

植物系違法ドラッグ *Voacanga africana* 製品の成分分析及び DNA 解析に関する研究

花尻(木倉)瑠理, 丸山卓郎, 宮下聡徳, 合田幸広*

Chemical and DNA Analyses for the Products of a Psychoactive Plant, *Voacanga Africana*

Ruri KIKURA-HANAJIRI, Takuro MARUYAMA, Akinori MIYASHITA, and Yukihiro GODA*
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received March 3, 2009; Accepted May 8, 2009; Published online May 18, 2009)

Voacanga africana (Apocynaceae) is a small tropical African tree. The root bark and seeds of this tree contain a number of alkaloids, including ibogaine (a hallucinogenic/aphrodisiac compound in bark), tabersonine (a major constituent of seeds) and other voacanga alkaloids, traditionally used in Africa for religious purposes. Recently, some kinds of products containing this plant (root bark and seeds) have been distributed in the drug market in expectation of its hallucinogenic/aphrodisiac effects. There has been no report that has discussed quantitative analyses of these alkaloids in the products and their botanical origins. In this study, to investigate the trend of such a non-controlled psychotropic plant of abuse, a simultaneous analytical method was developed using LC/MS for the voacanga alkaloids including ibogaine and tabersonine in the commercial products of *V. africana*. Moreover, the botanical origins of these products were investigated by DNA analyses. As a result of the LC/MS analyses, the products were classified into two chemical types; an ibogaine-type and a tabersonine-type. The samples of the ibogaine-type contain ibogaine (0.05–0.6%) and other voacanga alkaloids; voacamine, voacamidine and voacangine, while those of the tabersonine-type mainly contain tabersonine (0.6–1.6%). The sequence analyses of chloroplast DNA, *trnL-F* region suggested that most of the products were derived from *V. africana* or closely related plants. They were classified into four genotypes based on nucleotide sequence of the *trnL-F* IGS region. The proposed methods of chemical and DNA analyses would be useful for investigating the trend in the distribution of the products of *V. africana*.

Key words—*Voacanga africana*; LC/MS; DNA analysis; psychotropic plant

緒 言

近年、麻薬及び覚醒剤の代用として、様々な化合物や幻覚性植物が乱用されている。一般に違法ドラッグと呼ばれるこれらの製品群は、主に麻薬、覚醒剤に類似の構造を有する化学物質群と、向精神薬様活性を有する成分を含有する植物群とに大別される。2006年度の薬事法改正により、2007年4月より指定薬物制度が施行され、これら違法ドラッグに対する規制が強化されたが、一方で、規制が厳しくなった化学物質の代替品として、植物由来の違法ドラッグ製品の流通が問題となっている。

Voacanga africana Stapf ex S. Elliot. は、熱帯アフリカに分布しているキョウチクトウ科 (Apo-

cynaceae) に属する木本類である。¹⁾ 主に種子が「呪術師の植物」等を標榜して、違法ドラッグ市場で流通している。催淫・幻覚成分 ibogaine を含有することで有名なイボガ (*Tabernanthe iboga* Baill.) や *Tabernaemontana* 属の近縁種であり、アフリカ地域では、古くから感染症治療に用いられると同時に、呪術的な目的でシャーマンに根皮や種子が用いられてきた。^{2,3)} *V. africana* の根皮は、voacamine, voacangine (carbomethoxy-ibogaine), voacordine, voacristine, vobasine 及び ibogaine 等を含有しており、^{1,4,5)} また、種子は tabersonine を主に含有しているとの報告がある。^{1,6,7)} これまでに報告されている *V. africana* に含有される主なアルカロイドの構造を Fig. 1 に示す。*V. africana* の幻覚性の本体は、ibogaine であると推定されるが、voacangine に中枢神経刺激作用があるとの報告もなされている。⁸⁾

国立医薬品食品衛生研究所

*e-mail: goda@nihs.go.jp

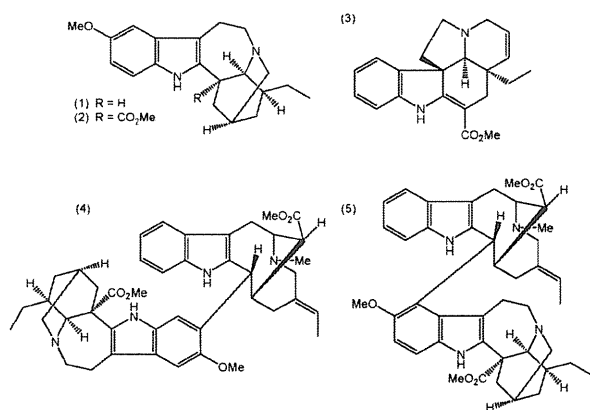


Fig. 1. Chemical Structures of Major Alkaloids in *V. africana* Investigated in this Study

(1) Ibogaine (MW 310), (2) Voacangine (MW 368), (3) Tabersonine (MW 336), (4) Voacamine (MW 704) and (5) Voacamidine (MW 704).

本植物は乱用目的の流通以外にも、種子の主アルカロイドの1つである tabersonine が脳血流改善作用を期待される vincamine (キョウチクトウ科ヒメツルニチニチソウ *Vinca minor* L. の活性成分) の半合成の原料として,³⁾ 根皮の主アルカロイドの1つ voacamine が抗マalaria活性等を有するとして医療用の観点からも注目されている。⁹⁾ また, ibogaine は, 催淫・幻覚成分を示すことで有名であるが, 逆に, モルヒネなどによる麻薬中毒症状の治療効果を有するとして注目されている。¹⁰⁾ しかし, 本植物の成分分析結果については, 必ずしも論文間で成分が一致しているわけではない。また, 乱用目的で流通している *V. africana* 製品の含有成分及び基原種調査を行った報告はない。

われわれは現在までに, 植物系違法ドラッグ製品の流通実態調査を行うことを目的とし, マジックマッシュルーム (2002年6月より麻薬原料植物として規制), *Salvia divinorum* (2007年4月より指定薬物として規制), クラートン等の活性成分や基原種調査結果を報告している。¹¹⁻¹⁸⁾ 本研究では, 幻覚成分 ibogaine を含有する植物 *V. africana* に着目し, インターネット上で実際に流通していた本植物製品を中心に, 液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) による植物中の主アルカロイド成分の含有調査を行った。また, これら植物製品について, 葉緑体 DNA, *trnL-F* 領域の塩基配列解析による基原種調査を行った。

実験方法

1. 試料及び試薬

インターネット上で購入した *V. africana* 製品 (根皮 1, 種子 4, 粉末 3) 及び「イボガ」を標榜する粉末 1 製品を分析に使用した。Ibogaine (1 mg/ml メタノール溶液) は Cerilliant 社より購入した。Tabersonine hydrochloride (*V. africana*) は ICV Biochemicals Inc. より購入した。Reserpine 及び定量分析で内標準物質として用いた betamethasone valerate は和光純薬より購入した。その他の試薬は, 特級あるいは液体クロマトグラフ用を用いた。また, 抽出溶液の膜ろ過フィルターとして UltraFree-MC (孔径 0.45 μm , Millipore 社製, MA, USA) を使用した。

2. 成分分析方法

2-1. 定性分析 粉末化した試料 50 mg にメタノール 1 ml を加え, 超音波下で 1 時間抽出を行い, 3000 rpm 5 分間の遠心分離を行った。その後, 上清を Ultrafree-MC を用い, 10000 rpm 1 分間の遠心分離を行い膜ろ過した。この抽出液を適宜希釈し, 試料溶液とした。上記試料溶液 5 μl を LC/MS による分析に使用し, 各ピークの保持時間, UV スペクトル及びマススペクトルを検討した。また, 試料溶液 10 μl を飛行時間型質量分析計 (TOFMS) に導入し, 精密質量分析を行った。LC/MS 及び TOFMS 分析の装置及び分析条件を以下に示す。

1) LC/MS 分析

装置: 1100 Series LC/MSD (Agilent Technologies)
HPLC 条件

カラム: Atlantis dC18 (2.1 \times 150 mm, 5 μm , Waters)
移動相: A: 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 pH 3.5, B: アセトニトリル, A/B=90/10 (0 min)–20/80 (40 min, 20 min hold)

流速: 0.3 ml/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 5 μl

検出: フォトダイオードアレイ (測定波長 254, 280 nm) 及び質量分析計

質量分析条件

イオン化: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI), ポジティブモード

フラグメント電圧: 160 V, キャピラリー電圧: 3500 V, 乾燥ガス: N_2 , 350°C, 13.0 L/min

2) TOFMSによる精密質量分析

質量校正には PEG-Na 600 を使用し、各測定の内標準物質としてトリフルオロ酢酸ナトリウム溶液を使用した。

装置：AccuTOF JMS100LC（日本電子株式会社）

イオン化モード：ESI，ポジティブモード，ガス：He，オリフィス 1 電圧：15 V，オリフィス 2 電圧：5 V，リングレンズ電圧：5 V，オリフィス 1 温度：80°C，ニードル電圧：2000 V，測定範囲： m/z 100.0–1000.0

2-2. 定量分析 粉末化した試料（製品 4, 7, 8: 50 mg, 製品 1, 2, 3, 5, 6: 25 mg）にメタノール 1 ml を加え、超音波下で 1 時間抽出を行い、3000 rpm 5 分間の遠心分離を行った。その後、上清を Ultrafree-MC を用いて 10000 rpm 1 分間、遠心分離を行い膜ろ過した。この抽出液を製品 1, 2, 3, 5, 6 は 500 倍、製品 4 は 100 倍、製品 7, 8 は 1000 倍に希釈した。それぞれの希釈液 1 ml に内標準物質として betamethasone valerate メタノール溶液 (10.0 $\mu\text{g/ml}$) を 100 μl を加え、試料溶液とした。

定量分析は、LC/MS のポジティブモードにおける各製品中の ibogaine (Mw 310) 及び tabersonine (Mw 336) のプロトン化分子イオン $[M+H]^+$ をモニタリングすることによって行った。Ibogaine 及び tabersonine の検量線は、それぞれ 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した標準溶液における各化合物の内標準物質 betamethasone valerate (1.0 $\mu\text{g/ml}$) に対するピーク面積比から作成した。真度及び精度（相対標準偏差）は、0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の 3 濃度について分析法の全操作を各濃度 3 回ずつ繰り返して測定した結果から評価した。なお、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。各製品中の各化合物の含有量 (mg/g) は、最終試料溶液の各濃度 ($\mu\text{g/ml}$) と分析に使用した試料量から換算した。

3. DNA 分析方法

各試料を MM-300 (Qiagen) により粉碎した。粉末 20 mg より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型として、葉緑体 DNA, *trnL-F* 領域に保存性の高い配列を基に設計したプライマー¹⁹⁾ を用いて PCR を行うことにより、*trnL* (UAA) 5' exon から *trnF* (GAA) を含む領域 (Fig. 2) を増幅した。

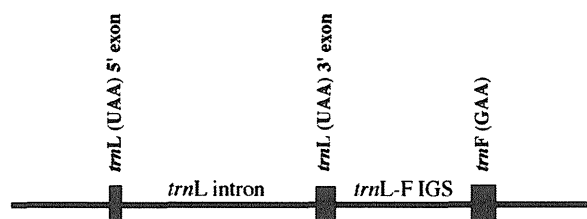


Fig. 2. Schematic of *trnL* (UAA) and *trnF* (GAA) Genes of Chloroplast DNA

PCR は、酵素に Gene Taq NT DNA polymerase (Nippon Gene) を、装置に DNA engine, PTC-200 (MJ Research, 現 Bio-Rad) を使用し、以下の温度プログラムにより行った：94°C, 4 min; 94°C, 30 sec, 50°C, 30 sec, 72°C, 45 sec, 40 cycle; 72°C, 4 min. Montage-PCR (Millipore) により PCR 溶液より余剰のプライマー及び dNTP を除いた後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析した。Cycle sequencing 試薬には、BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequence Kit (ABI) を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant genetic analyzer (ABI) により行った。また、塩基配列の多重整列解析は、clustal W プログラムにより行った。

結果及び考察

1. 定性分析

各製品の粉碎物のメタノール抽出液について LC/MS 分析を行い、検出された代表的なピークについて、現在までに報告されている *V. africana* の各成分と比較検討した。

製品 4 (根皮製品) の粉碎物のメタノール抽出液を LC/MS で分析した結果得られたクロマトグラム、また代表的なピークの UV スペクトルとマススペクトルを Fig. 3 に示した。保持時間 15.6 分に確認されたピーク 1 は、ibogaine 標準溶液の保持時間、UV スペクトル、マススペクトルと同一であり、別途行った TOFMS による精密質量分析においても、測定値 311.2106 から ibogaine のプロトン付加体 $[M+H]^+$ の組成式 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$ (理論値 311.2123) が推定可能であった。また、現在までにすでに報告されている各成分の含有量⁵⁾ 及び本研究において行った精密質量分析結果から推定した $[M+H]^+$ の組成式を考慮すると、ピーク 2 は voacangine ($\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3$, 測定値 369.2149, 理論値 369.2178), ピーク

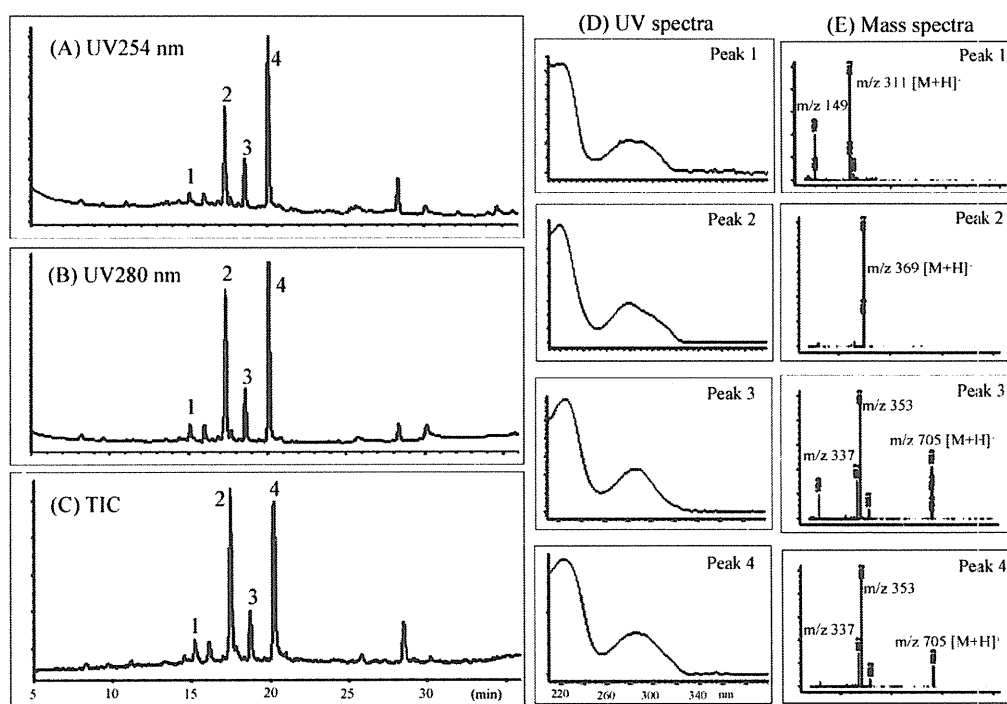


Fig. 3. LC/PDA/MS Analysis of the Methanol Extract from Product No. 4 (root bark sample)

UV spectra of peak 1-4 on chromatograms monitored at UV 254 nm (A) and UV 280 nm (B) were shown (D). Mass spectra of each peak on total ion chromatogram (TIC) (C) were also shown (E).

3, 4 はそれぞれ voacamine もしくは voacamidine ($C_{43}H_{53}N_4O_5$, 測定値 705.4077, 理論値 705.4016) と推測された。特にピーク 3, 4 については, $[M+H]^+$ の他に, m/z 353 ($[M+2H]^{2+}$) 及び m/z 337 ($[M+2H-OCH_3]^{2+}$) が主に検出されており, これは, 過去に報告されている voacamine 及び voacamidine のマススペクトルと一致した²⁰⁾。製品 7, 8 (粉末製品) については LC/MS 分析を行った結果, 各クロマトグラムにおいて, 製品 4 と同様のプロファイルを示し, 保持時間 15.6 分に ibogaine のピークが確認された。このことから, 製品 7, 8 は根皮を粉末化した製品であると考えられた。

一方, 製品 1, 3, 5, 6 (種子製品) の粉碎物のメタノール抽出液を LC/MS で分析した結果, 各製品のクロマトグラムは同様のプロファイルを示した。代表例として製品 3 の LC/MS 測定結果を Fig. 4 に示した。保持時間 22.6 分に確認された大きなピーク 1 は, tabersonine 標準溶液の保持時間, UV スペクトル, マススペクトルと同一であり, また, 別途行った TOFMS による精密質量分析においても, 測定値 337.1887 から tabersonine の $[M+H]^+$ の組成

式 $C_{21}H_{25}N_2O_2$ (理論値 337.1916) が推定可能であった。しかし, これらの製品から, ibogaine 等の他のアルカロイド成分は検出されなかった。製品 2 (粉末製品) については, LC/MS 分析を行った結果, 製品 1, 3, 5, 6 と同様のプロファイルを示し, 保持時間 22.6 分に tabersonine のピークが確認された。このことから, 製品 2 は種子を粉末化した製品であると考えられた。

さらに, イボガ (*T. iboga*) を標榜して販売していた製品 9 (粉末製品) についても同様にメタノールで抽出し LC/MS 分析を行った。測定結果を Fig. 5 に示した。分析の結果, *T. iboga* に含有されることが報告されている ibogaine 等の成分は検出されなかった。しかし, トータルイオンクロマトグラム上に, いくつかのピークが確認され, その内, ピーク 1 はポジティブモードにおいて m/z 609 の質量数を示した。ピーク 1 は, reserpine 標準溶液の保持時間, UV スペクトル, マススペクトルと同一であり, また, この抽出液について TOFMS による精密質量分析を行ったところ, reserpine の $[M+H]^+$ と同じ組成式を有するピークが検出された。Reserpine は中枢抑制作用を有し血圧降下作用

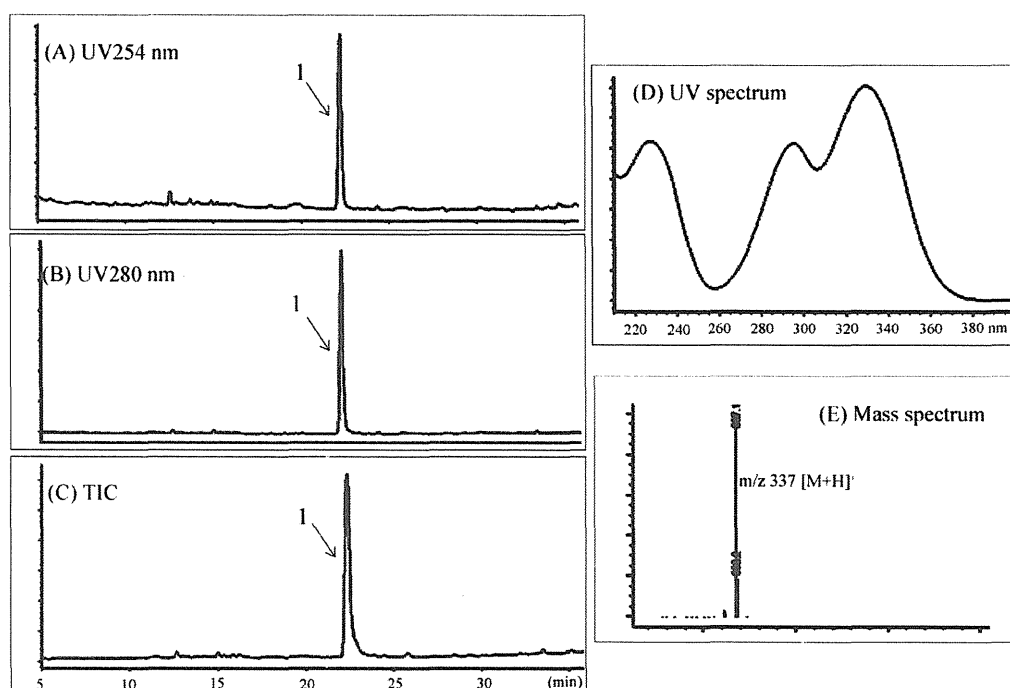


Fig. 4. LC/PDA/MS Analysis of the Methanol Extract from Product No. 3 (seeds sample)

UV spectrum of peak 1 on chromatograms monitored at UV 254 nm (A) and UV 280 nm (B) was shown (D). Mass spectrum of peak 1 on TIC (C) was also shown (E).

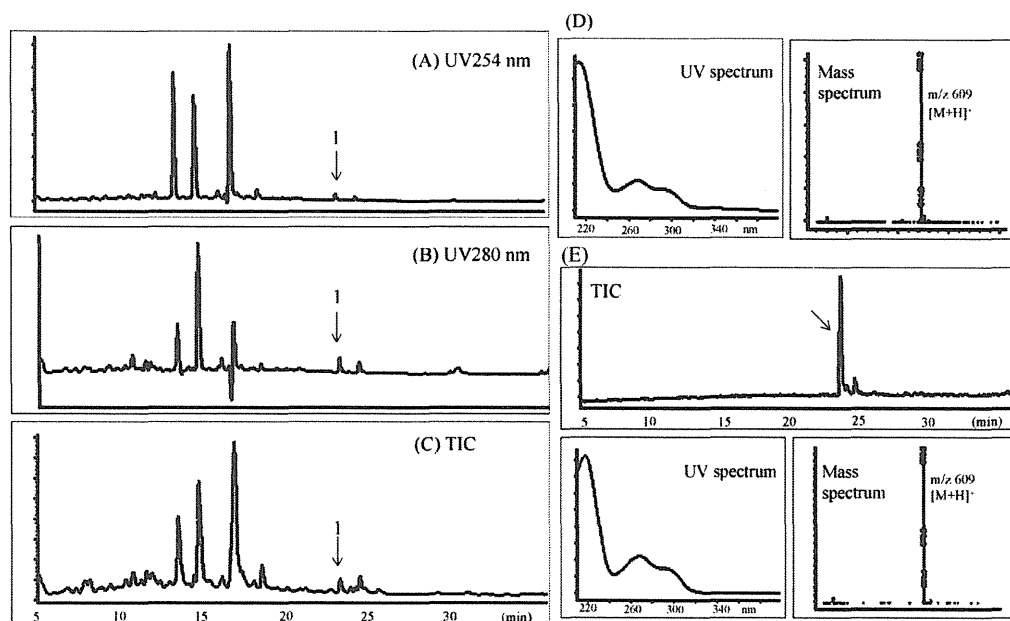


Fig. 5. LC/PDA/MS Analysis of the Methanol Extract from Product No. 9 (powder sample)

UV and mass spectra of peak 1 (D) on chromatograms monitored at UV 254 nm (A) and UV 280 nm (B), and TIC (C) were shown. The analysis of standard solution of reserpine (0.1 mg/ml MeOH solution) was also shown (E).

及び鎮静作用を示す化合物であり、キョウチクトウ科のインドジャボク (*Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz) の根から単離されたアルカロイドとして

有名である。^{21,22)} 今回、製品9から *R. serpentina* に含まれる他成分は検出されなかったが、製品9には、表示されていた植物の *T. iboga* ではなく、

reserpine を含有する他の植物、もしくは、いくつかの植物の混合物を含有している可能性が考えられた。

2. 定量分析

Table 1 に実験方法の部で示した ibogaine 及び tabersonine の定量分析法における検量線と精度・真度を示した。両化合物について、0.1–1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で良好な直線性が得られ、ibogaine では 3 濃度において相対標準偏差 $\leq 2.1\%$ 、真度は $\leq 5.9\%$ 、tabersonine では相対標準偏差 $\leq 4.1\%$ 、真度 $\leq 7.1\%$ と良好な値を示した。また、両化合物の検出限界 ($S/N < 3$) 及び定量限界 ($S/N < 10$) は、それぞれ共に 0.005 及び 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

本分析法により、各 *V. africana* 製品を必要に応じて粉碎後、メタノールで抽出し、ibogaine 及び tabersonine の含有量を LC/MS で測定した。各測定結果を Table 2 に示した。

製品 4 (根皮製品) は、約 0.07% ibogaine を含有していた。また根皮を粉末化したと考えられる製

品 7, 8 は、約 0.8–0.9% ibogaine を含有していた。製品 7, 8 は製品 4 の約 10 倍の ibogaine を含有していたことから、根皮由来の濃縮物であると考えられた。一方、製品 1, 3, 5, 6 (種子由来製品) は、約 1.0–1.7% tabersonine を含有していた。また、種子を粉末化したと考えられる製品 2 (粉末製品) は、約 0.9% の tabersonine を含有していた。

根皮製品と種子製品の間に見られた成分パターンの違いは、これまでの文献報告と一致しており、使用部位の違いに起因すると考えられるが、原料植物の種あるいは品種の違いに起因する可能性も否定できない。そこで、次に、DNA 塩基配列解析による基原種鑑別を試みた。

3. DNA 分析

TrnL intron 領域の解析結果を Fig. 6 に、*trnL*-F intergenic spacer (IGS) 領域の結果を Fig. 7 に示した。*V. africana* 製品は、*trnL* intron 領域において、すべて同一の塩基配列を示し、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 中の該当

Table 1. Precision and Accuracy of the LC-MS Analysis of Ibogaine and Tabersonine

Compounds	Linear Range ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Calibration Curve ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentrations ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Precision (%)	Accuracy (%)
Ibogaine	0.1–1.0	$y=5.4352x+0.0560$ $r^2 0.9998$	0.1	1.8	–5.9
			0.5	2.1	0.8
			1.0	1.2	1.4
Tabersonine	0.1–1.0	$y=5.2582x+0.0854$ $r^2 0.9983$	0.1	3.7	–7.1
			0.5	4.1	1.4
			1.0	0.9	–0.2

Table 2. Chemical and DNA Analyses of the Commercial “Voacanga” Products

Products	Forms	Chemical Analyses		DNA Analyses
		Compounds	Contents (%)	<i>trnL</i> -F IGS Genotypes
1	Seeds	Tabersonine	1.1	Type 1
2	Powder	Tabersonine	0.9	Type 1
3	Seeds	Tabersonine	1.7	Type 1
4	Root bark	Ibogaine	0.07	Type 2
5	Seeds	Tabersonine	1.1	Type 3
6	Seeds	Tabersonine	1.0	Type 4
7	Powder	Ibogaine	0.9	Type 2
8	Powder	Ibogaine	0.8	Type 2
9*	Powder	Reserpine	N.T.**	N.T.**

* Product No. 9 was sold as “iboga”

** N.T.: Not tested.

```

Commercial products A A T T G G A T T G A G C C T T G G T A T G G A A A C C T A C T A A G T G A T A A C T T T C A A A T T C A G A 55
AF214452 . . . . . 55

Commercial products G A A A C C C C G G A A T T A A T A A A A A G G G C A A T C C T G A G C C A A A T C C T G T T T T C C A C A A 110
AF214452 . . . . . 110

Commercial products A C A A A A G T T C A T A A A A C G A A A A A A G G A T A G G T G C A G A G A C T T A A C G G A A G C T G T T 165
AF214452 . . . . . 165

Commercial products C T A A C A A A T G G A G T T G G C C G C G T T G G T A G A G A A A C C T T T C C A T C G A A A A T T C A G A 220
AF214452 . . . . . 220

Commercial products A A G G A T G A A G G A T A A A C G T A T A T A C A T A C G T A T T G A A T A C T A T A T G A A A T G A T T A 275
AF214452 . . . . . 275

Commercial products A T G C C G A C C C G A A T G A A T C T G C A T T T T T C T A T A A A A A A A T A G A A G A A T T G G T G T 330
AF214452 . . . . . 326

Commercial products G A T T C G A T T C C A C A T T G A A G A A A G A A T C G A A T A T T C A T T G A T C A A A T A A T T C A T T 385
AF214452 . . . . . 381

Commercial products C C A T A G T C T G T A G A T C T T T T C A A G A A C T G A T T A A T C G G A C G A G A A T A A A G A T A G A 440
AF214452 . . . . . 436

Commercial products G T C C C G T T C T A C A T G T C A A T G C C G G C A A C A A T G A A A T T T A T A G T A A G A A G G 490
AF214452 . . . . . 486

```

Fig. 6. DNA Sequence Alignment of *trnL* Intron Region of the *Voacanga africana* Products
A dot '.' and a hyphen '-' indicate the same nucleotide as the top sequence and a gap, respectively.

```

Type1 A A A A A T C T A T T T G C C T C C C C A A C T A T T T A T C C A T T C T A T T C C C C T T T C C T T T C G 55
Type2 . . . . . 55
Type3 . . . . . 55
Type4 . . . . . 46
AF214298 . . . . . 53

Type1 T T A G T G T C C T T A T A C A T T C G C C C T A T T C T A T T C T T T G T A G A A A T A G A T C T G G G C G 110
Type2 . . . . . 110
Type3 . . . . . 110
Type4 . . . . . 101
AF214298 . . . . . 108

Type1 G A A A T G T C T T A T T C C A T C G T A T A T A T A A G A T A T A C A T C T T T G A G C A A G A A A T T C C 165
Type2 . . . . . 157
Type3 . . . . . 165
Type4 . . . . . 156
AF214298 . . . . . 163

Type1 C A T T T T A A T G A T T T A C A A T C G A T A T C A T T A C T C A T A C T A A G T C A A - G A T C C A A G A 219
Type2 . . . . . 212
Type3 . . . . . 210
Type4 . . . . . 210
AF214298 . . . . . 217

Type1 A A T T C C C G T A C C T C C T A G A T A A A A C T T T T A A T C T T C T T T C A C C T T T T A A T T G A 274
Type2 . . . . . 267
Type3 . . . . . 274
Type4 . . . . . 265
AF214298 . . . . . 269

Type1 C A T A G A C C C C C A C C C G C T A A T A A A A T G A G G A T G C T A C A T T G G G A C T 320
Type2 . . . . . 313
Type3 . . . . . 320
Type4 . . . . . 311
AF214298 . . . . . 315

```

Fig. 7. DNA Sequence Alignment of *trnL*-F IGS Region of the *Voacanga africana* Products
A dot '.' and a hyphen '-' indicate the same nucleotide as the top sequence and a gap, respectively.

配列 (Acc. no.: AF214452)²³⁾と 490 bp 中 4 bp を除き、一致した。今回の研究では、*V. africana* の標準植物試料を入手していないため、当該領域における本植物の種内変異の頻度についての情報が無い。したがって、今回の研究結果から、違法ドラッグ市場に流通する *V. africana* 製品の基原種を断定することはできないが、データベース上の配列との比較から、*V. africana* あるいは、その近縁種であると考えられた。

一方、*trnL*-F、IGS 領域では、各製品の配列は、非常によく似た 4 つの配列に分類され (Table 2)、いずれもデータベース上の該当配列 (Acc. no.: 214298) と、高い相同性を示した。これらの遺伝子型と成分型との関係を比較すると、成分分析におい

て、ibogaine 含有型のプロファイルを示した製品は、すべて type 2 に分類されているものの、tabersonine 含有型のプロファイルを示した製品は、type 1, 3, 4 に分かれており (Table 2)、遺伝子型と成分型の間に関連関係を見出すことはできなかった。*TrnL* intron 領域においては、すべての製品が、同一の塩基配列を有していることから、今回、*V. africana* 製品において検出された 2 種の成分型は、原料植物の種あるいは品種の違いによるものではなく、使用部位の違いに起因するものと考えられた。

結 論

違法ドラッグ市場に流通する *V. africana* 製品について、製品中の主要アルカロイド成分分析を行っ

たところ、今回分析を行った製品では含有するアルカロイド成分の違いにより2種類に分類された。すなわち、製品4(根皮製品)のibogaine含有型と、製品1, 3, 5, 6(種子製品)のtabersonine含有型である。また、製品に使用した部位が不明である粉末状3製品については、製品中に含有するアルカロイドが、製品7, 8がibogaine含有型、そして製品2がtabersonine含有型と確認されたので、それぞれ、製品7, 8は根皮を粉末化した製品、製品2は種子を粉末化した製品であると考えられた。しかし、これら含有アルカロイドの違いは、原料植物の個体差あるいは部位による違いの他に、種による違いに起因している可能性も否定できない。そこで、これら製品について、葉緑体DNA, *trnL-F*領域の塩基配列解析による基原種鑑別を行った結果、市場に流通するボアカンガ製品は、*V. africana*かその近縁種を原料にしていると推定された。*V. africana*のように、部位によって含有成分が全く異なるような植物においては、成分分析だけでは実際にどのような植物由来の製品が流通しているか判断が困難である場合も多い。今回提示した成分分析と遺伝子解析による基原種鑑別を組み合わせた解析法は、*V. africana*製品の流通実態調査を行う手法として有用であると思われる。

REFERENCES

- Hedberg I., Hedberg O., *J. Ethnopharmacol.*, **6**, 29–60 (1982).
- De Smet P. A., *J. Ethnopharmacol.*, **50**(3), 141–146 (1996).
- Le Gand A., *J. Ethnopharmacol.*, **25**(3), 315–338 (1989).
- Jenks C. W., *Nat. Prod. Lett.*, **16**(1), 71–76 (2002).
- Thomas D. W., Biemann K., *Lloydia*, **31**, 1–8 (1968).
- Kunesch N., Miet C., Trolly M., Poisson J., *Ann. Pharm. Fr.*, **26**(1), 79–86 (1968).
- Kassai-Zieger A., Szarvady B., Szederkenyi F., *Herba Hungarica*, **21**(2–3), 225–235 (1982).
- Otto J., “Pharmacotheon-Entheogenic drugs, their plant sources and history” 2nd ed., Natural product Co., Kenewick, WA (1996).
- Ramanitrahasimbola D., Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Federici E., Palazzino G., Galeffi C., Nicoletti M., *Phytother. Res.*, **15**(1), 30–33 (2001).
- Popik P., Richard L. T., Phil S., *Pharmacol. Rev.*, **47**(2), 235–253 (1995).
- Maruyama T., Shirota O., Kawahara N., Yokoyama K., Makino Y., Goda Y., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **44**(1), 44–48 (2003).
- Maruyama T., Yokoyama K., Makino Y., Goda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(6), 710–714 (2003).
- Maruyama T., Kawahara N., Yokoyama K., Makino Y., Fukiharu T., Goda Y., *Forensic Sci. Int.*, **163**(1–2) 51–58 (2006).
- Kikura-Hanajiri R., Hayashi M., Saisho K., Goda Y., *J. Chromatogr. B*, **825**(1), 29–37 (2005).
- Maruyama T., Kamakura H., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**(1), 179–183 (2008).
- Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., *Jpn. J. Food Chemistry*, **15**, 73–78 (2008).
- Maruyama T., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Takayama H., Goda Y., *J. Nat. Med.*, **63**, 340–344 (2009).
- Kikura-Hanajiri R., Kawamura M., Maruyama T., Kitajima M., Takayama H., Goda Y., *Forensic Toxicology*, (2009) in press.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J., *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1105–1109 (1991).
- Lepine F., Milot S., Zamir L., Morel R., *J. Mass Spectrom.*, **37**, 216–222 (2002).
- Furlenmeier A., Lucas R., Macphillamy H. B., Muller J. M., Schlitter E., *Experientia*, **9**(9), 331–3 (1953).
- Dorfman L., Heubner C. F., Macphillamy H. B., Schlittler E., St. Andre A. F., *Experientia*, **9**(10), 368–9 (1953).
- Potgieter K., Albert V. A., *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **88**, 523–549 (2001).

2008年度買い上げ違法ドラッグ製品から検出された新規流通デザイナードラッグの同定

内山奈穂子,^a 宮澤法政,^b 河村麻衣子,^a 花尻(木倉)瑠理,^a 合田幸広^{*,a}

Analysis of Newly Distributed Designer Drugs Detected in the Products Purchased in Fiscal Year 2008

Nahoko UCHIYAMA,^a Norimasa MIYAZAWA,^b Maiko KAWAMURA,^a
Ruri KIKURA-HANAJIRI,^a and Yukihiko GODA^{*,a}^aNational Institute of Health Sciences (NIHS), 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan, and ^bSaitama Institute of Public Health,
639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama 338-0824, Japan

(Received July 21, 2009; Accepted September 28, 2009; Published online September 30, 2009)

Thirty-two psychotropic substances were listed as designated substances (Shitei-Yakubutsu, 31 compounds and 1 plant) in Japan by the Pharmaceutical Affairs Law in April 2007 for preventing the abuse of these substances. Subsequently, other psychoactive compounds were also added to this category, 40 substances (classified as 12 tryptamines, 17 phenethylamines, 3 piperazines, 6 alkyl nitrites, 1 diterpene and 1 plant) are controlled as designated substances as of July 2009. However, new designer drugs are still distributed in illegal drug market according to the results of our annual survey. This study presents the analysis of four newly distributed designer drugs detected from two products, which were purchased from October 2008 to February 2009 in Japan. As the results of NMR, GC-MS and LC-MS analyses, three phenethylamine derivatives, 1-(2-fluorophenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (*N*-Me-2-FMP), 1-(2,5-dimethoxy-4-isopropylsulfanylphenyl)propan-2-amine (ALEPH-4) and 1-(2,5-dimethoxy-4-nitrophenyl)propan-2-amine (DON) and a tryptamine derivative, *N*-ethyl-5-methoxy-*N*-propyltryptamine (5-MeO-EPT), were detected. *N*-Me-2-FMP and 5-MeO-EPT were newly identified in this study. Additionally, ALEPH-4 and DON were found as novel illegal drugs distributed in Japan.

Key words—psychotropic substance; NMR; GC-MS; LC-MS; designer drug; drug abuse

緒 言

近年、違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)と呼ばれる化合物や植物が乱用されている。これらは麻薬や覚醒剤の代用として使用されており、その乱用拡大が深刻な問題になっている。このような問題に対応するべく、平成18年の薬事法改正により、幻覚・中枢興奮等の精神毒性かつ保健衛生上の危害のおそれがある薬物及び植物を指定薬物として規制することとなり、平成19年4月1日より32物質(31化合物1植物)が規制された。¹⁻³⁾これにより指定薬物の流通は減少したが、一方で新たな構造類似化合物が多数違法ドラッグ市場に出現しており、平成20年1月に5化合物、平成21年1月には6化合物が新たに指定薬物として規制された。これまで

に、平成20年1月に麻薬に指定された3化合物を除き、40物質(39化合物1植物)が指定されている(平成21年7月現在)。^{4,5)}なお、このような状況を踏まえ、今後も指定薬物は随時追加される予定である。

本研究では、違法ドラッグ製品の流通実態調査を目的として平成20年10月-平成21年2月に買い上げられた違法ドラッグ製品のうち、未知のピークが検出された製品について、NMR, GC-MS及びLC-MSによる分析を行い、新たに市場での流通が確認された4化合物について分析及び同定結果を示す。なお、今回検出された4化合物のうち、3化合物は、平成21年1月16日より指定薬物として新たに追加された1-(4-fluorophenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (*N*-Me-4-FMP), 1-(4-ethylsulfanyl-2,5-dimethoxyphenyl)propan-2-amine (ALEPH-2)及び*N*-ethyl-*N*-isopropyl-5-methoxytryptamine (5-MeO-

^a国立医薬品食品衛生研究所, ^b埼玉県衛生研究所
*e-mail: goda@nihs.go.jp

EIPT) の構造類似体であった。

実験方法

1. 分析試料及び試薬 平成20年10月-平成21年2月に違法ドラッグ市場において購入した2製品(液体1種類, 粉末1種類)を分析に供した。NMR測定溶媒は, methanol- d_4 は Merck 社製 (Darmstadt, Germany), methanol- ^{12}C - d_4 , DMSO- d_6 は SIGMA-ALDRICH: ISOTEC 社製 (St. Louis, MO) を使用した。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。

2. NMR測定 液状試料は, 蒸発乾固した後, 測定を行い, 粉末試料は, 必要に応じて分離操作を行った後, 測定を行った。NMR装置は, JEOL 製 (Tokyo, Japan) ECA-600 を用いた。測定核種は 1H , ^{13}C であり, 各種 NMR [1H -NMR, ^{13}C -NMR, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC), Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC), Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy (DQF-COSY), and Nuclear Overhauser Effect (NOE)] 測定を行った。

3. MS測定用試料の調製法 粉末試料は2mgにメタノールを1ml加え, 超音波下10分間抽出を行った。また, 液体試料は50 μ lを使用し, メタノールを2ml加えて溶解した。さらに, 膜ろ過 (Ultrafree-MC, 0.45 μ m filter unit, MILLIPORE 社製, Bedford, MA) を行い, 不溶物を取り除いて測定試料とした。なお, 試料は適宜希釈して分析に用いた。

4. GC-MS分析条件 装置: [GC] 6890N/[MS] 5975 MSD (Agilent 製), カラム: HP-1MS (30m \times 0.25mm i.d., 膜厚0.25 μ m, Agilent 社製, Santa Clara, CA), キャリアーガス: He, 0.7ml/min, 注入法: スプリットレス, 注入量: 1 μ l, 注入口温度: 200 $^{\circ}C$, カラム温度: 80 $^{\circ}C$ (1min hold) -5 $^{\circ}C$ /min-190 $^{\circ}C$ (15min hold) -10 $^{\circ}C$ /min-310 $^{\circ}C$ (5min hold), イオン化法: EI法, 検出器温度: 280 $^{\circ}C$ 。なお, この条件は, 過去に報告した指定薬物の一斉分析と同一である。²⁾

5. 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. \times 100mm, 1.8 μ m, Waters, Milford, MA), ガードカラム: Van Guard column (2.1mm i.d. \times 5mm, 1.8 μ m, 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溶液, グラジエント条件: A/B 95/5-20/80 (0-60min, 5min hold), 測定波長: 190-500nm, 流速: 0.3ml/min, カラム温度: 40 $^{\circ}C$, 注入量: 1 μ l, 検出: フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) 及び質量分析計。

5-1. 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, ポジティブモード, 脱溶媒ガス流量 (Desolvation gas flow): N_2 650l/h, 脱溶媒温度 (Desolvation temp.): 350 $^{\circ}C$, コーン電圧: 30V, キャピラリー電圧: 3000V, 測定範囲: m/z 50-500。

6. 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)

6-1. DART条件 ポジティブモード, ガス流量: He 2.0l/min, ガス温度: 250 $^{\circ}C$, ニードル電圧: 3200V, 電極1: 100V, 電極2: 250V。

6-2. TOF-MS条件 ポジティブモード, イオンガイド: 500V, リフレクトロン電圧: 950V, オリフィス1電圧: 15V, オリフィス2電圧: 5V, リングレンズ電圧: 5V, オリフィス1温度: 80 $^{\circ}C$, 測定範囲: m/z 100-500, 質量校正: PEG600, 内部標準物質: diphenhydramine ($C_{17}H_{21}NO$)。

結果

平成20年度に買い上げられた違法ドラッグ製品のうち, 未知のピークが検出された製品について, GC-MS, LC-MS 及び NMR により分析を行った。その結果, 3種のフェネチルアミン系化合物 (Compound 1-3) 及び1種のトリプタミン系化合物 (Compound 4) の計4化合物が新規流通違法ドラッグ成分として検出された (Fig. 1)。以下にこれら化合物の構造決定に関する分析データを示す。

1. Compound 1の同定 指定薬物の GC-MS 分析と同一条件で分析を行った結果,²⁾ 保持時間 8.79分に Compound 1のピークが検出され [Fig. 2(a)], そのマススペクトルは Fig. 2(c)に示す通りであった。一方, LC-MS 分析では, 6.3分に m/z 168 [$M+H$]⁺のピークが観測され [Fig. 3(a)],

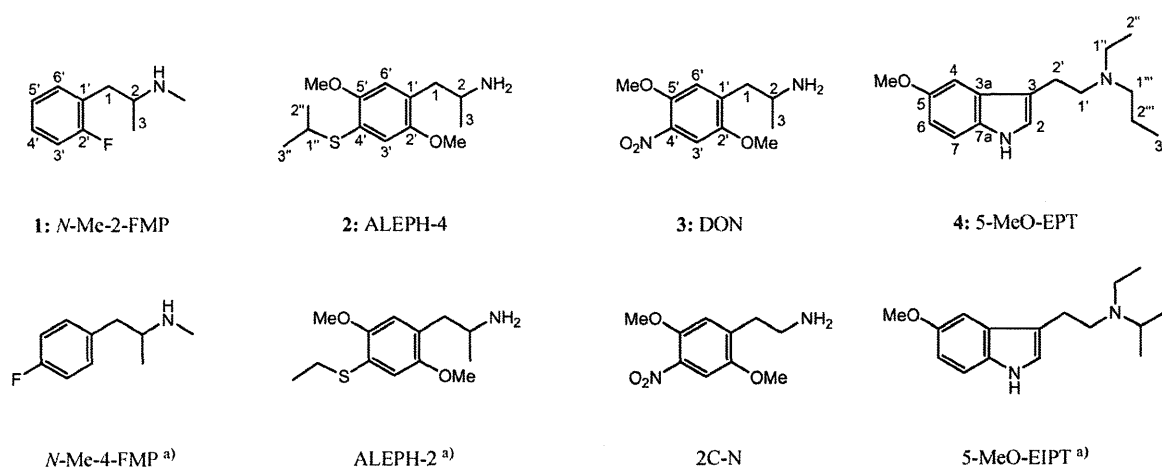


Fig. 1. Structures of Chemical Drugs

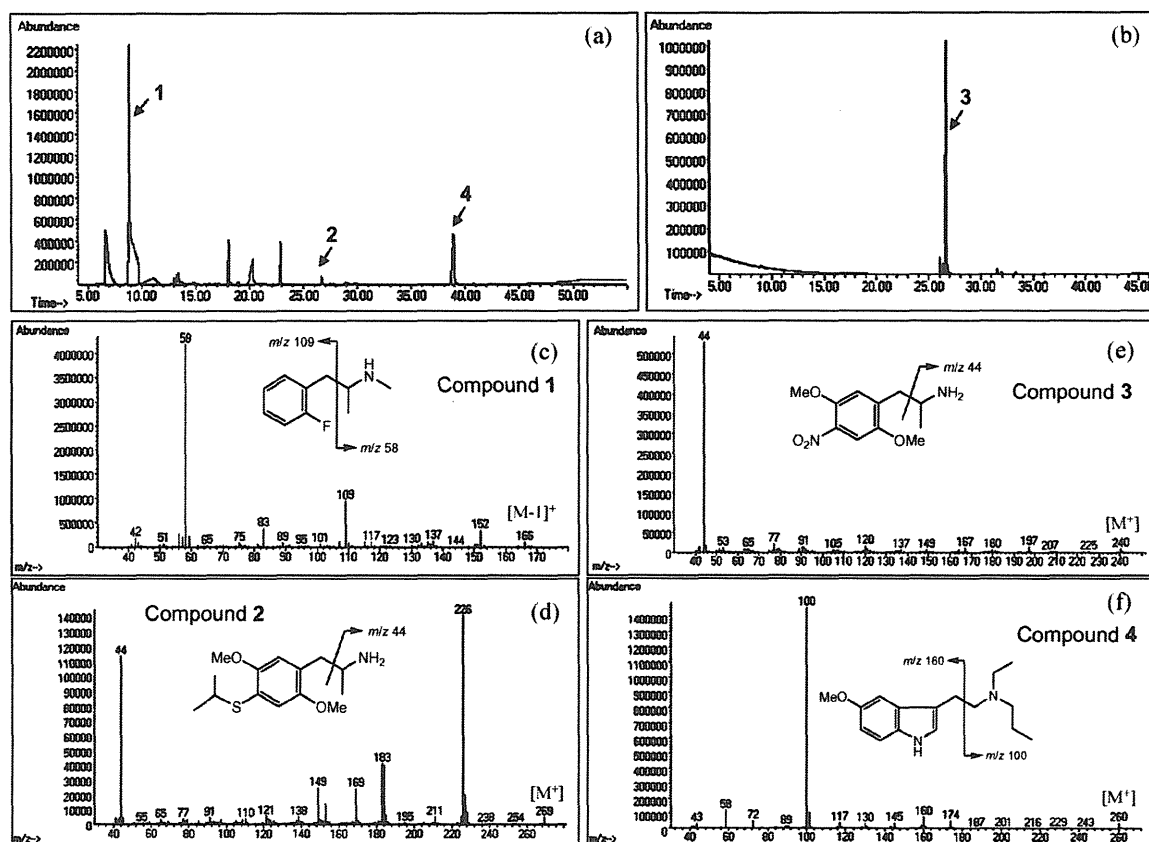
^{a)} Designated substances.

Fig. 2. GC-MS Data of Two Products

GC-MS chromatograms of the extract of two products (a and b). GC-EL mass spectra of the detected peaks at 8.79 min (1: *N*-Me-2-FMP, c), 26.30 min (2: ALEPH-4, d), 26.61 min (3: DON, e) and 38.74 min (4: 5-MeO-EPT, f).

UV スペクトルは Fig. 3(e) に示す通りであった。さらに、DART-TOFMS による精密質量分析では、 m/z 168.11806 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、組成式は、 $C_{10}H_{15}FN$ (理論値 168.11885, -0.79

mmu) と推定された。これら結果は、指定薬物である *N*-Me-4-FMP のスペクトルデータに酷似していた。⁵⁾ 次に、NMR 測定を行ったところ、メチル基 [δ_H 1.24 ppm (3H, d, $J=6.5$ Hz), δ_C 15.7 ppm]

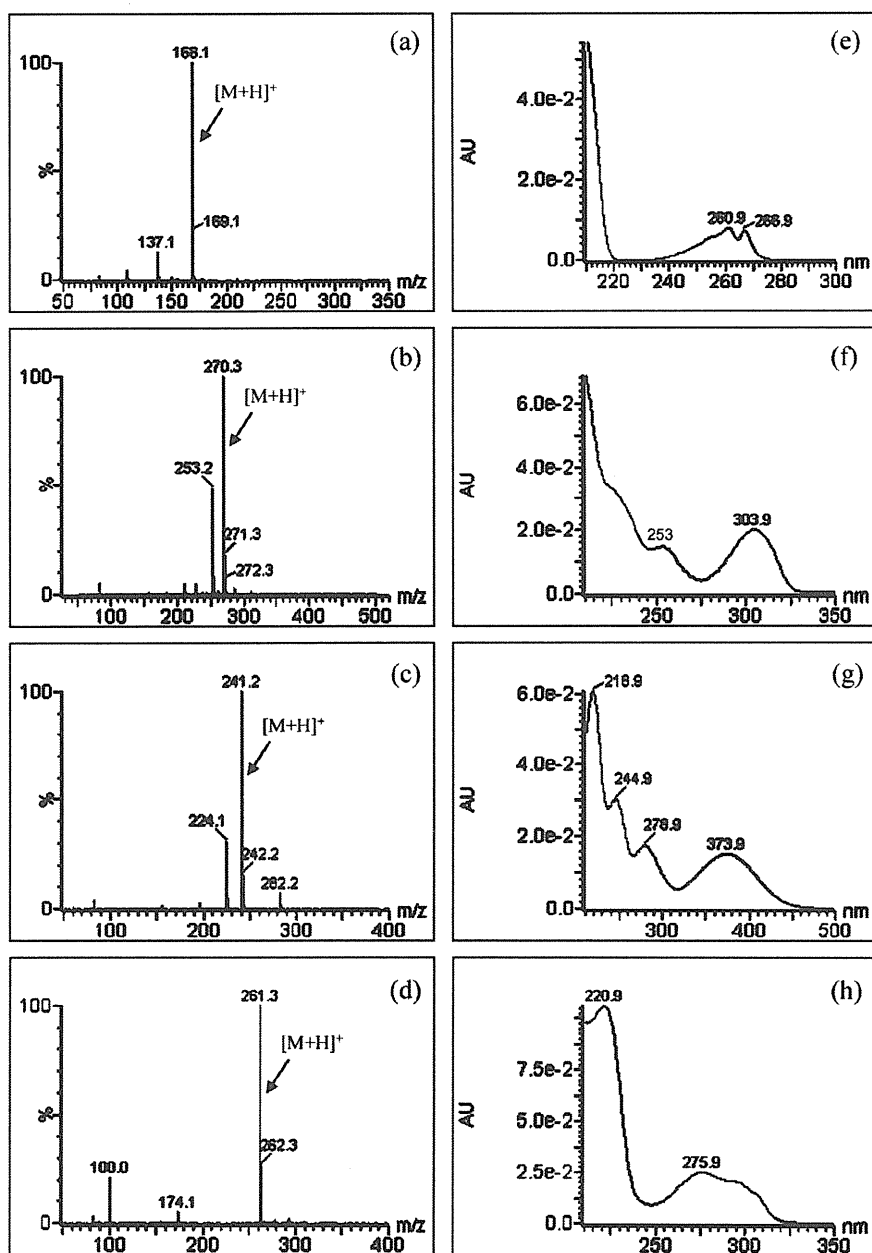


Fig. 3. HPLC-ESI Mass and UV Data of Compounds 1-4

HPLC-ESI mass and UV spectra of the detected peaks at 6.3 min (1: *N*-Me-2-FMP, a and e), 18.2 min (2: ALEPH-4, b and f), 9.6 min (3: DON, c and g) and 12.4 min (4: 5-MeO-EPT, d and h).

及び *N*-メチル基 [δ_{H} 2.74 ppm (3H, s), δ_{C} 31.0 ppm] が観測された。また, δ_{C} 116.7, 123.9, 125.9, 130.8, 132.9, 162.6 ppm に C-F カップリングと考えられるピークがみられた (Table 1)。一方, δ_{H} 7.14, 7.18, 7.32, 7.34 ppm (each 1H) に観測された4つのアロマティックプロトンは, 1, 2 置換ベンゼンと推定されるカップリングを示したことから, AA'BB'型のカップリングを示す *N*-Me-4-FMP とは異なる化合物と考えられた (Fig. 1 and Table 1)。⁵⁾ さらに

HMQC, HMBC, DQF-COSY, NOE を測定, 解析した結果 (Fig. 4), Compound 1 は, *N*-Me-4-FMP の位置異性体である 1-(2-fluorophenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (*N*-Me-2-FMP) と同定した (Fig. 1 and Table 1)。

2. Compound 2 の同定 GC-MS 分析の結果, 保持時間 26.30 分に Compound 2 のピークが検出され, m/z 269 に $[M]^+$ の分子イオンピークが観測された [Figs. 2(a) and (d)]. 一方, LC-MS

Table 1. NMR Data of Chemical Drugs^{a)}

No.	<i>N</i> -Me-2-FMP in methanol- <i>d</i> ₄			ALEPH-4 in methanol- <i>d</i> ₄			DON in DMSO- <i>d</i> ₆		
	¹³ C	¹ H	HMBC ^{b)}	¹³ C	¹ H	HMBC ^{b)}	¹³ C	¹ H	HMBC ^{b)}
1	33.5	3.17, 1H, dd, <i>J</i> =13.6, 4.8 Hz 2.86, 1H, dd, <i>J</i> =13.6, 9.3 Hz	2, 3, 1', 2', 6' 2, 3, 1', 2', 6'	38.7	2.78, 2H, m	2, 3, 1', 2', 6'	35.0	2.95, 1H, dd, <i>J</i> =13.0, 6.7 Hz 2.83, 1H, dd, <i>J</i> =13.0, 6.7 Hz	2, 3, 1', 2', 6' 2, 3, 1', 2', 6'
2	56.8	3.48, 1H, m	1, 3, 1', <i>N</i> -Me	48.8 ^{d)}	3.36, 1H, m	1, 3, 1'	46.6	3.46, 1H, q, <i>J</i> =6.7 Hz	1, 3, 1'
3	15.7	1.24, 3H, d, <i>J</i> =6.5 Hz	1, 2	20.5	1.17, 3H, d, <i>J</i> =6.5 Hz	1, 2	18.4	1.14, 3H, d, <i>J</i> =6.7 Hz	1, 2
1'	123.9, d, <i>J</i> =14.4 Hz ^{c)}	—	—	127.0	—	—	132.2	—	—
2'	162.6, d, <i>J</i> =244.2 Hz ^{c)}	—	—	152.9	—	—	150.8	—	—
3'	130.8, d, <i>J</i> =7.2 Hz ^{c)}	7.34, 1H, m, overlapped	1', 2', 5'	117.2	6.96, 1H, s	1', 2', 4', 5'	107.6	7.51, 1H, s	1', 2', 4', 5'
4'	116.7, d, <i>J</i> =23.1 Hz ^{c)}	7.14, 1H, ddd, <i>J</i> =10.3, 7.9, 1.0 Hz	2', 5'	123.9	—	—	137.9	—	—
5'	125.9, d, <i>J</i> =2.9 Hz ^{c)}	7.18, 1H, td, <i>J</i> =7.9, 1.0 Hz	1', 3', 4', 6'	154.3	—	—	146.3	—	—
6'	132.9, d, <i>J</i> =4.3 Hz ^{c)}	7.32, 1H, m, overlapped	1, 2', 5'	115.9	6.82, 1H, s	1, 2', 4', 5'	117.6	7.28, 1H, s	1, 2', 4', 5'
1''	—	—	—	37.5	3.49, 1H, m	4', 2''/3''	—	—	—
2''/3''	—	—	—	23.4	1.22, 6H, d, <i>J</i> =6.5 Hz	1''	—	—	—
2'-OMe	—	—	—	56.4	3.79, 3H, s	2'	56.5	3.81, 3H, s	2'
5'-OMe	—	—	—	56.9	3.81, 3H, s	5'	57.2	3.88, 3H, s	5'
NH ₂	—	—	—	—	—	—	—	8.00, 2H, brs	—
<i>N</i> -Me	31.0	2.74, 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. ^{c)} Observed as doublet signals by coupling with fluorine. ^{d)} Recorded in methanol-¹²C-*d*₄.

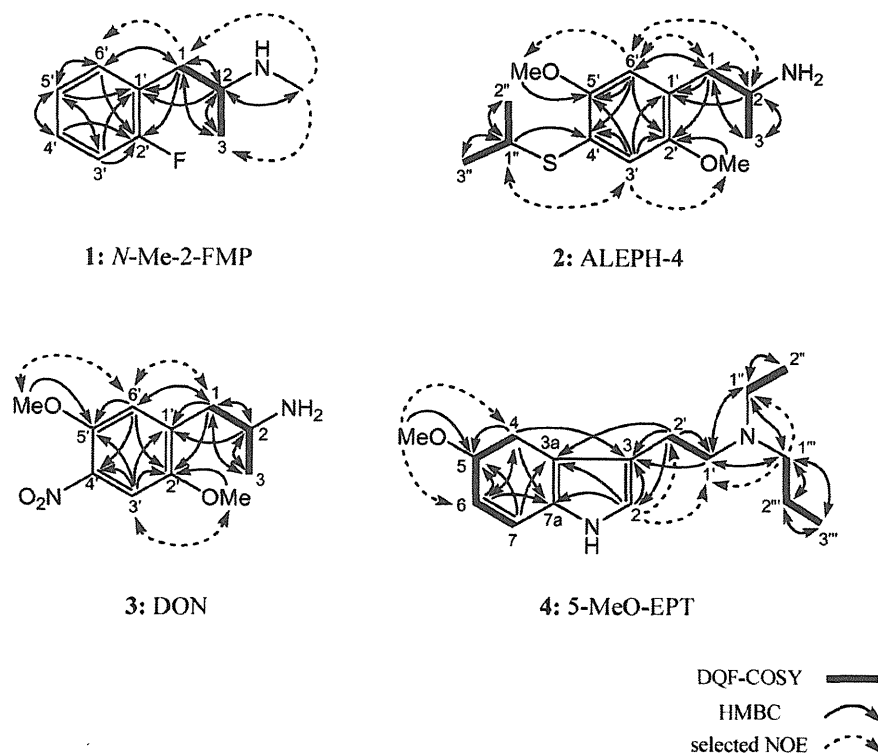


Fig. 4. HMBC, DQF-COSY and NOE Correlations of Compounds

分析では、18.2分に m/z 270 $[M+H]^+$ のピークが観測され [Fig. 3(b)], UV スペクトルは Fig. 3(f) に示す通りであった。さらに、DART-TOFMS による精密質量分析では、 m/z 270.15351 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、組成式は、 $C_{14}H_{24}NO_2S$ (理論値 270.15277, +0.74 mmu) と推定された。次に、NMR 測定を行ったところ、メチル基 [δ_H 1.17 ppm (3H, d, $J=6.5$ Hz), δ_C 20.5 ppm], 2つのメトキシ基 [δ_H 3.79, 3.81 ppm (each 3H, s), δ_C 56.4, 56.9 ppm] 及びイソプロピル基 [δ_H 1.22 (6H, d, $J=6.5$ Hz), 3.49 (1H, m)] と考えられるピークが観測された (Table 1)。また、2つのシングレットアロマティックプロトン [δ_H 6.82, 6.96 ppm (each 1H, s)] のピークが観測されたことから、2は1, 2, 4, 5置換ベンゼン構造を有すると推定された。さらに、1次元NOEを測定した結果、 δ_H 6.96 ppmのアロマティックプロトン (H-3') は、2'位のメトキシ基及びイソプロピル基 (H-1'') と相関がみられ、一方、 δ_H 6.82 ppmのアロマティックプロトン (H-6') は、5'位のメトキシ基、メチレン (H-1) 及びメチン (H-2) と相関がみられた (Fig. 4)。さらに、各種2次元NMRを測定、解析した結果 (Fig. 4)、Compound 2は、1-(2,5-dimethoxy-4-isopropylsulfanylphenyl) propan-2-amine (ALEPH-4) と同定した (Fig. 1 and Table 1)。

3. Compound 3 の同定 GC-MS 分析を行った結果、保持時間 26.61 分に Compound 3 のピークが検出され [Fig. 2(b)], そのマススペクトルは Fig. 2(e) に示す通りであり、 m/z 240 に $[M]^+$ の分子イオンピークが検出された。LC-MS 分析では、9.6 分に m/z 241 $[M+H]^+$ のピークが観測され [Fig. 3(c)], UV スペクトルは Fig. 3(g) に示す通りであった。さらに、DART-TOFMS による精密質量分析では、 m/z 241.11955 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、組成式は、 $C_{11}H_{17}N_2O_4$ (理論値 241.11883, +0.72 mmu) と推定された。次に、NMR 測定を行ったところ、メチル基 [δ_H 1.14 ppm (3H, d, $J=6.7$ Hz), δ_C 18.4 ppm] 及び2つのメトキシ基 [δ_H 3.81, 3.88 ppm (each 3H, s), δ_C 56.5, 57.2 ppm] のピークが観測された (Table 1)。また、2つのシングレットアロマティックプロトン [δ_H 7.28, 7.51 ppm (each 1H, s)] のピークが観測されたことから、3は1, 2, 4, 5置換ベンゼン構造を有

すると推定された。さらに、1次元NOEを測定した結果、 δ_H 7.51 ppmのアロマティックプロトン (H-3') は、2'位のメトキシ基と相関がみられ、一方、 δ_H 7.28 ppmのアロマティックプロトン (H-6') は、5'位のメトキシ基及びメチレン (H-1) と相関がみられた (Fig. 4)。さらに、各種2次元NMRを測定、解析した結果 (Fig. 4)、Compound 3は、1-(2,5-dimethoxy-4-nitrophenyl) propan-2-amine (DON) と同定した (Fig. 1 and Table 1)。

4. Compound 4 の同定 Compound 4 については、前述同様に GC-MS 分析を行ったところ、保持時間 38.74 分にピークが検出され [Fig. 2(a)], そのマススペクトルは Fig. 2(f) に示す通りであった。LC-MS 分析では、12.4 分に m/z 261 $[M+H]^+$ のピークが観測され [Fig. 3(d)], UV スペクトルは Fig. 3(h) に示す通りであった。さらに、DART-TOFMS による精密質量分析では、 m/z 261.19677 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、組成式は、 $C_{16}H_{25}N_2O$ (理論値 261.19669, +0.08 mmu) と推定された。次に、NMR 測定を行ったところ、2つのメチレンのピーク [C-1' (δ_H 3.24 ppm (2H, dd, $J=16.2, 7.6$ Hz), δ_C 54.0 ppm), C-2' (δ_H 3.09 ppm (2H, m), δ_C 21.8 ppm)] 及びメトキシ基のピーク [δ_H 3.82 ppm (3H, s), δ_C 56.3 ppm] が観測された (Table 2)。また、 δ_H 6.78 (1H, dd, $J=9.0, 2.4$ Hz), 7.04 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 7.24 ppm (1H, d, $J=9.0$ Hz) に1, 2, 4置換ベンゼンと推定されるカップリングを示す3つのアロマティックプロトンが観測されるとともに、 δ_H 7.13 ppm (1H) にシングレットのアロマティックプロトンが観測された (Table 2)。さらに、エチル基 [C-1'' (δ_H 3.14 ppm (2H, q, $J=7.4$ Hz), δ_C 48.9 ppm), C-2'' (δ_H 1.27 ppm (3H, t, $J=7.4$ Hz), δ_C 9.8 ppm)] と考えられるピークが観測された。これら結果は、指定薬物である 5-MeO-EIPT のスペクトルデータに酷似していた。⁵⁾ しかし、5-MeO-EIPT のイソプロピル基に由来するピークは観測されず、⁵⁾ 代わりにプロピル基 [C-1''' (δ_H 2.98 ppm (2H, m), δ_C 55.5 ppm), C-2''' (δ_H 1.69 ppm (2H, m), δ_C 19.0 ppm), C-3''' (δ_H 0.98 ppm (3H, t, $J=7.4$ Hz), δ_C 11.5 ppm)] と考えられるピークが観測された (Table 2)。さらに各種2次元NMRを測定、解析した結果 (Fig. 4)、Compound 4は、*N*-ethyl-5-methoxy-*N*-propyltryptamine

Table 2. NMR Datum of 5-MeO-EPT^{a)}

No.	5-MeO-EPT in methanol- <i>d</i> ₄		
	¹³ C	¹ H	HMBC ^{b)}
2	124.6	7.13, 1H, s	3', 3'a, 7'a
3	110.7	—	—
3a	128.5	—	—
4	100.9	7.04, 1H, d, <i>J</i> =2.4 Hz	3', 5', 6', 7'a
5	155.2	—	—
6	112.8	6.78, 1H, dd, <i>J</i> =9.0, 2.4 Hz	4', 5', 7'a
7	113.2	7.24, 1H, d, <i>J</i> =9.0 Hz	5', 3'a
7a	133.5	—	—
1'	54.0	3.24, 2H, dd, <i>J</i> =16.2, 7.6 Hz	3', 1'', 1'''
2'	21.8	3.09, 2H, m, overlapped	1, 2', 3', 3'a
1''	48.9	3.14, 2H, q, <i>J</i> =7.4 Hz, overlapped	1, 2', 1'''
2''	9.8	1.27, 3H, t, <i>J</i> =7.4 Hz	1''
1'''	55.5	2.98, 2H, m	1, 1'', 2'', 3'''
2'''	19.0	1.69, 2H, m	1''', 3'''
3'''	11.5	0.98, 3H, t, <i>J</i> =7.4 Hz	1''', 2'''
OMe	56.3	3.82, 3H, s	5'

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.

(5-MeO-EPT) と同定した (Fig. 1 and Table 2).

N-Me-2-FMP, ALEPH-4, 5-MeO-EPT は、それぞれ、平成 21 年 1 月より規制された指定薬物である *N*-Me-4-FMP, ALEPH-2, 5-MeO-EIPT の構造類似体であった (Fig. 1)。また、DON は、セロトニン受容体 (5-HT₂) のアンタゴニストである 2-(2,5-dimethoxy-4-nitrophenyl) ethanamine (2C-N)⁶⁾ の誘導体であった (Fig. 1)。なお、*N*-Me-2-FMP, 5-MeO-EPT は今回初めて同定されたものであり、ALEPH-4, DON については国内で初めて流通が認められたものである。DON は液体試料から検出され、ほかの 3 化合物は、いずれも同一粉末製品中から検出された。

考 察

N-Me-2-FMP は、今回初めて同定された化合物であった。一方、*N*-脱メチル化体である 1-(2-fluorophenyl) propan-2-amine (2-FMP) は、ドイツ及び日本での流通が報告されているが^{7,8)} 薬理作用に関しては不明である。しかし、2-FMP の異性体である 1-(3-fluorophenyl) propan-2-amine (3-FMP) や、指定薬物である 1-(4-fluorophenyl) propan-2-amine (4-FMP) は、モノアミン取り込み阻害作用

やモノアミン遊離作用などの中枢興奮効果を示すことが報告されている。⁹⁻¹²⁾ また、われわれの行った実験でも、4-FMP 及び *N*-Me-4-FMP 投与後のラットに自発運動量及び覚醒量の有意な増加がみられた。¹³⁾ したがって、その構造類似性から、*N*-Me-2-FMP にも同様の中枢作用を示す可能性が懸念される。ALEPH-4 に関しては、これまでに薬理作用の報告はないが、幻覚性物質 mescaline を指標とした Quantitative structure-activity relationships (QSAR, 定量的活性相関) などの化学計算を用いたいくつかの評価法では、本化合物の強い幻覚活性が示唆されている。¹⁴⁻¹⁶⁾ DON の薬理作用に関しては、5HT₂ に対する親和性を持つことや、弁別試験により依存性を有することが既に報告されている。^{6,17,18)} また、5-MeO-EPT は今回初めて同定された化合物であるが、指定薬物である 5-MeO-EIPT のイソプロピル基がプロピル基に置換された化合物である。⁵⁾ したがって、その構造類似性から、同様の中枢作用を示すことが予想される。

今回検出された 4 化合物のうち、3 化合物が、平成 21 年 1 月に規制された指定薬物の構造類似体であったことから、今後も、多くの新たな構造類似化合物が違法ドラッグ成分として流通する可能性が危惧される。また、製品中に単一の違法ドラッグ成分を混入させるだけでなく、同一製品中に数種類の違法ドラッグ成分を混入させるケースが今後増加することも予想される。

結 論

平成 20 年度に違法ドラッグ市場において買い上げられた製品について、GC-MS, LC-MS 及び NMR により分析を行い、新規流通違法ドラッグ成分として、フェネチルアミン系化合物である *N*-Me-2-FMP, ALEPH-4, DON, 及びトリプタミン系化合物である 5-MeO-EPT の 4 化合物を同定した。なお、*N*-Me-2-FMP, 5-MeO-EPT は今回初めて同定された化合物であり、ALEPH-4, DON については国内で初めて流通が認められた化合物である。本研究結果は、今後も流通が予想される新規違法ドラッグ成分や、既知の法的規制薬物を判断する際の有用な科学的資料の 1 つであると考えられる。

謝辞 本研究は、厚生労働科学研究費補助金並

びに厚生労働省医薬品審査等業務庁費で行われたものであり、関係各位に深謝致します。

REFERENCES

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/11/s1109-4.html>, cited 15 July, 2009.
- 2) Kikura-Hanajiri R., Kawamura M., Uchiyama N., Ogata J., Kamakura H., Saisho K., Goda Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 971–979 (2008).
- 3) Uchiyama N., Kawamura M., Kamakura H., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 981–987 (2008).
- 4) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/09/s0920-4.html>, cited 15 July, 2009.
- 5) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Goda Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1499–1505 (2008).
- 6) Acuña-Castillo C., Villalobos C., Moya P. R., Sáez P., Cassels B. K., Huidobro-Toro J. P., *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 510–519 (2002).
- 7) Rösner P., Quednow B., Girreser U., Junge T., *Forensic Sci. Int.*, **148**, 143–156 (2005).
- 8) Nonaka R., Nagai F., Ogata A., Satoh K., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2328–2333 (2007).
- 9) Marona-Lewicka D., Rhee G. S., Sprague J. E., Nichols D. E., *Eur. J. Pharmacol.*, **287**, 105–113 (1995).
- 10) Wee S., Anderson K. G., Baumann M. H., Rothman R. B., Blough B. E., Woolverton W. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**, 848–854 (2005).
- 11) Negus S. S., Mello N. K., Blough B. E., Baumann M. H., Rothman R. B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **320**, 627–636 (2007).
- 12) Nagai F., Nonaka R., Satoh K., Kamimura H., *Eur. J. Pharmacol.*, **559**, 132–137 (2007).
- 13) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., Wada M., Urade Y., Abstracts of papers, the 26th Congress of the Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP), Munich, July 2008, p. 235.
- 14) Clare B. W., *J. Med. Chem.*, **33**, 687–702 (1990).
- 15) Altun A., Golcuk K., Kumru M., Jalbout A. F., *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 3861–3868 (2003).
- 16) Thakur M., Thakur A., Khadikar P. V., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 825–831 (2004).
- 17) Glennon R. A., Young R., Benington F., Morin R. D., *J. Med. Chem.*, **25**, 1163–1168 (1982).
- 18) Glennon R. A., Titeler M., McKenney J. D., *Life Sci.* **35**, 2505–2511 (1984).

Simple and Rapid Screening for Target Compounds Using Direct Analysis in Real Time (DART)-MS

Direct Analysis in Real Time (DART)-MS を用いた前処理不要の迅速分析法

花尻 (木倉) 瑠理

Ruri Kikura-Hanajiri

国立医薬品食品衛生研究所生薬部
東京都世田谷区上用賀1-18-1Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Direct Analysis in Real Time (DART) is a new ionization technique that was developed and first reported in 2005 for the ambient ionization of samples independent of whether in a solid, liquid or gaseous state. Any material directly exposed to the DART gas stream will rapidly generate ions that are carried by the stream into the sampling orifice of the mass spectrometer (MS) atmospheric pressure interface. The most important advantages of this technique are a rapid analysis time (a few seconds) and a reduction in sample preparation. DART reaches its full potential in combination with a high resolution MS because it is possible to instantaneously estimate elemental compositions of

test materials through exact mass measurement. It has a very wide range of applications; for example, in reaction monitoring, direct analysis of TLC plates, searches for constituents in raw materials of plants or in plant tissue culture, the investigation of various products of foods and in pharmaceuticals, biological analyses, and forensic sciences. Although it is difficult to estimate matrix effects caused by other ingredients, DART-MS should be useful in simple and rapid screening for targeted compounds in various types of material because it provides molecular information without time-consuming extraction and pre-treatment steps.

1. はじめに

近年、様々な物質の分析手段として質量分析法が使用されている。新たなイオン源の開発により、適用範囲が広がり、多種多様な化合物を分析することが可能となってきたが、これらのイオン化法は試料に高温・高電圧、レーザー照射等の負荷をかける必要があるため、基本的には密閉された状態のイオン源を使用することになる。Direct Analysis in Real Time (DART) は、大気圧下で完全に解放された状態で、様々な形態の試料のイオン化を可能とする新しい技術として近年開発されたイオン化法である¹⁾。この装置を質量計 (mass spectrometer; MS) に接続することで、前処理無しに試料中の化合物のマスペクトルを測定することが可能である。特に、高分解能の飛行時間型質量分析計 (time of flight mass spectrometer; TOFMS) を用いることで、精密質量測定に基づく元素組成推定が可能となる。DARTは、液体、固体等の

試料形態を問わず、試料をそのままイオン源にかざすだけで表面の物質がイオン化され分子量の測定が可能であるため、成分分析の簡便化、迅速化が期待できる。すでにDARTを使用した食品中の異物²⁻⁶⁾・防かび剤⁷⁾、天然物 (食品成分を含む)⁸⁻¹¹⁾、玩具や食品容器包装中の添加剤^{12, 13)}、植物培養細胞・組織中成分¹⁴⁻¹⁶⁾、飲料水中アクリルアミド¹⁷⁾、医薬品¹⁸⁻²⁰⁾、生体試料中の代謝物²¹⁻²³⁾、香料²⁴⁾、細菌細胞の脂肪酸²⁵⁾、違法薬物・植物^{26, 27)}、書類上のインク²⁸⁾、その他様々な分析適用例が報告されている²⁹⁻³¹⁾。最近では、抗インフルエンザA型 (H1N1) 活性を有するエルダーベリー果実抽出物について、抽出物とウイルスをインキュベーションした後、ウイルス表面に結合している化合物を直接DART-TOFMSで分析することにより、活性化化合物の探索を行っている研究も報告されている³¹⁾。本稿では、DARTイオン化法について簡単に解説するとともに、我々の研究結果を中心に、違法植物製品の成分分析及びいわゆる健康食品中に違法に添加された医薬品成分の分析への適用例について紹介する。

2. DARTイオン化法

2-1. DARTイオン化法の原理

DARTのイオン化原理は、励起状態の原子・分子が大気ガス及び試料と相互作用することに基づく(図1)^{1, 32, 33)}。DARTに導入されたガス(主にヘリウムもしくは窒素)はニードル電極の放電によりプラズマを発生する。プラズマ中の荷電粒子の大部分はディスク電極及びグリッド電極により除去され、励起状態の中性気体分子のみが大気ガス中へ放出される。この時、ヒーターによりガスを加熱することで試料の気化及び物質表面からの熱脱着を促進し、より効率的にイオン化を行うことが可能となる。ヘリウムを使用した場合の正イオン化機構は、励起状態のヘリウムと大気中の水分子が相互作用することにより生成する水のクラスターイオンの形成とこれに基づくプロトン移動反応と考えられており、試料と反応して主に $[M+H]^+$ が形成される。また、負イオン化機構は、同様に大気中の水分子及び酸素分子との相互作用に基づくプロトン移動反応であると推定され、主に $[M-H]^-$ が形成される。イオン化効率、DARTに導入するガス流量や温度により変化する^{22, 34)}。

2-2. TLCとDARTイオン化法

上述したように、大気圧下で完全に解放された状態で、試料形態を問わず直接イオン化を行うため、薄層クロマトグラフィー(TLC)のプレート上で分離した試料成分を直接分析することも可能である^{6, 9, 17, 35, 36)}。この際、プレート上にグリセロールを塗布することにより、固定相に強く吸着してしまう

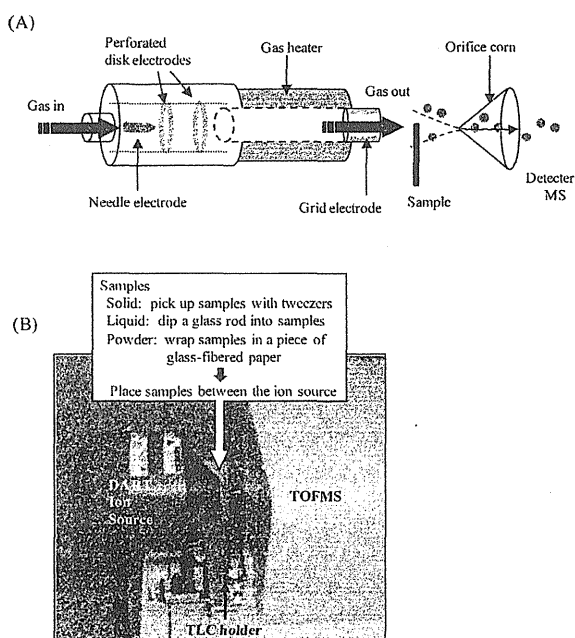


図1. DARTイオン化のしくみ¹⁾

試料に対する感度向上や、熱による脱水などの分解を緩和する効果が期待できる³⁶⁾。TLCは簡便な分離手法であり、複雑なマトリックスを有する試料の一次スクリーニング分析にも使用されるが、分離した成分の確認については、UV吸収や呈色試薬に頼らざるをえず、特異性が十分とは言えない。DART-TOFMSを使用することにより、分取・精製等の操作を加えることなく、TLCプレート上分離した成分の元素組成推定が可能となり、特に天然化合物の単離固定や有機合成の過程において有用な分析手法になると考えられる。

2-3. DART-MS測定における再現性と定量性

DART-MS測定は、「試料をイオン源にかざすだけ」という試料導入法であるが故に、再現性及び定量性の低さが問題とされてきた。しかし、ここ数年で、イオン化用ガスの噴出角度の可変性や、固体や液体等、試料の形態に対応した自動サンプル導入用装置が開発され、一定の条件下で試料のイオン化が可能となり、データの信頼性が向上した²¹⁾。また、高流量を必要とするイオン化用ガスの質量分析装置への影響を抑えるために、質量分析装置とのインターフェイス部分に真空ポンプを接続して質量分析装置内の真空バランスを保ち効率的にイオンを導入することにより、感度も向上している²¹⁾。Shaoxia Yuらは、DARTにタンデム四重極型質量分析計を接続し(DART-MS/MS)、血漿試料中の様々な薬物の測定を行い、自動サンプル導入用装置を用いた際の分析の再現性、感度、精度を検討している²⁰⁾。その結果、ラット血漿中ベンゾイルエグニン(乱用薬物コカインの主代謝物)の分析では、 $1\mu\text{M}$ 濃度における連続注入時($n=9$)のピーク高さの再現性(% CV)は3.1%であった。また、 2ng/mL から $20\mu\text{g/mL}$ の4ケタにわたる広い濃度範囲で直線性が得られ、精度(% CV)及び正確度(% Bias)共に良好な結果を示した。さらに、本システムを薬物投与ラットの薬物動態解析に適用したところ、液体クロマトグラフ装置(LC)にMS/MSを接続して分離測定した場合と、DART-MS/MSを用いて直接測定した場合の血漿中薬物濃度に大きな差異は認められなかった。用いる試料(血漿、組織ホモジネート、肝マイクロゾーム等)や対象とする化合物によりマトリックス効果は異なり、テストステロンのように、化合物によっては簡単な前処理を行わないと検出が困難な例もあるが、薬物動態の検討など、定量性が必要とされる多試料の迅速分析にも、DART-MSは適用可能と考えられる。

3. 違法植物の成分分析への応用例

3-1. 植物系違法ドラッグ製品の成分分析²⁷⁾

近年、麻薬や覚せい剤などの代用として、違法ドラッグと呼ばれる様々な化学物質や植物が法律の規制枠を逃れて販

売、乱用されている。違法ドラッグとは、一般に、麻薬及び向精神薬取締法上の「麻薬」または「向精神薬」には指定されていないが、それらと類似の有害性を有することが疑われる物質（人為的に合成されたもの、天然物及びそれに由来するものを含む）であり、もっぱら人の乱用に供することを目的として製造、販売等されるものを示す。違法ドラッグ製品は比較的安価で、一時は繁華街の路上やアダルトショップ、インターネットなどで容易に入手が可能であったことから、特に青少年の間で蔓延し、健康被害や社会的弊害が大きな問題となった。これらの問題に対処すべく、2006年度（平成18）の薬事法改正により、平成19年4月より指定薬物制度が施行され、違法ドラッグに対する規制が強化された。しかし一方で、規制が厳しくなった化学合成化合物の代替品として、植物を原料とした製品（植物系違法ドラッグ製品）の流通が深刻な問題となっている。これらの製品は、幻覚等の作用を標榜し、乾燥植物の葉、樹皮、種子、樹脂、粉末など多様な形態で販売されたり、数種類の植物細片が混合された形態で販売されているが、実際にどのような植物や成分が含まれているか明らかとなっていないものが多い。そのため、まずは、個々の植物の活性成分についての研究を行うとともに、実際の製品を分析するための、効率の良いスクリーニング手法の検討が重要な課題となっている。我々は乾燥植物、樹脂、粉

末等の形態を有する植物系違法ドラッグ36製品（インターネット流通品）について、抽出操作等の前処理を行わずに、DART-TOFMSを用いて、代表的な植物由来幻覚成分であるサルビノリンA、メスカリン、ハルミン、ハルマリン、*N,N*-ジメチルトリプタミン及びリゼルグアミドの6化合物の検出を試みた（図2）。その結果、21製品から分析対象とした6化合物のいずれかに相当する $[M+H]^+$ イオンが主なピークと

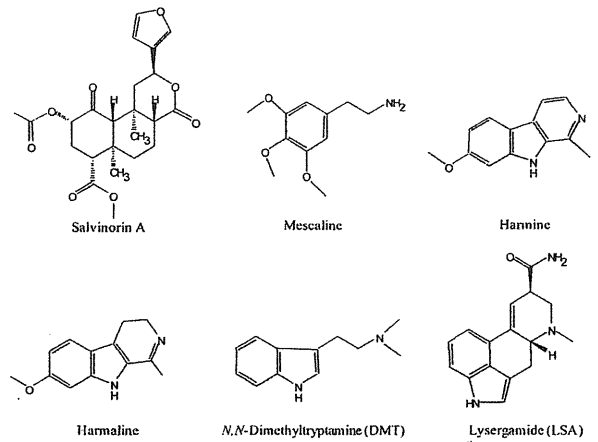


図2. 分析対象とした植物系違法ドラッグ製品に含まれる主な幻覚成分

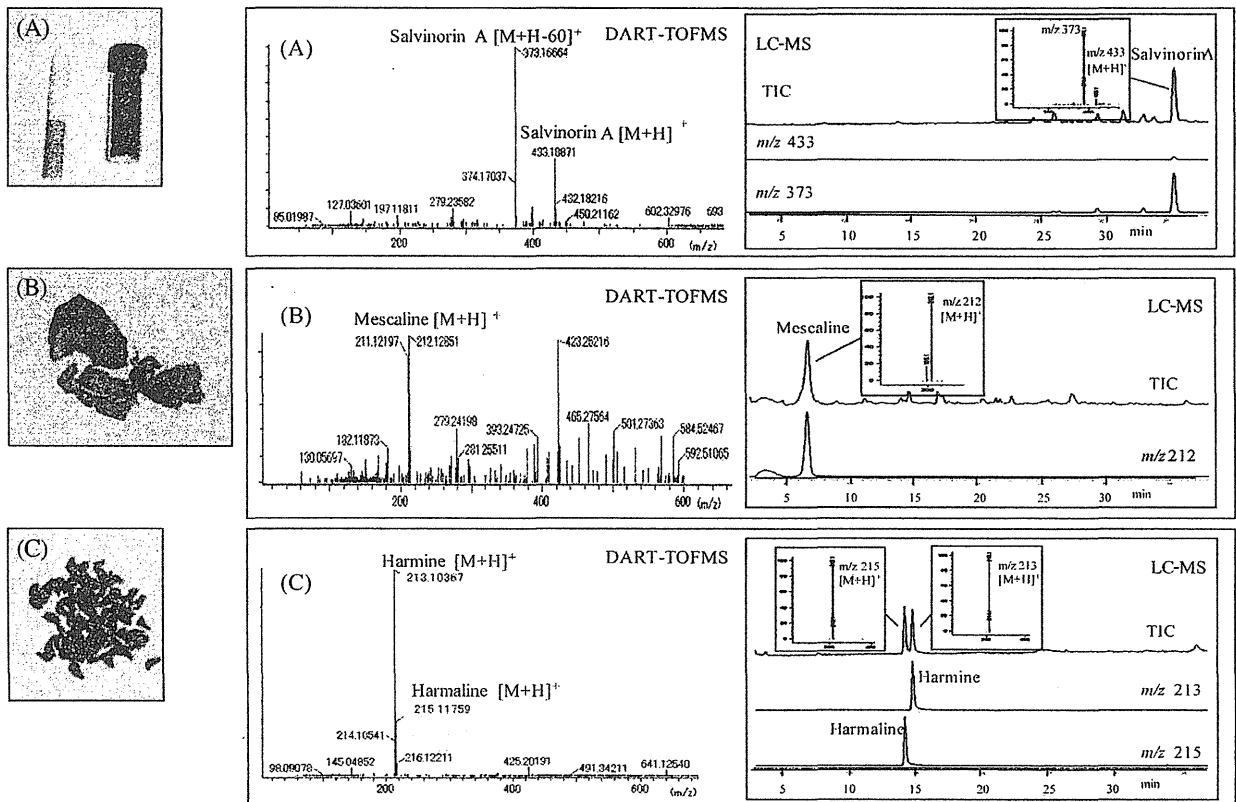


図3. 各植物系違法ドラッグ製品の形態、DART-TOFMSのマスペクトル及びメタノール抽出物のLC-MSイオンクロマトグラム
 (A) “サルビア”（乾燥葉試料、幻覚成分サルビノリンA含有）、(B) “サンペドロ”（乾燥サボテン試料、幻覚成分メスカリン含有）、
 (C) “ハルマラ”（種子試料、ハルミン及びハルマリン含有）

して検出され、さらに精密質量値より化合物の組成推定を行うことで、含有成分の推定が可能であった。また、別途行った各製品のメタノール抽出物のLC-MS測定結果とDART-TOFMS測定結果を比較したところ、検出化合物は両測定方法で完全に一致した。これら製品の測定結果の代表例を図3に示す。以上の結果から、今回分析対象とした植物由来幻覚成分を製品中から検出するのに、DART-TOFMSを用いた分析は優れた方法であることが示された。通常、これら植物試料をLC-MSで分析する際には、前処理に加え分離分析時間が1試料あたり1時間程度必要であるが、DART-TOFMSを用いた分析では前処理が不要で、測定時間も1分程度と非常に迅速である。さらにDART測定に必要な試料は微量で、植物の場合、葉1枚、種子1粒から目的成分を検出できる。したがって、少ない試料量しかなくても、同一試料をLC-MS等の他分離分析手法の試料としても用いることが可能であり、スクリーニング分析結果の信頼性を高めることができる。一次スクリーニングをDART-TOFMSで行った後、LC-MSやガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) 等の分離分析手段を用いて成分の同定、定量を行うという一連の手法が植物違法ドラッグの分析法として有用であると考えられた。

3-2. 法律で厳しく規制される植物の麻薬成分分析²⁷⁾

大麻取締法、麻薬及び向精神薬取締法及びあへん法等の法律で厳しく栽培や所持等が規制されている植物試料として、大麻 (*Cannabis sativa* L.)、シロシピン・シロシンを含有する幻覚性きのこ類 (いわゆるマジックマッシュルーム) 及びあへん (けし *Papaver somniferum* L. 及び *Papaver setigerum* DC. の未熟な蒴果に傷をつけて流れ出る乳汁を乾燥して凝固したもの) に着目し、これら試料中の主活性成分分析にDART-TOFMSを適用した。図4に分析対象とした各植物に含有される主な活性成分の構造を記載した。また、図5に各植物の

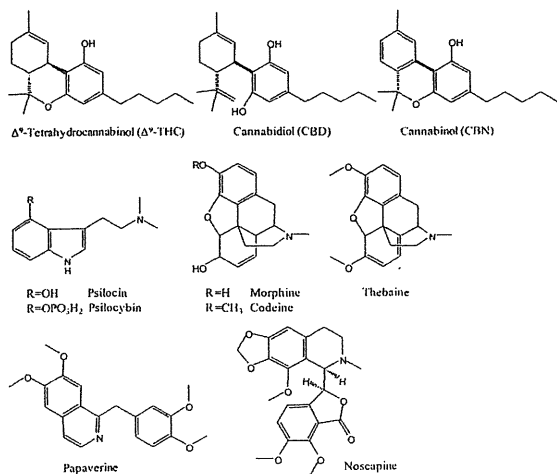


図4. 分析対象とした法規制植物に含まれる主な活性成分

DART-TOFMS測定結果を示した。

大麻試料では、乾燥葉及び細片化した乾燥葉を詰めたタバコ状の試料を直接イオン源にかざしたところ、代表的な大麻由来活性成分Δ⁹-テトラヒドロカンナビノール (Δ⁹-THC) とカンナビジオール (CBD) 及びカンナビノール (CBN) の [M+H]⁺に相当するイオンを主なピークとして検出することが可能であった。また、精密質量の測定値から、THC/CBD及びCBNのプロトン付加体の組成式C₂₁H₃₁O₂及びC₂₁H₂₇O₂が推定可能であった。しかし、DART-TOFMSでは、同一の組成式を有するTHCの異性体 (Δ⁹-THCやΔ⁸-THC等) やCBDを識別することはできなかった。一方、乾燥したマジックマッシュルームの試料片を直接イオン源にかざしたところ、シロシンの [M+H]⁺に相当するイオンを主ピークとして検出することが可能であり、精密質量の測定値からシロシンのプロトン付加体の組成式C₁₂H₁₇N₂Oが推定可能であった。しかし、他主活性成分のひとつであるシロシピンに相当する質量のイオンピークは検出されなかった。シロシピンは熱等により容易に脱リン酸化されシロシンに分解されることが知られていることから、本測定においても、イオン化時の熱によりシロシンに分解されて検出されたものと考えられた。一方、あへ

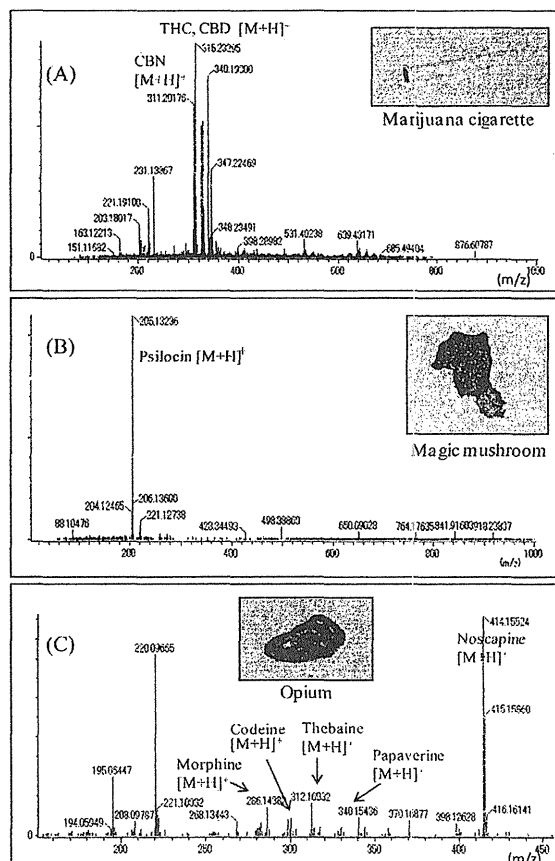


図5. 法規制植物試料のDART-TOFMSのマスペクトル (A) 大麻 (マリファナシガレット、THC、CBD及びCBN含有)、(B) マジックマッシュルーム (乾燥きのこ片、シロシン含有)、(C) あへん (樹脂、モルヒネ、コデイン、テバイン、パバペリン、ノスカピン含有)