に適用可能な迅速かつ高感度なスクリーニング法の開発を目的とし, フェネチルアミン系及びピペラジン系指定薬物 16 種類(麻薬として規制された 3 化合物を含む)について UPLC-ESI-TOF-MS 法による一斉分析法の開発を行った。

また, 生体試料としてヒト血漿および尿試料に本法を適用し, その有用性の検討を行い, さらに過去に日本市場に出回っていた違法ドラッグ製品中の指定薬物の定性, 定量を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

指定薬物(2C-C, 2C-E, TMA-6, 4-FMP, DOI, PMMA, MDMA-2, BDB, HMDMA, Indan-2-amine, bk-MBDB)及び, 指定薬物から麻薬として規制されたフェネチルアミン系化合物(2C-I, 2C-T-2, 2C-T-4)を含む 14 種類の塩酸塩に加え, ピペラジン系 2 種類(4-MPP, MDBP)塩酸塩, 計 16 種類の化合物について, それぞれ 1 mM 水溶液を作成したものを, 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, 内部標準物質として 3-phenyl-1-propylamine (3-PPA, SIGMA), 4-phenyl-butylamine (4-PBA, SIGMA)を使用した。蛍光試薬として 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F, 東京化成)を使用し, 触媒として sodium tetraborate (Borax, 和光純薬), 反応停止液としてギ酸(HCOOH, 和光純薬), 移動相にはアセトニトリル(CH₃CN, 関東化学), メタノール(CH₃OH, 関東化学), 及びギ酸(HCOOH, 和光純薬)を使用した。生体試料としてヒト血漿および尿試料を用い,

実試料として, 日本市場で違法ドラッグとして販売されていた 3 種類の違法ドラッグ製品を用いた。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. UPLC-FL-ESI-TOF-MS システム

UPLC システムとして Waters ACQUITY™ Ultra Performance LC (送液ポンプ, カラムオープン, オートサンプラー, PDA), FLR 検出器として Waters FLR, TOF-MS システムとして Waters LCT Premier™ XE TOF-MS, 自動解析ソフトとして MassLynx V 4.0 (Waters)を用い, 測定はエレクトロスプレーイオン化(ESI)法の positive-ion mode (ESI⁺)の V mode で行い, 測定範囲は *m/z* 100-1000とした。カラムには ACQUITY UPLC™ BEH C18 (1.7 µm, 100 mm × 2.1 mm i.d.)を使用し, カラム温度は 40°Cとした。その他の測定条件は Table 1 に示した。

3. DBD-F による薬物の蛍光標識経時反応

それぞれ 100 µM の薬物 16 種類と内部標準物質 3-PPA 混合溶液 30 µL に 2.5 mM DBD-F 120 µL を混和し, 100 mM Borax (pH9.3) 140 µL を加えて 60°C で 240 分間経時反応を行った。その後 0.1 % ギ酸水溶液 10 µL を加え反応を停止させ, 10 µL を UPLC-FL-ESI-TOF-MS へ注入し, 測定を行った。

4. 検量線の作成

16 種類の薬物(それぞれ 75 nM-18.75 µM)混合水溶液に 5 µM 3-PPA (I.S.)水溶液 10 µL を加え, 2.5 mM DBD-F 120 µL を混和し, 100 mM Borax (pH9.3) 140 µL と 60°C で 2 時間反応を行った。反応後, 0.1 % ギ酸水溶液 10 µL を加え反応を停止させ, 10 µL を UPLC-ESI-TOF-MS へ注入した。

注入した 10 µL 中における化合物濃度は 0.05 - 12.5 pmol (n=5)であった。検量線は生成物のピーク面積と I.S. (3PPA)の比により作成した。

5. ヒト血漿及び尿試料への指定薬物の添加回収

5.1 ヒト血漿中の検量線

ヒト血漿 200 μL に 16 種類の薬物混合溶液(それぞれ 0.2-2.0 nmol) 150 μL と、内標として 5 μM の 3-PPA 20 μL を添加した(n=5). さらに 630 μL のアセトニトリルを加え十分混合した後, 3000 rpm で遠心分離を 10 分間行い, 上清 500 μL を採取し, 窒素ガスで溶媒を留去した. 乾固したサンプルに 2.5 mM DBD-F 120 μL , 100 mM Borax 170 μL を加え, 60°C で 2 時間反応させた後, 0.1 % ギ酸水溶液 20 μL を加えて反応を停止させ, 反応溶液 10 μL を UPLC-ESI-TOF-MS に注入し測定を行った. ヒト血漿による検量線は反応生成物のピーク面積と I.S. (3PPA)の面積比により作成した.

5.2 ヒト血漿中薬物の検出

健常人のボランティアから得られた血漿に, 16 薬物の異なる三濃度の溶液を添加し, 5.1 と同様の手順で操作を行った. 検出された薬物の MS スペクトルと選択イオンクロマトグラム(SIC)について, 標準品と比較し定性を行った. 試料中の薬物濃度の定量及び, 分析法バリデーションのデータを検量線から算出した. さらに, ヒト尿試料への添加回収実験も血漿と同様に行った.

6. ラット毛髪試料中の薬物の定性

ラット毛髪試料は, 過去に報告したものを使用した¹⁾. すなわち, 濃茶褐色の体毛を有する Dark-Agouti (DA) ラットに, 2C-I 塩酸塩(現在では麻薬として規制) 5mg/kg を 10 日間連続して腹腔内投与し, 初回投与 28 日後, あらかじめ毛を刈り取っておいた部位に新たに生えてきた毛を採取して毛髪試料とした. 毛髪試料を 15 mg \times 4 秤量し, 5 μM の 3-PPA を 20 μL 加え, メタノール:5 M 塩酸=20:1 を 980 μL ずつ加えた. 超音波処理を 1 時間行い, 16 時間室温で放置した. 抽出液を遠心分離(3000 rpm, 5 min)し, 上清を分取し, 窒素ガスで乾固した. 次に 5 mM DBD-F 130 μL , 100 mM Borax 160 μL を加え, 60°C で 120 分反応後, 0.1% ギ酸 10 μL で反応を停止させ, 20 μL 分取

して, 水 380 μL で 20 倍希釈した測定試料 10 μL を UPLC-TOF-MS に注入した.

7. 実試料違法ドラッグ中の指定薬物の分析

過去に日本市場に流通していた実試料プロダクト1(淡黄色の粉)を 0.964 mg, プロダクト2 (キノコ)を 1.05 mg を量り取り, メタノール:水=1:1 溶液 964 μL , 1050 μL に溶解した. またプロダクト3 (無色の液体)は, 10 μL をメタノール:水=1:1 溶液 90 μL に溶解し, 10 分間遠心分離(2000 rpm)した. プロダクト1は 900 倍, プロダクト2は 20 倍, プロダクト3は 300 倍希釈し, 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した後, DBD-F で 60°C, 120 分反応後, 0.1% ギ酸 10 μL で反応を停止させ, UPLC-TOF-MS に 10 μL 注入し, 定性及び定量を行った.

【倫理面への配慮】

本研究では, 人の血漿や尿等の生体試料を用いるため, 人権保護法を遵守し, 被験者に十分な説明を行い, 書面上の同意を得た. また, 個人情報保護法に基づき個人情報の取扱に十分注意を払い, さらに静岡県立大学の倫理委員会の規定に従うことで, 倫理面に最大限の配慮を行った.

C. 研究結果・考察

1. 薬物の蛍光標識反応の検討

蛍光標識化は, 試料中の目的物質の高感度検出と選択性向上のために使用される. これまで我々は UFLC-FL によるフェネチルアミン系指定薬物の同時高感度分析法を開発してきた. しかし, 血漿及び尿などの生体試料中の指定薬物の検出では内因性物質等の妨害により分離が難しく, 高感度検出が困難であった. さらに, 蛍光検出器からは生成物の構造情報は得られない. 一方, 質量分析計(MS)は近年, 生体試料中の化合物の高感度検出可能な技術として広く普及されるようになった. MS にはいろいろな種類が存在するが, その中でも ESI-TOF-MS は m/z の精度が高く, 選

択性が優れている。そこで本研究では FL と ESI-TOF-MS による指定薬物の一斉分析法を検討した。

本研究では、一級及び二級アミン化合物である 14 種類のフェネチルアミン系及び 2 種類のピペラジン系薬物、計 16 種について DBD-F を用いた蛍光標識を試みた。Fig.2 にピペラジン系指定薬物 MDBP と DBD-F との反応構造式を示した。反応は 0.1M Borax (pH 9.3) の存在下 60 °C で 240 分間行った。その結果 Fig.3 に示したように、16 種類の薬物それぞれに個体差はあるものの、ほぼ 2 時間で生成物のピーク面積が一定になった。そこで蛍光標識反応は 2 時間で終了していると判断し、以後の実験では蛍光標識反応は 2 時間とした。

2. 分離条件の最適化

構造が類似している薬物は分離が非常に困難である。DBD-F に蛍光標識された 16 薬物の迅速な一斉分析を目的として、ACQUITY UPLC™ BEH C18 (1.7 µm, 100mm×2.1 mm i.d.) カラムを使用し、異なる移動相を用いて最適な分離条件の検討を行った。移動相 A には 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B にアセトニトリル、メタノールを用いて検討した。移動相 B に 0.1% ギ酸含有 60 % アセトニトリル溶液を用いた分析条件では、2C-T-4 と 2C-E の保持時間が 3.44, 3.52 分となり分離が困難であったが、移動相 B にメタノールを加えることで 2 化合物の分離が改善された。また、移動相 B 0.1% ギ酸含有アセトニトリル:メタノール(30 :70) の条件下では Indan-2-amine と BDB が同時に溶出され分離ができなかったが、移動相 B の溶媒比を 20:80 に変更し、2 化合物が分離可能となった。そこで、移動相 A に 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B に 0.1% ギ酸含有アセトニトリル:メタノール(20 :80) を用いた、A:B (40:60) isocratic を最適な分離条件とした。その他の条件は Table 1 に示した。

Fig.4 に 16 種類の薬物の蛍光クロマトグラム及びトータルイオンクロマトグラム(TIC), MS の選択イオンクロマトグラム(SIC)及びスペクトルを示した。

16 種類の薬物は 8.5 分以内に良好に分離し、MS のスペクトルではプロトン化された生成物 $[M+H]^+$ が検出された。

3. ヒト血漿及び尿中薬物の分析

生体試料での有用性を検証するため、ヒトの血漿及び尿に薬物を添加し、除タンパク後、DBD-F により蛍光標識を行い、UPLC-ESI-TOF-MS で測定を行った(Fig.5, Fig.6)。Fig.5, Fig.6A の蛍光クロマトグラムに示したように、血漿及び尿中の内因性物質より妨害され、蛍光標識された薬物は殆ど検出されなかった。内因性物質由来の妨害は TOF-MS でも同様に確認されるが、MS では SIC 検出により、化合物スペクトルが検出可能となった。Fig.5, Fig.6 (I), (II) に示したように、16 種類の蛍光標識された血漿及び尿中の薬物は、0.82 分から 8.2 分の範囲で ESI-TOF-MS によって良好に分離され、蛍光検出より高感度に検出することができた。従って、UPLC-ESI-TOF-MS による分析法は、ヒト血漿と尿中薬物の一斉分析に適していることが示唆された。

4. 分析法バリデーション

Table 2 には 16 種類の薬物の検量線を示した。検量線は 5 つの異なる濃度で測定し、一つの濃度に対して 5 回繰り返し分析を行った。検量線は良好な直線性を示し、bk-MBDB を除く指定薬物で $R^2 \geq 0.998$ であった。また、Table 3 で示した 3 濃度の溶液を用いた日内・日間変動においては、日内測定の CV % が 1.69%–12.97%、精度は 89.60%–113.1% であり、日間測定での CV % が 1.96%–10.87%、精度は 92.23%–115.2% であった。いずれも許容範囲である良好な再現性と精度が得られた。

同様にヒト血漿を用いた添加回収実験では Table 4 に示したように、血漿試料による妨害はなく、それぞれの薬物の異なる 3 種類濃度での回収率は 87.7%–107.4% であった。更に、Table 5 に示したようにヒトの 0.1 mL あたりの血漿及び尿で

の検出限界(S/N >3), 定量限界(S/N>10) はそれぞれ 0.30–150 pmol と 1.0–500 pmol と良好であった。以上の結果から, 本法は生体試料中のこれら薬物の定性定量分析に十分応用可能であると判断した。

5. ラット毛髪中薬物の分析

分析結果を Fig.7 に示した。標品のクロマトグラムとスペクトルの比較から, 連続投与した 2C-I がラットの毛髪から検出され, 薬物の毛髪分析にも応用可能であることが示唆された。

6. 実試料中指定薬物の検出

本法の有用性を検証するため, 過去に日本市場に流通していた違法ドラッグのプロダクト 1 (淡黄色の粉), プロダクト 2 (キノコ様), プロダクト 3 (無色の液体) 中の薬物の分析を行った。その結果を Fig. 8 のクロマトグラムに示した。薬物標準品のクロマトグラムとの比較から, プロダクト 1 からは BDB, プロダクト 2 では MMDA-2, プロダクト 3 では 2C-I を検出した。従って本法は違法ドラッグ中指定薬物(麻薬規制された化合物を含む)の分析に適用できることが示された。

D. 結論

本研究では, フェネチルアミン系及びピペラジン系 16 種類の指定薬物(指定薬物から麻薬として規制された 3 化合物を含む)について迅速, かつ高感度なスクリーニング法の開発を目的として, UPLC-ESI-TOF-MS 法による一斉分析法の開発を行った。DBD-F により蛍光標識した 16 薬物の UPLC による一斉分離を検討した結果, カラムには高分離能を持つ ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1.7 μm, 100 mm × 2.1 mm I.D.), 移動相には 0.1% ギ酸水溶液とアセトニトリル:メタノール (20:80) 混合液を使用することで 16 薬物を 8.5 分以内に感度良く分離することができ, UPLC-ESI-TOF-MS による高感度一斉分析法を確立することができた。個々の化合物の検量線は

良好な直線性を示し, 再現性も良好であった。また, 本法を用いたヒト血漿及び尿試料への添加回収実験を行った結果, 回収率は 88.5%~109.9% であった。さらに, 3 種類の実製品に本法を適用し, BDB, MMDA-2, 2C-I を確認することができた。

今回開発した UPLC-ESI-TOF-MS による指定薬物(麻薬規制された 3 化合物を含む)の一斉分析法は, フェネチルアミン系及びピペラジン系指定薬物を, 高感度且つ短時間で一斉に分離検出することが可能である。さらに実製品中の指定薬物の定性・定量分析及び, 社会に蔓延している薬物の検出やヒトの血液, 尿, 毛髪等の生体試料への応用が可能と考えられ, 薬物乱用者の使用歴の証明に応用できると期待される。

E. 参考文献

1) 平成 19 年度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「乱用薬物の分析・同定に関する研究」分担研究「新規麻薬指定化合物 2C-I 投与ラットにおける血漿, 尿及び毛髪中の薬物分析」(花尻(木倉)瑠理)。

F. 研究発表

論文発表

1) Jun Zhe Min, Suguru Hatanaka, Toshimasa Toyo'oka, Shinsuke Inagaki, Ruri Kikura-Hanajiri, Yukihiro Goda., Rapid, sensitive and simultaneous determination of fluorescence-labeled designated substances controlled by the Pharmaceutical Affairs Law in Japan by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 1411-1422 (2009)

学会発表

1) 山下和秀, 関 俊哲, 豊岡利正, 稲垣真輔, 東 達也, 花尻瑠理, 合田幸広:HPLC-電気化学検出法を用いたデザイナードラッグの簡便かつ高感度な分析法の開発, 日本分析化学会第58年会

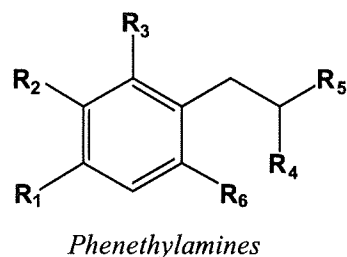
(札幌), 講演要旨集p.86, 2009年9月26日

2) 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), 要旨集 p.96, 2009年3月26日

3) 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), 要旨集4 p.100, 2009年3月26日

G. 知的所有権の取得状況

特になし



Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
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

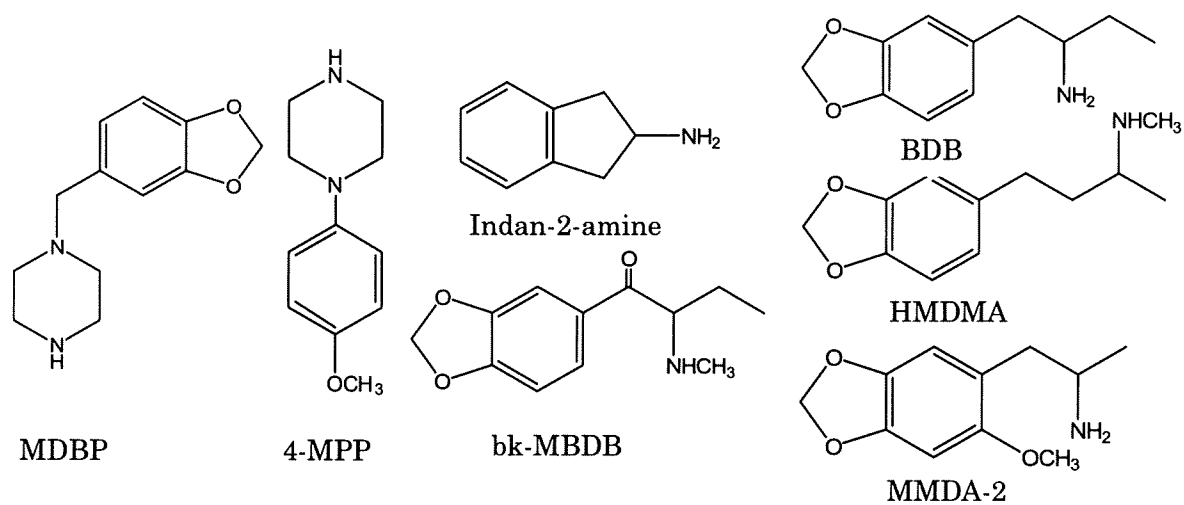


Fig. 1. Structures of psychotropic substances.

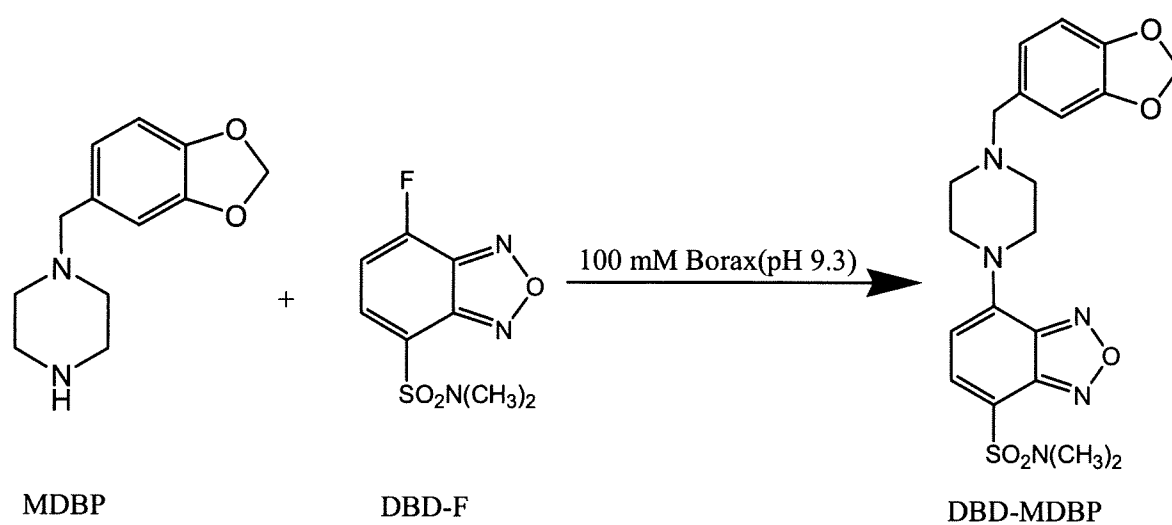


Fig. 2. Fluorescence labeling reaction of MDBP with DBD-F

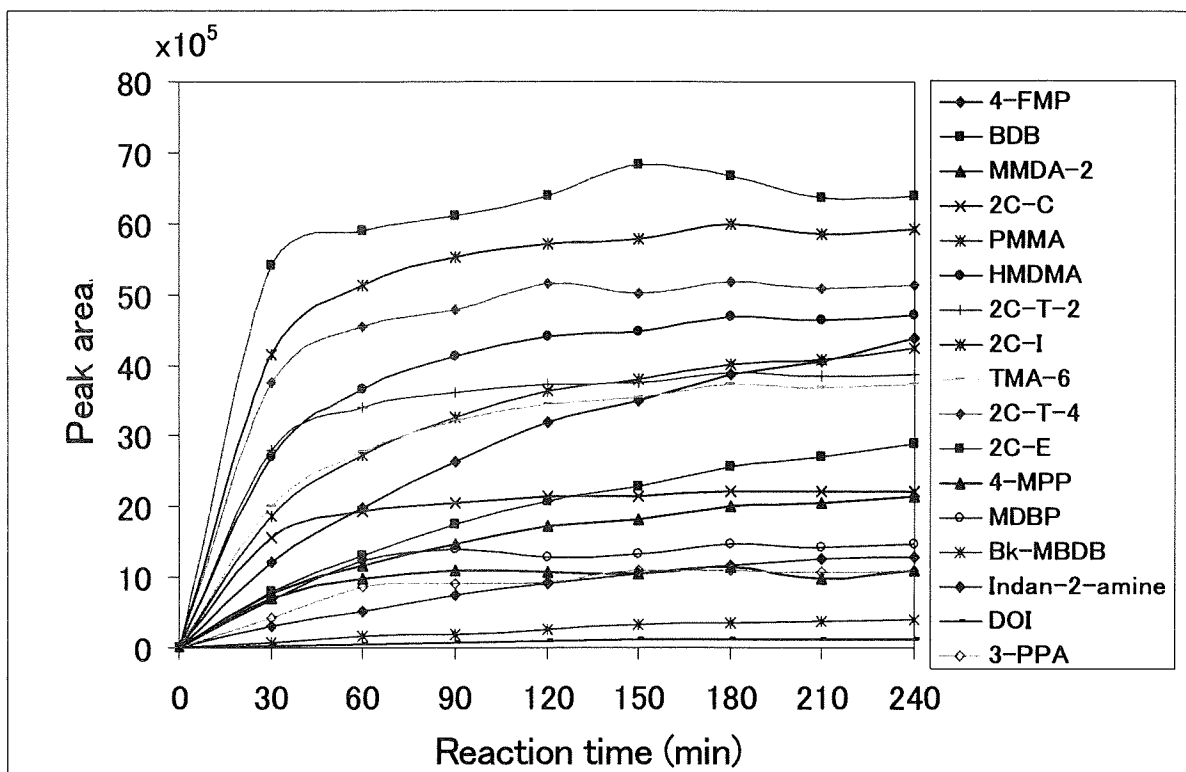


Fig. 3. Time courses of the reaction of psychotropic substances with DBD-F at 60°C

Table 1 UPLC-FL and UPLC-ESI-TOF-MS conditions

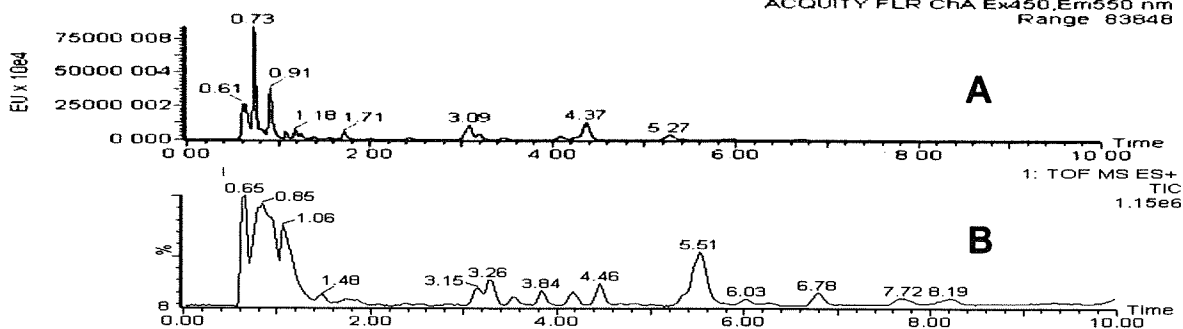
UPLC (separation conditions)

Column	ACQUITY UPLC™ BEH C18 (1.7 μm, 100mm×2.1 mm i.d.)
Mobile phase A	0.1% HCOOH in H ₂ O
Mobile phase B	0.1% HCOOH in CH ₃ CN:CH ₃ OH (20:80)
Isocratic elution	A : B = 40:60 (0-10 min)
Column temperature	40°C
Flow rate	0.4 mL/min
Injection volume	10 μL

FL Detector (FLR conditions) 550 nm (excitation: 450 nm)

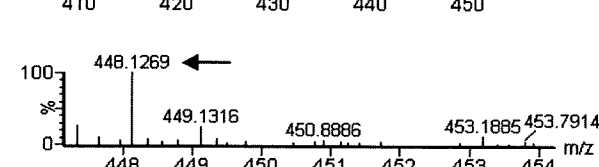
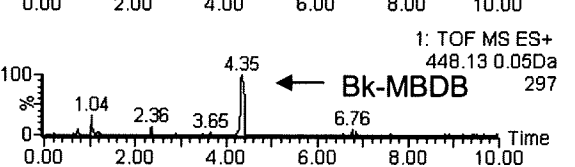
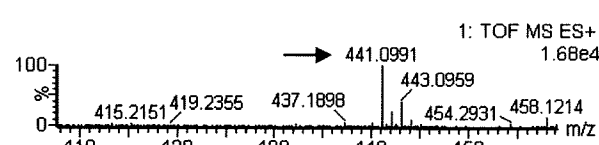
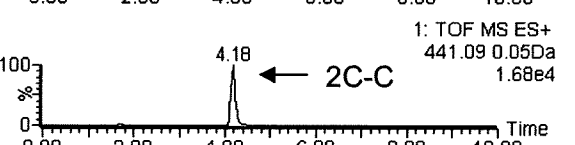
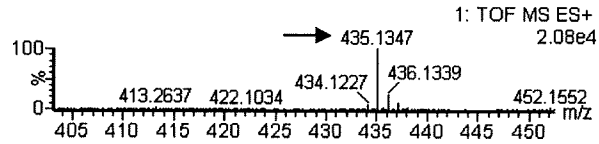
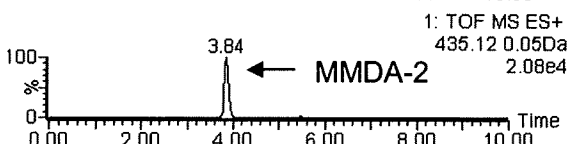
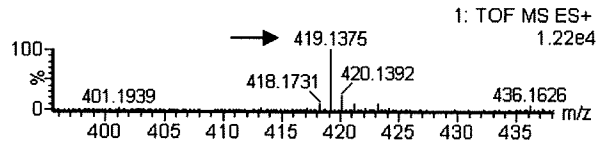
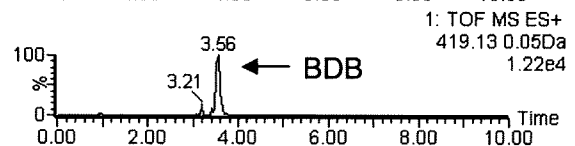
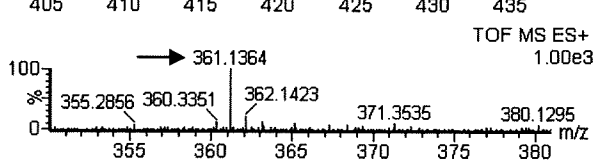
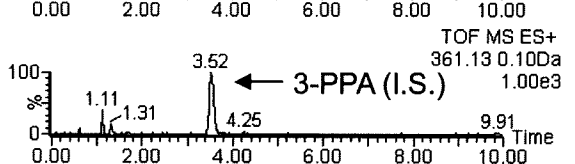
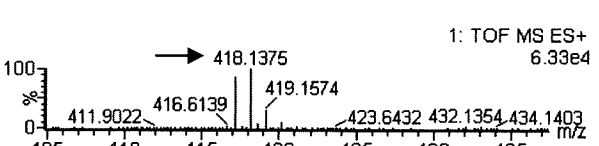
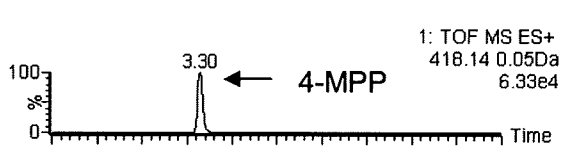
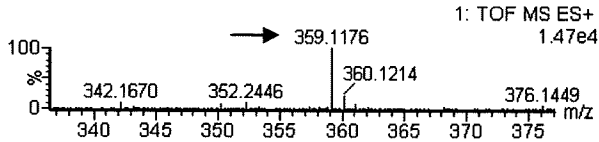
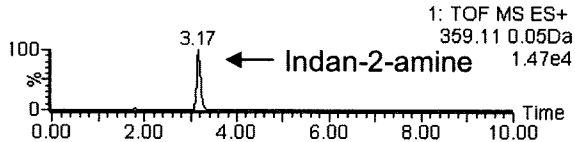
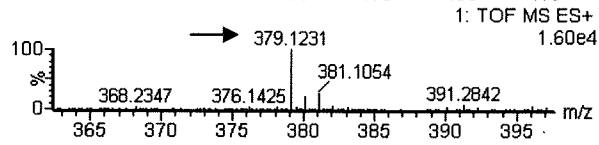
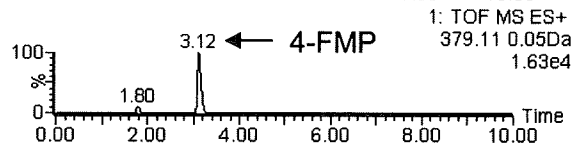
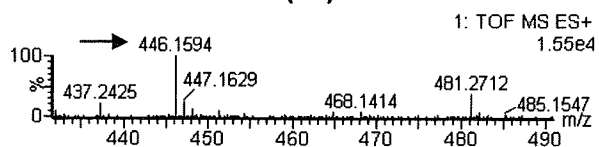
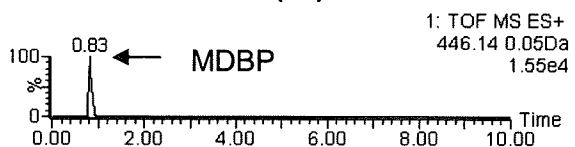
TOF-MS (LCT Premier XE conditions)

Polarity	ESI ⁺ (V mode)
Capillary voltage	3500 V
Sample cone voltage	10 V
Desolvation gas flow	700 L/h
Cone gas flow	50 L/h
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350°C
MS range	100-1000 <i>m/z</i>



(I)

(II)



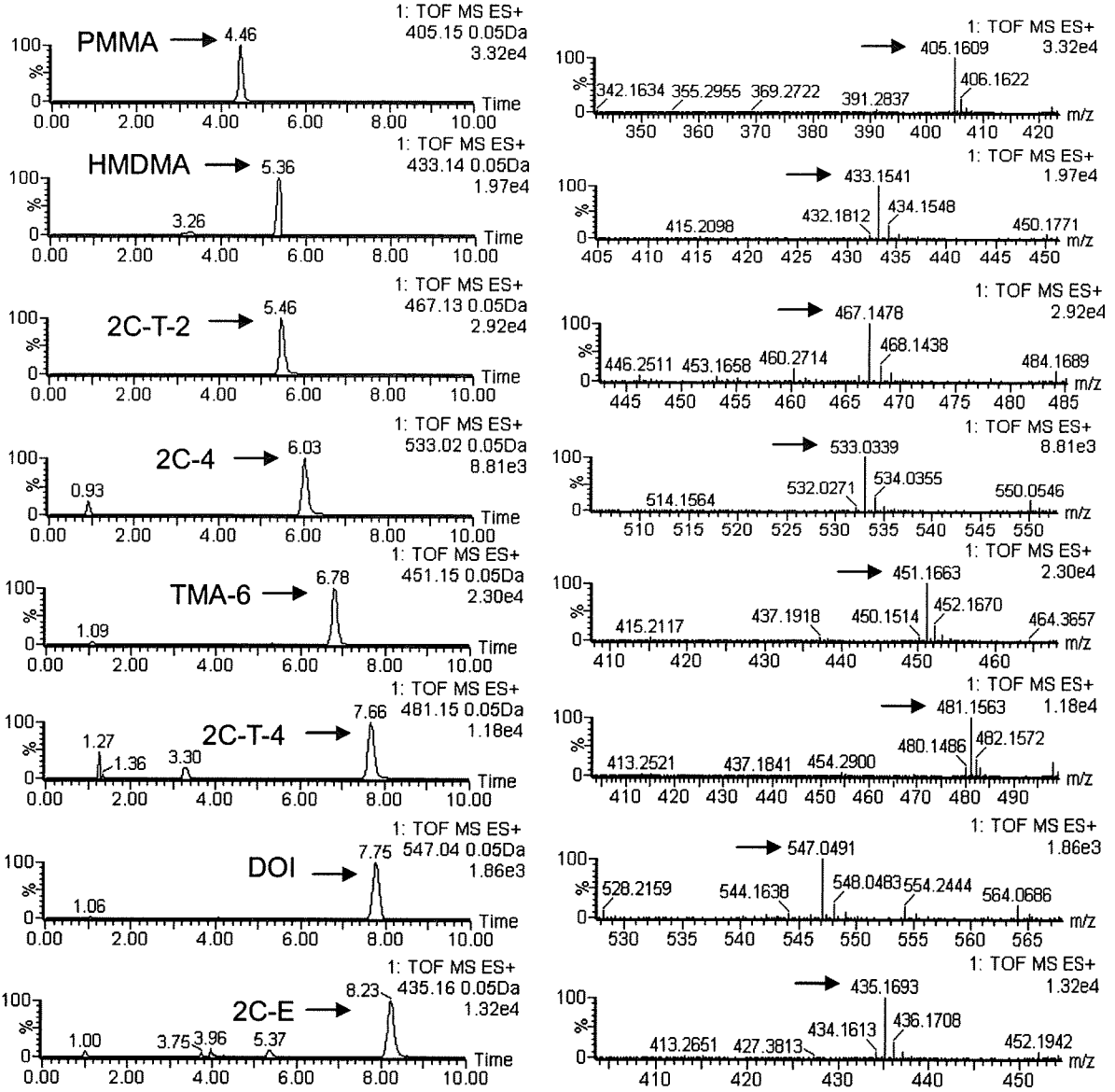


Fig. 4. Chromatograms, obtained from FL and TOF-MS detections, and mass spectra for the derivatives of authentic psychotropic substances

(A), FL; (B), TIC; (I), SIC; (II), Mass spectra.

The UPLC-FL-ESI-TOF-MS conditions are described in Table 1.

08112504

ACQUITY FLR ChA Ex450,Em550 nm
Range: 954336

