

分担研究課題:法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究
分担研究者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

—“脱法ハーブ”喫煙ヒト生体試料中違法ドラッグ成分の定量分析—

研究要旨: “脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送 1 事例において, 生体試料中含有薬物の検討を行った. 関与が疑われた製品(乾燥植物細片混合物)の抽出物をGC-MS及びLC-MSで測定した結果, 合成カンナビノイド 5F-QUPIC が主に検出され, カチノン系化合物 α -PHPP も検出された. 血清試料においては, 救急搬送後 6 日にわたって採取されたものを分析した. 未変化体 5F-QUPIC 及び α -PHPP, また代謝物計 9 化合物を分析対象とし, LC-MS/MS MRM でスクリーニング分析を行うと共に, 未変化体及び 4 種類の代謝物については定量分析を行った. その結果, 6 日にわたって未変化体 5F-QUPIC 及び α -PHPP が検出され, 1 日目の血清試料からは, 5F-QUPIC 3-carboxyindole 体が検出された. 5F-QUPIC は, 平成 24 年度後半から 25 年度前半に違法ドラッグ製品中から最も多く検出され健康被害も報告された化合物であり, JWH-018 よりも約 400 倍強い CB₁ 受容体親和性が認められている. 平成 25 年 11 月 20 日より指定薬物として規制されているが, 今後もその流通・乱用を注視していくべき化合物であると考えられる.

研究協力者

河村 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

林田 真喜子 日本医科大学法医学教室

A. 研究目的

近年, “脱法ハーブ”が起因した救急搬送事例や, 交通事故が多発している. 代表的な合成カンナビノイド, JWH-018(平成 24 年 8 月に麻薬として規制)は, 摂取すると ω -酸化体である JWH-018 *N*-(5-hydroxy) metabolite, JWH-018 pentatonic acid, さらに ω 1-酸化体である JWH-018 *N*-(4-hydroxy) metabolite の各グルクロン酸抱合体がヒト尿中に主に排泄されることが報告されている¹⁾⁻³⁾. また, K. C. Chimalakonda らは, JWH-018 の *N*-alkyl 側鎖末端にフルオロ基を有する AM2201(平成 25 年 5 月に麻薬として規制)について, ヒト肝ミクロゾーム, リコンビナント

P450s, ヒト尿中の代謝物を検討している⁶⁾. その結果, 酸化的脱ハロゲン化体である JWH-018 *N*-(5-hydroxy) metabolite 及び JWH-018 pentatonic acid が主代謝物として検出され, ω 1-酸化体である AM2201 *N*-(4-hydroxy) metabolite はマイナー代謝物として検出されることを明らかにしている. AM2201 の酸化的脱ハロゲン化体は, JWH-018 の主代謝物と同じ構造であることから, 各化合物に特異的な ω 1-酸化体 AM2201 *N*-(4-hydroxy) metabolite 及び JWH-018 *N*-(4-hydroxy) metabolite が摂取識別のマーカになると考えられている. 一方, 我々は, 平成 24 年度の報告書において, MAM-2201(平成 25 年 5 月に麻薬として規制)を主に含有する脱法ハーブが関与したと考えられる死亡 1 事例において, 生体試料中薬物の検討を行っている⁴⁾. その結果, 血清試料から, JWH-122 *N*-5OH, MAM-2201, JWH-122 pentatonic acid が検出さ

れたが、特異的代謝物である MAM-2201 *N*-(4-hydroxy) metabolite は検出されなかった。*N*-Alkyl 側鎖末端がハロゲンに置換された化合物においては、 ω 1-酸化が進みにくいことが予想され、JWH-122(平成 25 年 3 月に麻薬として規制)と MAM-2201 の摂取識別においては、未変化体もしくは JWH-122 摂取においては主代謝物のひとつと推測される ω 1-酸化体 JWH-122 *N*-(4-hydroxy) metabolite を検出する必要があると考えられた⁴⁾。

我々が継続的に行っているインターネット買い上げ違法ドラッグ製品含有薬物調査結果によると、5F-QUPIC (quinolin-8-yl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate, 平成25年11月に指定薬物として規制) は、平成24年度後半から平成25年度前半にかけて違法ドラッグ製品からもっとも多く検出された化合物である⁵⁾。AM2201 や MAM-2201 と同様にインドール構造の*N*-alkyl 側鎖末端にフルオロ基を有する化合物で、quinolinyl carboxyester 構造を有する。本化合物のカンナビノイドCB₁受容体親和性は、JWH-018 よりも約400倍強く⁶⁾、本化合物による健康危害が心配される。A. Wohlfarth の報告によると⁷⁾、ヒト肝細胞を用いた代謝実験で、5F-QUPIC は、carboxyester 部分が加水分解した *N*-(5-fluoropentyl)indole-3-carboxylic acid とともに、AM2201 や MAM-2201 と同様に 酸化的脱ハロゲン化体である QUPIC *N*-pentanoic acid や QUPIC *N*-(5-hydroxypentyl) 体等が検出されることが明らかとなっている。

本研究において我々は、5F-QUPIC を主に含有する「脱法ハーブ」製品を喫煙後救急搬送され、数日後に死亡した事例について、死亡者が所持していた違法ドラッグ製品及び死亡者の血清試料中の薬物分析を行ったので報告する。

(倫理面の配慮)

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会の承認を経て、各委員会の定める規定に則り遵守すべき規準に従って実施した。

B. 研究方法

1. 試料

違法ドラッグ製品: 救急搬送患者が所持していた乾燥植物細片 2 製品のうちの 1 製品(製品名不名)。

ヒト血清試料: 「脱法ハーブ」喫煙後救急搬送され、搬送後 6 日間にわたり血清試料(N-1~N-6)を採取。患者はその後死亡。

2. 試薬

以下の分析用標品は、Cayman 社製 (Ann Arbor, Michigan, USA) を使用した。合成カンナビノイド関連化合物は 0.1 mg/mL アセトニトリル溶液として、カチノン系化合物は 0.1 mg/mL メタノール溶液として調製し、適宜各溶媒で希釈して測定に用いた。Fig. 1 に各構造を示す。

- 1) 1-Phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)-1-heptanone HCl [α -PHPP HCl or PV8 HCl]
- 2) QUPIC *N*-(5-fluoropentyl) analog [5F-QUPIC or 5F-PB-22]
- 3) QUPIC *N*-(5-hydroxypentyl) metabolite
- 4) QUPIC *N*-pentanoic acid metabolite
- 5) 1-(5-Fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylic acid [5F-QUPIC carboxy indole]
- 6) Methyl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate [5F-QUPIC carboxylate]
- 7) 8-Quinorinol
- 8) QUPIC-d9 (内標準物質)

血清試料のタンパク沈殿およびリン脂質除去のため、前処理に Captiva-ND Lipids 96 ウェルフィルタプレート (Agilent 社製) を使用した。 β -グルクロニダーゼ (アワビ由来, Glucuronidase activity >100,000 unit/mL, Sulfatase activity <8000 unit/mL) は KURA BIOTEC 社製 (CA, USA) を使用し、膜ろ過用フィルターは Ultra Free-MC (0.45 μ m, Millipore 社製) を使用した。アセトニトリル及び 0.1% ギ酸は HPLC 用を、その他抽出試薬等は特級品を用いた。

3. 違法ドラッグ製剤中薬物測定法

乾燥植物細片試料をフィンガーマッシャーで粉末化して 10 mg をとり、メタノールもしくはアセトニトリル 1 mL を加え、超音波下 5 分間抽出を行った。抽出液について膜ろ過を行い、不溶物を取り除き、必要に応じて適宜希釈して GC-MS 及び LC-MS 測定用溶液とした。定量は、粉末化した試料 10 mg をとり、試験試料に内標準物質吉相酸ベタメタゾン 0.1 mg/mL を含むアセトニトリル 1 mL を加え同様に抽出操作を行い、その 10 倍希釈液について LC-MS 分析により行った (n=3)。検量線は、吉相酸ベタメタゾンの $[M+H]^+$ (m/z 477) におけるピーク面積に対する各濃度 (1-100 $\mu\text{g/mL}$) の α -PHPP (m/z 260) 及び 5F-QUPIC (m/z 377) のピーク面積比から作成した。

<GC-MS 測定条件>

カラム: HP-1MS (30 m \times 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm , Agilent 社製)

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

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

トランスファーライン温度: 280°C

イオン化法: EI 法

<LC-MS 測定条件>

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

移動相: A: 0.1% ギ酸水溶液, B: 0.1% ギ酸アセトニトリル

A/B 95/5 $-$ 80/20 (20 min) $-$ 20/80 (30 min, 5 min hold)

測定波長: 210-450 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: ESI, Positive and negative mode

Capillary voltage: 3.0 kV, Cone voltage: 30 V, Desolvation temp. 350°C, N_2 gas flow: 650 L/hr, Scan range: m/z 120-650

4. 血清試料中薬物測定法

(1) LC-MS/MS 測定条件

UPLC 条件

カラム: Acquity HSS T3 (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm), ガードカラム: Van Guard column (2.1 mm i.d. \times 5 mm, 1.8 μm , Waters)

移動相: A: 0.1% ギ酸水溶液, B: 0.1% ギ酸アセトニトリル

A/B 95/5 $-$ 20:80 (30 min) $-$ 5:95 (32 min, 8 min hold)

流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C

注入量: 2 μL

検出器条件

イオン化: ESI, Positive mode

Capillary voltage: 3.0 kV, Source temp.: 150°C, Desolvation temp. 500°C, N_2 gas flow: 1000 L/hr, Collision gas flow: 0.15 mL/min.

各化合物の MRM 条件は Intelli Start 機能を用いて検討を行った。Table 1 に各化合物の測定条件を示す。なお、Table 1 に記載されている detection limit は、各化合物の標準溶液を LC-MS/MS MRM 測定した際の、 $S/N > 3$ を満たす濃度を示す。

(2) 前処理方法

1) Captiva-ND Lipids カラムに血清試料の 3 倍量の 0.1% ギ酸アセトニトリルをあらかじめ加える。

2) 内標準物質溶液および血清試料 50 μL を前処理カラム上にアプライし、ピペッティングにより混和する。

3) 減圧下で抽出を行った後、再度 0.1% ギ酸アセトニトリルを加え、複数回の抽出を行う。

4) 抽出液は窒素気流下で乾固後、50% アセトニトリル水溶液 50 μL に溶解し、フィルターろ

過後、LC-MS/MS 測定試料とした。

(3) グルクロニダーゼ処理の検討

血清試料に対してグルクロニダーゼ処理を試みた。血清試料 100 μ L に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5) 50 μ L, グルクロニダーゼ溶液 5 μ L (約 200 U) を加え, 37°C で 2 時間振盪した。処理液を上述の通り, 前処理カラムで抽出を行い, 測定試料とした。

(4) 回収率, 検出限界の検討及び検量線の作成

コントロールヒト血清に各化合物溶液を添加し, 常法に従い, 各化合物の回収率, 検出限界を検討し, 検量線の作成を行った (n=4)。回収率は, コントロール血清に各化合物濃度 1 ng/mL となるように標準溶液を添加し, 前処理を行って, 抽出液を窒素気流下で乾固後, 内標準物質 QUPIC-d9 溶液 (1 ng/mL) を添加した 50% アセトニトリル水溶液 50 μ L に溶解して評価した。検出限界は, 各濃度の化合物溶液を添加したコントロール血清抽出液について, LC-MS 分析におけるマスプロトグラムの S/N 比が 3 以上となる濃度とした。検量線は, 各化合物をコントロール血清に 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ng/mL, また内標準物質 QUPIC-d9 を 1 ng/mL となるように添加し, 上述したとおり前処理を行った測定試料を LC-MS MRM モードで測定して作成した。

C. 結果・考察

1. 違法ドラッグ製品分析

違法ドラッグ製品 (乾燥植物細片) のメタノール及びアセトニトリル抽出液の GC-MS 測定結果を Fig. 2 に示した。また, Fig. 3 に製品のアセトニトリル抽出液の LC-MS 測定結果を示した。

GC-MS 測定の結果, 製品の抽出液において, 26.73 分に α -PHPP が, 53.70 分に 5F-QUPIC が検出され, これらの保持時間及びマススペクトルは市販の分析用標品と一致した。また, LC-MS 測定においては, 23.21 分に α -PHPP が, 29.08 分に 5F-QUPIC が検出され, これらの保持時間及びマススペクトルも市販の分析用標品と一致し

た。

なお, GC-MS 測定において, メタノール抽出液では, 36.69 分に 5F-QUPIC の分解物のメチルエステル体 (5F-QUPIC 3-carboxylate methyl ester) が検出され, この保持時間及びマススペクトルは, 市販の分析用標品と一致した。Carboxy ester 構造を有する QUPIC などの合成カンナビノイドは, メタノール溶液中では, GC-MS 分析時に熱分解をうけ, 一部がメチルエステル体として検出されるので^{8), 9)}, 分析時には注意が必要である。なお, LC-MS 分析により, 違法ドラッグ製品中の α -PHPP 及び 5F-QUPIC を定量した結果, それぞれ 14.3 \pm 1.2 mg/g 及び 61.2 \pm 1.2 mg/g であり, 5F-QUPIC が主含有違法ドラッグ成分であった。

2. ヒト血清試料中薬物分析

(1) 分析対象化合物

1 に示した通り, 救急搬送事例に関与していると考えられる違法ドラッグ製品から, カチノン系化合物 α -PHPP 及び合成カンナビノイド 5F-QUPIC が検出された。そこで, ヒト血清試料中薬物についても, 両化合物及びそれらの代謝物を分析対象とした。5F-QUPIC が主要な含有違法ドラッグ成分であったため, 代謝物として, 5F-QUPIC の推定代謝物 (いずれも分析用標品あり) である QUPIC *N*-(5-hydroxypentyl) metabolite, QUPIC *N*-pentanoic acid metabolite, 5F-QUPIC carboxy indole, 5F-QUPIC carboxylate, 8-Quinorinol を対象とした (Fig. 1)。また, 分析用標品は所有しないが, 5F-QUPIC 特異的な推定代謝物である *N*-アルキル側鎖の 4 位水酸化体 [5F-QUPIC *N*-(4-hydroxyl) metabolite], さらに構造類似化合物 α -PVP の代謝報告論文¹⁰⁾ から推定される α -PHPP の 4 種類の推定代謝物について (Fig. 1), MRM 測定時に, 予測されるプロダクトイオンのモニタリングを行った (Table 1)。

(2) 血清試料からの薬物の回収率, 検出限界及び検量線

血清試料の分析における検出限界, 検量線範

囲, 精度及び真度を Table 2 に示した. また, Fig. 4 に, コントロール血清試料に分析対象化合物 1 ng/mg を添加した試料の抽出物の LC-MS/MS マスクロマトグラムを示した.

前処理に Captiva-ND Lipids を用いた場合, 血清試料中からの各化合物の回収率は, 8-Quinorinol を除き, 90%以上と良好な値を示した. 8-Quinorinol は, 5F-QUPIC の分解物のひとつであるが, 回収率は 30%以下と悪く, また, 標準溶液に関しても LC-MS/MS 測定における検出限界が他化合物よりも高いため (Table 1), 今回の検討では, 定量対象化合物から除外した.

血清試料中各化合物の検出限界は, 血清を 50 μ L 使用した場合, α -PHPP 及び QUPIC *N*-(5-hydroxypentyl) metabolite は 0.01 ng/mL, その他化合物は 0.05 ng/mL であった. また, 各化合物の検量線は 0.05-5.0 ng/mL の範囲で, 0.97 以上の相関係数を示し, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 ng/mL における精度, 真度はいずれも 20 % 以下であった.

(3) ヒト血清試料中薬物濃度

血清試料 6 日分 (N-1~6) を $n=4$ で分析を行った. Fig. 5 に, 1 日目に採取した N-1 試料の抽出液の LC-MS/MS 測定結果を示した. また, Table 3 に, N-1~N-6 における各化合物の定量結果を示した.

カチノン系化合物である α -PHPP は, 未変化体が 6 日間にわたって 0.04-0.11 ng/mL と低濃度検出された. しかし, 予測された代謝物について, MRM 分析において相当するピークは検出されなかった. 一方, 合成カンナビノイド 5F-QUPIC においても, 未変化体が 6 日に間にわたり 0.30-1.44 ng/mL 検出されたが, 代謝物は 5F-QUPIC carboxyindole がわずかに 1 日目の試料 (N-1) から検出されたのみであった. 未変化体 5F-QUPIC は, 1 日目が最も高濃度 (1.44 ng/mL) 検出され, 4 日後には 0.23 ng/mL まで減少したが, 5 日後には再び 0.82 ng/mL まで上昇した.

なお, ヒト血清試料 (N-1,2,3) にグルクロニダー

ゼ処理を行い検討したが, 処理前後で検出される化合物量に差は認められなかった.

今回分析したヒト血清試料については, 採取してからかなりの時間冷蔵庫 (4 $^{\circ}$ C) 保存をしていたため, 分析結果が, 必ずしも実際の薬物動態を反映しているとは言い難い. しかし, 尿中では困難な合成カンナビノイドの未変化体の検出が, 血清試料では可能であった.

E. 結論

“脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送 1 事例 (後に死亡) において, 生体試料中含有薬物の検討を行った. 関与が疑われた製品 (乾燥植物細片混合物) の抽出物を GC-MS 及び LC-MS で測定した結果, 合成カンナビノイド 5F-QUPIC が主に検出され, カチノン系化合物 α -PHPP も検出された. 血清試料においては, 救急搬送後 6 日にわたって採取されたものを分析した. 未変化体 5F-QUPIC 及び α -PHPP, また代謝物計 9 化合物を分析対象とし, LC-MS/MS MRM モードでスクリーニング分析を行うと共に, 未変化体及び 4 種類の代謝物については定量分析を行った. その結果, 6 日にわたって未変化体 5F-QUPIC 及び α -PHPP が検出され, 1 日目の血清試料からは, 5F-QUPIC 3-carboxyindole 体が検出された. 5F-QUPIC は, 平成 24 年度後半から 25 年度前半に違法ドラッグ製品中から最も多く検出され健康被害も報告された化合物であり⁵⁾, JWH-018 よりも約 400 倍強い CB₁ 受容体親和性が認められている⁶⁾. 平成 25 年 11 月 20 日より指定薬物として規制され, 規制後流通は大きく減少したが⁵⁾, 今後もその流通・乱用を注視していくべき化合物であると考えられる.

E. 参考文献

- 1) C. L. Moran, V. H. Le, K. C. Chimalakonda, A. L. Smedley, F. D. Lackey, S. N. Owen, P. D. Kennedy, G. W. Endres, F. L. Ciske, J. B. Kramer, A. M. Kornilov, L. D. Bratton, P. J.

- Dobrowolski, W. D. Wessinger, W. E.
Fantegrossi, P. L. Prather, L. P. James, A.
Radomska-Pandya, J. H. Moran:
Quantitative measurement of JWH-018 and
JWH-073 metabolites excreted in human urine.
Anal Chem. (2011) 83(11):4228-4236.
- 2) K. C. Chimalakonda, C. L. Moran, P. D.
Kennedy, G. W. Endres, A. Uzieblo, P. J.
Dobrowolski, E. K. Fifer, J. Lapoint, L. S.
Nelson, R. S. Hoffman, L. P. James, A.
Radomska-Pandya, J. H. Moran: Solid-phase
extraction and quantitative measurement of
omega and omega-1 metabolites of JWH-018
and JWH-073 in human urine. *Anal Chem.*
(2011) 83(16):6381-6388.
- 3) K. C. Chimalakonda, K. A. Seely, S. M.
Bratton, L. K. Brents, C. L. Moran, G. W.
Endres, L. P. James, P. F. Hollenberg, P. L.
Prather, A. Radomska-Pandya, J. H. Moran:
Cytochrome P450-Mediated Oxidative
Metabolism of Abused Synthetic Cannabinoids
Found in K2/Spice: Identification of Novel
Cannabinoid Receptor Ligands. *Drug Metab
Dispos* (2013) 40:2174-2184.
- 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)「法
規制薬物の分析と鑑別に関する研究」(H22-
医薬一般-016)平成 24 年度研究分担報
告「いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料
からの薬物分析」(花尻(木倉)瑠理).
- 5) 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
法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害
影響予測に関する研究」(H24-医薬一般-
009)平成 25 年度研究分担報告「規制前後に
おける違法ドラッグの流通変化について」(花
尻(木倉)瑠理).
- 6) 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
法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害
影響予測に関する研究」(H24-医薬一般-
009)平成 25 年度研究分担報告「新規流通違
法ドラッグの *in vitro* 活性(受容体結合親和
性)評価について」(花尻(木倉)瑠理).
- 7) A. Wohlfarth, A. S. Gandhi, S. Pang, M. Zhu,
K. B. Scheidweiler, M. A. Huestis:
Metabolism of synthetic cannabinoids PB-22
and its 5-fluoro analog, 5F-PB-22, by human
hepatocyte incubation and high-resolution
mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* (2014)
406:1763-1780.
- 8) N. Uchiyama, S. Matsuda, M. Kawamura, R.
Kikura-Hanajiri, Y. Goda: Two new-type
cannabimimetic quinolinyl carboxylates,
QUPIC and QUCHIC, two new
cannabimimetic carboxamide derivatives,
ADB-FUBINACA and ADBICA, and five
synthetic cannabinoids detected with a
thiophene derivative α -PVT and an opioid
receptor agonist AH-7921 identified in illegal
products. *Forensic Toxicol.* (2013)
31(2):223-240.
- 9) K. Tsujikawa, T. Yamamuro, K. Kuwayama, T.
Kanamori, Y. T. Iwata, H. Inoue: Thermal
degradation of a new synthetic cannabinoid
QUPIC during analysis by gas
chromatography-mass spectrometry.
10.1007/s11419-013-0221-6.
- 10) N. Shima, M. Katagi, H. Kamata, S. Matsuta,
K. Sasaki, T. Kamata, H. Nishioka, A. Miki, M.
Tatsuno, K. Zaitso, A. Ishii, T. Sato, H.
Tsuchihashi, K. Suzuki: Metabolism of the
newly encountered designer drug
 α -pyrrolidinovalerophenone in humans:
identification and quantitation of urinary
metabolites. *Forensic Toxicol.* (2014)
32(1):59-67.

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

学会発表

- 1) 永井智紀, 花尻(木倉)瑠理, 菅野さな枝, 鷲盛久, 千葉正悦, 竹下裕史, 高田女里, 河村麻衣子, 合田幸広, 向井敏二:いわゆる「脱法ハーブ」吸入による急死の一部検例, 日本法医学会(2013. 6, 札幌).
- 2) R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, S. Kanno, T. Nagai, M. Takada, T. Mukai and Y. Goda: Determination of MAM-2201 and its metabolites in a fatal case and the binding affinities of MAM-2201 at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. 51th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT 2013) (2013. 9, Funchal, Portugal).
- 3) S. Kanno, R. Kikura-Hanajiri, M. Sagi, T. Nagai, S. Chiba, H. Takeshita, M. Takada, M. Kawamura, Y. Goda, T. Mukai: A fatal case after smoking herb containing a synthetic cannabinoid MAM-2201. 51th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT 2013) (2013. 9, Funchal, Portugal).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

Table 1 Analytical condition of UPLC-MS/MS

Compounds	Molecular formula	Mw	Retention time (min)	Cone voltage (V)	MRM	Product ions for certification	Acquisition time (min)	Detection limits (ng)
QUPIIC-d9 (IS)	C23H13D9N2O2	367	25.6	10>18	368.2>223.2		24.5–27 min	0.001
5F-QUPIIC	C23H21FN2O2	376	22.6	10>20	377.1>232.1	377.1>116.0 377.1>144.0	20–24 min	0.01
QUPIIC N-(5-hydroxypentyl) metabolite	C23H22N2O3	374	17.3	15>14	375.1>230.1	375.1>144.0	12–21 min	0.01
QUPIIC N-pentanoic acid metabolite	C23H20N2O4	388	17.0	13>18	389.1>244.1	389.1>144.0	14–24 min	0.05
5F-QUPIIC 3-carboxyindole metabolite	C14H16FNO2	247	16.1	27>22	250.1>118.0	250.1>206.1	12–16 min	0.05
8-Quinorinol	C9H7NO	145	2.6	20>20	146.0>127.9	146.0>100.9	0–5min	0.5
5F-QUPIIC N-(4-hydroxypentyl) metabolite*	C23H21FN2O3	392		10>20	392.1>232.1		12–21 min	
α -PHPP	C17H25NO	259	11.5	10>24	260.1>91.1	260.1>105.0 260.1>154.2	8–12 min	0.01
α -PHPP metabolite 1*	C17H27NO	261		10>24	262.1>107.1		2–11 min	
α -PHPP metabolite 2*	C17H25NO2	275		10>24	275.1>105.1		2–11 min	
α -PHPP metabolite 3*	C17H23NO2	273		10>24	273.1>105.1		2–11 min	
α -PHPP metabolite 4*	C17H25NO2	275		10>24	275.1>91.1		2–11 min	

* No reference materials

Table 2 Validation of results of the LC-MS/MS analyses of targeted compounds in serum samples

Compounds	Recovery (%) 1 ng/ml serum	Linear ranges ng/mL	Detection limits ng/mL serum	Precision (%)						Accuracy (%)				
				0.05ng/mL	0.1 ng/mL	0.5 ng/mL	1.0 ng/mL	5.0 ng/mL	0.05ng/mL	0.1 ng/mL	0.5 ng/mL	1.0 ng/mL	5.0 ng/mL	
α -PHPP	103.1 ± 5.9	0.987	0.01	13.3	2.2	10.0	5.9	8.0	1.8	-8.9	-0.05	-1.5	-17.6	
5F-QUPIIC	96.0 ± 2.9	0.984	0.05	10.8	10.7	11.9	5.6	9.6	3.8	4.2	-7.5	-2.1	-18.7	
QUPIIC N-(5-hydroxypentyl) metabolite	98.2 ± 7.1	0.05 – 5.0	0.01	7.8	4.0	11.1	6.4	8.2	-2.4	-6.1	-1.9	1.7	-18.2	
QUPIIC N-pentanoic acid metabolite	101.1 ± 8.5	0.978	0.05	18.2	12.8	10.7	7.5	6.6	-6.2	-0.4	2.5	5.3	20.6	
5F-QUPIIC 3-carboxyindole metabolite	90.0 ± 11.1	0.974	0.05	10.0	11.0	5.5	7.9	6.7	11.1	7.8	-11.4	-10.6	-9.4	

n=4

Table 3 Quantitative analyses of the psychoactive substances and their putative metabolites found in the serum samples taken from an emergency admission to hospital after an intake of an herbal product

Compounds	Drug concentrations in serum (ng/mL, n=4)					
	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6
α -PHPP	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.04	0.11 ± 0.05	0.04
5F-QUPIIC	1.44 ± 0.05	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.06	0.23 ± 0.02	0.82 ± 0.48	0.31 ± 0.07
QUPIIC N-(5-hydroxypentyl) metabolite	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QUPIIC N-pentanoic acid metabolite	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5F-QUPIIC 3-carboxyindole metabolite	0.19 ± 0.03	0.03	ND	ND	ND	ND

±SE (n=4)

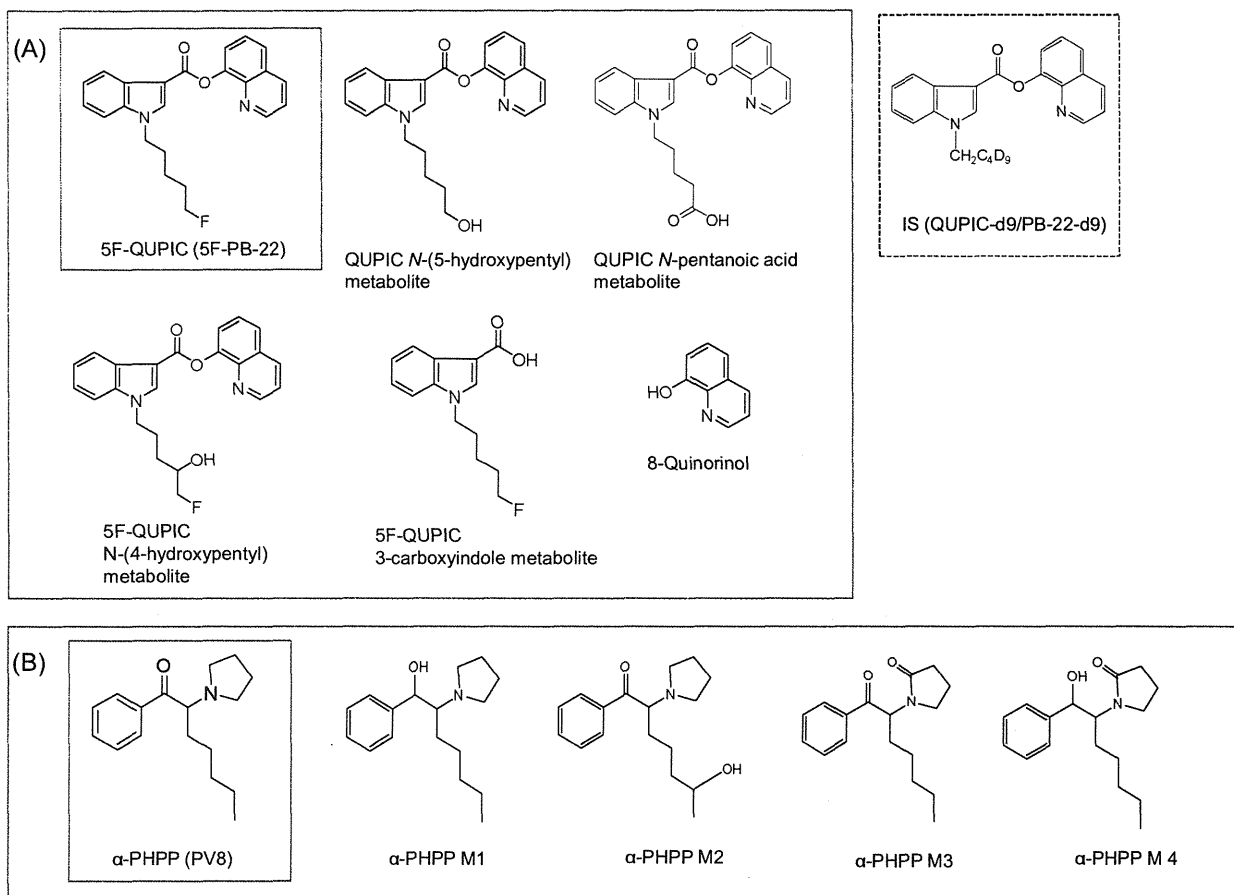


Fig. 1 Chemical structures of 5F-QUPIC, α -PHPP and their putative metabolites

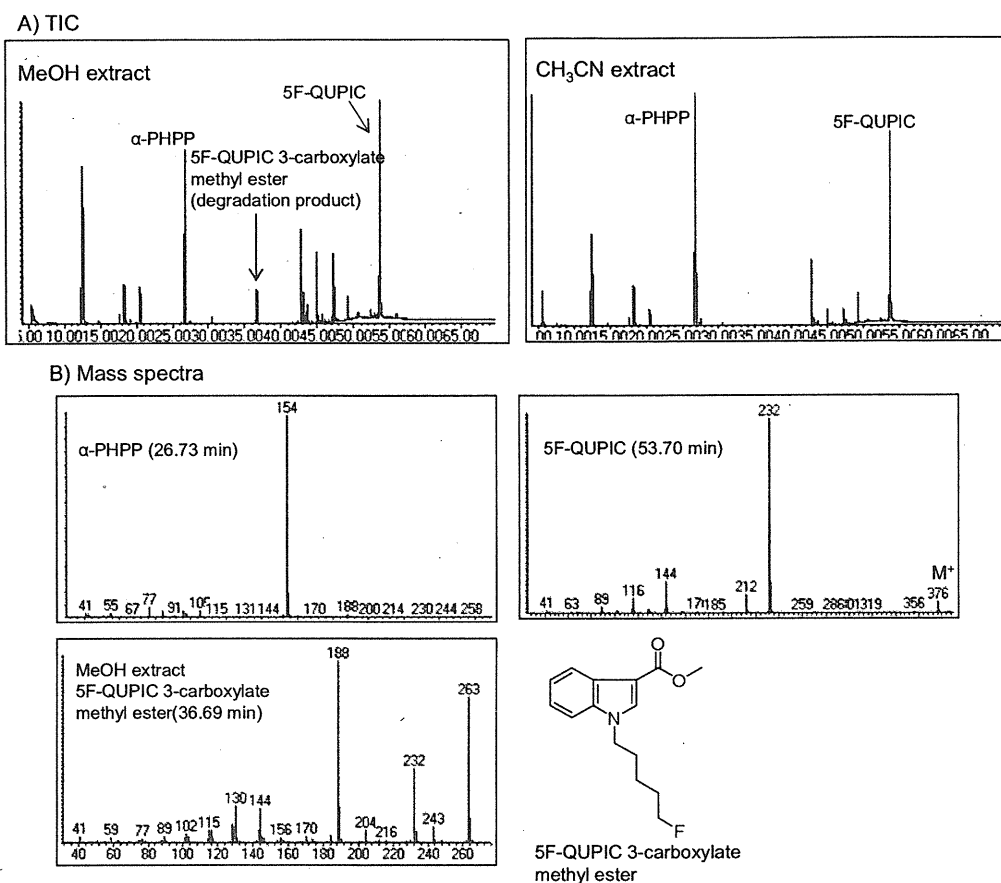


Fig. 2 GC-MS total ion chromatograms of the MeOH extract and CH₃CN extract from the herbal product (A) and mass spectra of the peaks at 26.73 min (α -PHPP), 36.69 min (5F-QUPIC 3-carboxylate methyl ester, the MeOH extract only) and 53.70 min (5F-QUPIC) (B)

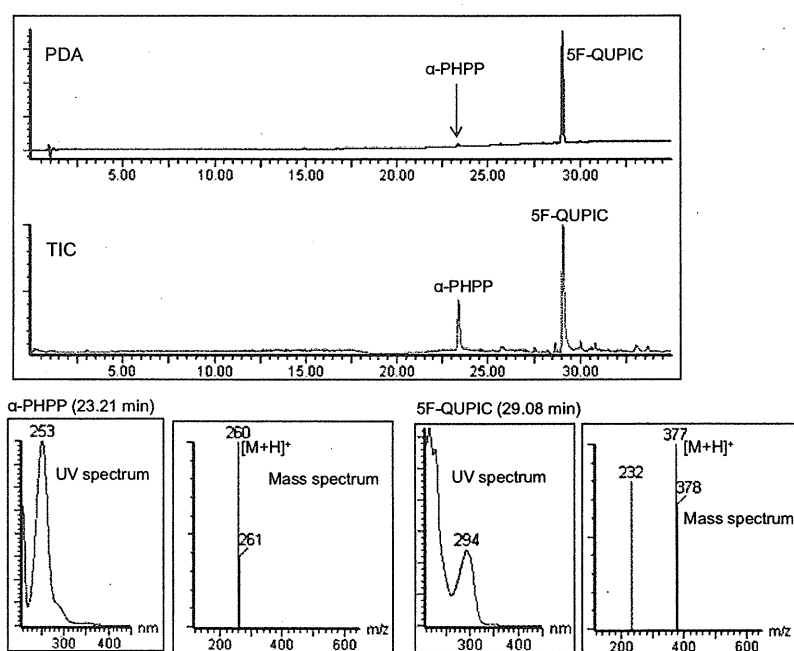


Fig. 3 LC-PDA-MS chromatograms of the CH₃CN extract from the herbal product and UV and mass spectra of the peaks at 23.21 min (α -PHPP) and 29.08 min (5F-QUPIC)

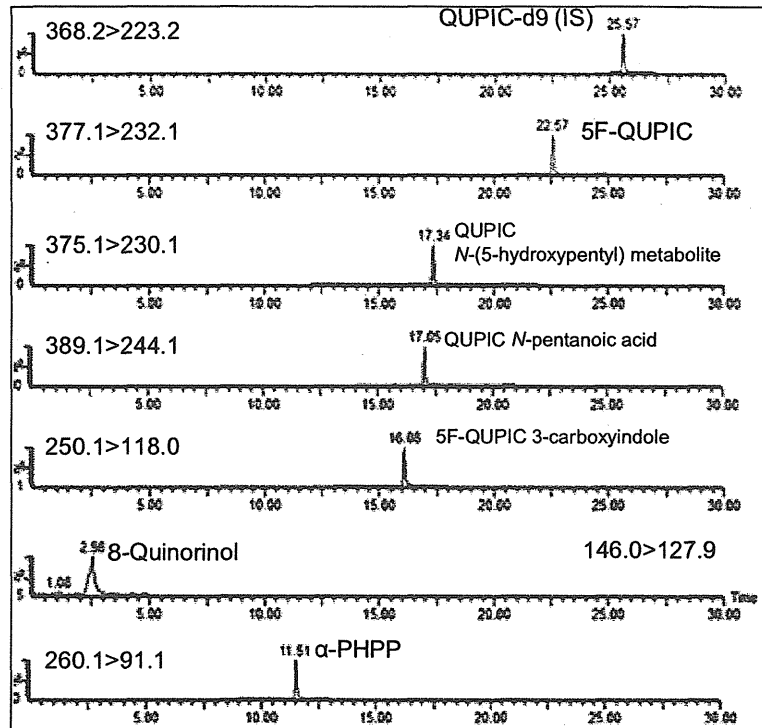


Fig. 4 UPLC-MS/MS MRM chromatograms of the extract from the standard serum sample added with each standard compounds (1 ng/mL)

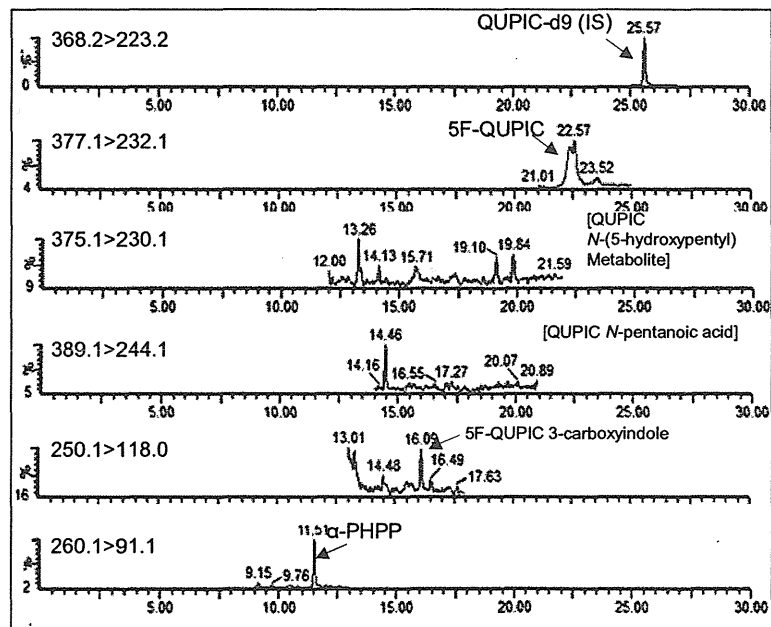


Fig. 5 UPLC-MS/MS MRM chromatograms of the extract from the serum sample collected during the emergency medical treatment (Sample N-1)

分担研究課題:法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

分担研究者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

研究協力者:阿久津 守 関東信越厚生局麻薬取締部鑑定課鑑定課長

一固相分散抽出法によるヒト血液中合成カンナビノイド JWH-018 の分析法の検討一

研究要旨:薬事法指定薬物から麻薬に格上げとなった合成カンナビノイドは、現在、JWH-018 など7種類指定されているが、施用(使用)罪を立証するためには、尿や血液などの生体試料から麻薬成分及び代謝物を検出することが肝要となる。更に施用(使用)した薬物を特定するためには、生体試料から未変化体を検出する必要があり、未変化体を捕らえるためには、血中からの検出が主に行われている。本研究では、血液等生体試料の前処理として行う固相抽出法のうち、新たに開発された固相分散抽出法を選択し検討を行った。本年度は、麻薬に指定されている合成カンナビノイドのうち JWH-018 をヒト血液に添加し、当該抽出法による試験手順を確立した。その結果、固相分散抽出に使用する固相担体は、Oasis[®] HLB(Waters)を選択し 10 mg が適切な量であり、溶出液は、酢酸エチルが最も回収率が高く、操作性も優れていた。また血液の前処理では、最速方法として全血をそのまま使用することも可能であったが、血液を除タンパクし、溶媒留去した上清を使用することで夾雑物が減少し回収率が向上した。以上の結果、同法により血液から迅速に試料が調製でき、分析対象物質については比較的高い回収率が得られたことから、当該試験の前処理法として固相分散法の有用性が示唆された。

研究協力者

杉江 謙一 関東信越厚生局麻薬取締部

厚生労働技官

A. 研究目的

近年、「合成カンナビノイド」類を乾燥植物細片に混合した「脱法ハーブ」による健康被害が急増し、深刻な社会問題になっている^{1,2)}。これら脱法ハーブ問題に対応するため、脱法ハーブ成分である合成カンナビノイドについては、順次「指定薬物」に指定されており、更に依存性、精神毒性等が確認された物質については麻薬に指定され、一層厳格に規制されている³⁾。麻薬に格上げとなった合成カンナビノイド類は、現在、JWH-018, JWH-073, JWH-122, AM2201, MAM-2201, カンナビシクロヘキサノール及び XLR11 の7種類

であり、麻薬指定されたものは、施用(使用)罪の適応を受けることになるが、施用(使用)罪を立証するためには、尿や血液などの生体試料から麻薬成分及び代謝物を検出することが肝要となる。この際、生体試料から未変化体の麻薬成分が検出されれば、施用した麻薬を特定することができるが、一般に合成カンナビノイド類は、尿より未変化体の成分を検出することが困難であるとされており^{4,5)}、未変化体を捕らえるためには、血中からの検出が主に行われている^{6,7)}。また生体試料からの鑑定試験は迅速かつ正確性が要求されることから、本研究においては、麻薬に指定された合成カンナビノイド類のうち代表的な JWH-018 にかかる血中未変化体の迅速検出法の検討を行うこととした。

従来、血液等生体試料の前処理には固相抽出

法(Solid-phase extraction;SPE, 以下 SPE 法という)が汎用されているが, SPE 法は, 固相担体を充填したカートリッジに, 溶液や懸濁液を通過させ, 対象とする物質を固相カートリッジに保持させた後, 別の種類の移動相を用いて不純物を除去し, 最終的に対象物質を溶出するといった方法が通常行われている. 当該方法は, 液-液抽出と比較して, 1) 使用する溶媒が少量である, 2) エマルジョンが生成されない, 3) 迅速に多数試料の処理が可能, などのメリットがあり, 現在, 多種多様なカートリッジが販売されている. しかしながら, SPE 法は, 主にマニホールド内の減圧などにより溶液通過時間を調整しているが, 通液速度の変動により回収率が低下したり, 良好な再現性が得られないなどの欠点が挙げられる. 更に開放系での処理のため, 有害化学物質による実験者への曝露やクロスコンタミネーションなどが危惧される. そこで本研究では, 前述の問題改善と試験の迅速化を図ることを目的として, 「固相分散抽出法(Solid-phase dispersive extraction; SPDE, 以下 SPDE 法という)」を採用し, その実用性を検討することとする.

なお, SPDE 法は, 齊藤らが考案した新規前処理法⁸⁾であるが, 当該方法はマイクロテストチューブ内において, 試料液中に固相抽出剤を分散させ, これを遠心ろ過フィルターによって, 1) 遠心分離により固相と溶媒相をろ別, 2) 分散洗浄, 3) 分散溶出, の3ステップ操作を行うもので, 既存の SPE 法とは違う抽出およびクリーンアップ方法である.

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

ヒト血液(A 型, 抗凝固剤:EDTA 入り)はコスモ・バイオ(株)から購入した. なお, ヒト全血試料については, 国立医薬品食品衛生研究所研究倫理規定に従い, 提出者から適切な同意が得られた血液が採取され, 個人情報情報が確実に連結不可能で匿名化されている旨の証明が得られたも

のを購入し,使用した.

JWH-018 は Cayman chemical 社から購入(麻薬指定前)した. その他の試薬は試薬特級品を関東化学株式会社から購入した. JWH-018 はメタノールで溶解し, 0.1 mg/mL に調整したものを標準溶液として用いた. 検量線用標準液は, 標準溶液を更にメタノールで15, 25, 50, 100, 250, 500 ng/mL になるよう希釈して調製した. また抽出溶媒の検討及び添加固相量の検討試験では, 標準溶液を超純水で希釈し, 250 ng/mL としたものを使用した. 血液試料前処理の検討においては, 血液中の濃度として250 ng/mL になるように標準溶液を血液に添加・調製したものを用いた.

2. 器具及び装置

器具

SPDE 法で使用する遠心濾過フィルター(製品名:@ろ過TM)およびスクリーバイアル(製品名:キャップチューブTM)は(株)フロンティア・サイエンスから提供されたものを使用した. Oasis[®] HLB, 30 μ m は Waters から購入した. 2mL のマイクロチューブはワトソン株式会社から購入した. 上記器具及びそれらを組み合わせたものを図1に示す.

装置

卓上遠心機:H-36 (株)コクサン

超音波洗浄機:VS-F100 アズワン(株)

高速パラレル濃縮装置:TurboVap LV バイオタージ・ジャパン(株)

パーソナル遠心機:CHIBITAN II (10 krpm) メルク(株)

3. 固相懸濁剤の調製

カートリッジから取り出した Oasis[®] HLB を 100 mg マイクロチューブに入れ, メタノール 1 mL を加えた. このマイクロチューブに遠心濾過フィルターを装着し, フィルター反対側にも同様にマイクロチューブを装着した. Oasis[®] HLB を添加したマイクロチューブを攪拌し, 遠心分離(3,000 rpm, 1 分間)した. 溶媒が入ったマイクロチューブを脱着し, 超純水 1 mL を加えたマイクロチューブを装

着した。Oasis[®] HLB を添加したマイクロチューブを下向きにして遠心分離(3,000rpm, 1 分間)した。Oasis[®] HLB を添加したマイクロチューブを濾過フィルターから脱着し、攪拌した後、試験に使用した。

4. 測定方法

GC-MS

装置: Agilent 社製 7890A GC / 5975C MSD

GC-MS 条件

カラム: DB-5MS (30 m×0.25 mm i.d, 膜厚 0.25µm, Agilent 社製)

キャリアーガス: He, 1.2 mL/min

注入法: スプリットレス

注入量: 2 µL

注入口温度: 250°C

カラム温度: 180°C (1 min hold) - 5°C/min - 25°C (5 min hold) - 20°C/min - 310°C (7 min hold)

イオン化法: EI 法

検出器温度: 280°C

測定方法: SIM (測定用イオン: m/z 214, 対照用イオン: m/z 341)

5. 抽出溶媒の検討

図1に示すように、遠心ろ過フィルターの上部にスクリーバイアルを、下部にマイクロチューブを装着した(以下デバイスと呼ぶ)。スクリーバイアル側に JWH-018 水溶液(250 ng/mL) 0.5 mL 及び固相懸濁剤を 0.1 mL 添加し、攪拌、遠心分離(3,000 rpm, 1 min)した。マイクロチューブを交換し、スクリーバイアル側に固相を洗浄するため超純水 1 mL を加えて攪拌し、溶媒除去のため遠心分離(3,000 rpm, 5 min)した。更にマイクロチューブを交換し、抽出溶媒としてアセトニトリル、アセトン、酢酸エチル及びメタノールをそれぞれ 0.5 mL ずつ加えて攪拌し、超音波照射(100 kHz, 1 min)した後、同様に遠心分離(3,000 rpm, 1 min)した。抽出液は、圧縮気流下で蒸発乾固し、0.5 mL のメタノールで再溶解させ、遠心分離(10 rpm, 1 min)し、上清を GC-MS で測定した。固相

分散抽出法の具体的な操作方法について図2に示す。各抽出溶媒における回収率差の検定は、一元配置分散分析法で全体の溶媒間の差を確認した後、有意であった場合($P < 0.05$)に個々の溶媒間の差を Tukey 法を用い、 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。以下の検討においても、同様の方法で有意差検定を行った。

6. 固相添加量の検討

本実験では、上記の固相担体 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg 及び 40 mg をそれぞれ添加し、回収率を比較検討した。同様に、スクリーバイアルに JWH-018 水溶液(250 ng/mL) 0.5 mL を入れ、固相量に相当する固相懸濁剤をスクリーバイアルに添加した。固相懸濁剤添加後の各試料の容量を合わせるために超純水を加えて調整した。試料調製方法を表1に示す。試料混合液を攪拌し、遠心分離(3,000 rpm, 1 min)した。マイクロチューブを交換し、スクリーバイアルに固相洗浄のため超純水 1 mL を加えて攪拌し、溶媒除去のため遠心分離(3,000 rpm, 5 min)した。マイクロチューブを交換し、抽出溶媒として酢酸エチルを 0.5 mL 添加し、攪拌、超音波照射(100 kHz, 1 min)した後、同様に遠心分離(3,000 rpm, 1 min)した。抽出液は、圧縮気流下で蒸発乾固し、0.5 mL のメタノールで再溶解させ、遠心分離(10 rpm, 1 min)し、上清を GC-MS で測定した。

7. 血液試料における前処理の検討

本試験では、血液試料を 1) 除タンパク、2) 遠心分離及び 3) 2 倍希釈の 3 種類の前処理を行い、未処理試料の回収率と比較検討した。

7-1. 血液試料の前処理法

1) 除タンパク処理

JWH-018 の血液試料(250 ng/mL) 0.5 mL をマイクロチューブに入れ、アセトニトリル 0.5 mL を加えて攪拌し、遠心分離(10 rpm, 1 min)した。上清を可能な限り採取し、圧縮気流下で約 250 µL まで濃縮した。濃縮液を遠心分離(10 rpm, 1 min)し、全ての上清を固相分散抽出に使用した。

2) 遠心分離

上記と同様に、JWH-018 の血液試料 (250 ng/mL) 0.5 mL をマイクロチューブに取り、遠心分離 (10k rpm, 1 min) した。上清を可能な限り採取し、さらに 10 rpm で 1 分間、遠心分離し、全ての上清を固相分散抽出に使用した。

3) 2 倍希釈

血液試料 0.5 mL に対して、超純水 0.5 mL を加えて希釈したものを試料とした。

7-2. 固相分散抽出

前述のとおり前処理した試料と未処理の血液試料 0.5 mL をそれぞれスクリーバイアルに入れ、各試料に固相懸濁剤 0.1 mL を加えて攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm, 1 min) した。マイクロチューブを交換し、スクリーバイアルに固相洗浄のため超純水 1 mL を加えて攪拌し、溶媒除去のため遠心分離 (3,000 rpm, 5 min) した。マイクロチューブを交換し、抽出溶媒として酢酸エチルを 0.5 mL 添加し、攪拌、超音波照射 (100 kHz, 1 min) 後、同様に遠心分離 (3,000 rpm, 1 min) した。抽出液は、圧縮気流下で蒸発乾固し、0.5 mL のメタノールで再溶解させ、遠心分離 (10 rpm, 1 min) し、上清を GC-MS で測定した。

8. 検出限界、定量下限及び検量線範囲

クロマトグラム上、ピークが $S/N > 3$ 及び $S/N > 10$ となる最小試料濃度を検出限界及び定量下限とした。検量線は、6 濃度の測定を行い、絶対検量線法から作製した。検出限界、定量下限、定量範囲及び直線性については、表2に示す。

C. 研究結果

1. 抽出溶媒の検討

各種抽出溶媒に対する絶対回収率を図3に示す。アセトンと酢酸エチルで 95% 以上の回収率が得られたが、両溶媒の回収率に有意な差はなかった ($P > 0.05$)。なお本研究では JWH-018 のみ検討を行ったものであるが、担体 Oasis[®] HLB のカートリッジ法 (SPE 法) において、血清中合成カンナビノイド (21 種) の添加回収試験では、アセ

トンより酢酸エチルでの抽出効率が高いという報告⁹⁾も考慮し、酢酸エチルを抽出溶媒として選択した。

2. 固相添加量の比較

固相添加量に対する絶対回収率を表4に示す。10 mg の固相担体を添加したときの回収率が最も高い回収率となったが、10 mg と他の添加量の回収率をそれぞれ比較すると特に有意差 ($P > 0.05$) はなかった。よって固相担体の量は 10 mg で既に必要十分量に達していると判断し、今後、固相担体を 10 mg 添加することとした。

3. 血液試料における前処理の検討

各種前処理に対する絶対回収率を図4に示す。除タンパク処理したサンプルの回収率は約 75 % となり、2 倍希釈及び遠心分離したサンプルの回収率より有意 ($P < 0.05$) に高くなったが、未処理サンプルの回収率とは有意差がなかった ($P > 0.05$)。また、除タンパク及び遠心分離で前処理することにより、血液試料由来の夾雑ピークを軽減することができた。各前処理後のクロマトグラムを図5に示す。

D. 考察

従来、前処理用に汎用されている充填カートリッジ式の SPE 法では、除タンパク等の前処理をしていない血液をそのままカートリッジに適用した際に、血球などの固形成分が固相に目詰まりを起こし、ロードされないことが多いことから、通常、血液を希釈するなどの方法が行われている。しかし、SPDE 法では、直接デバイスに未処理の血液を注入しても閉塞することなく抽出することが可能であり、時間的余裕がない場合は、未処理の血液を直接前処理することで操作を簡素化し、時短することも可能である。ただし現段階では、前処理として除タンパクを用いることで、対象化合物の回収率を有意に向上させ、血液試料由来の夾雑ピークを軽減できることから、作業工程が若干増えても血液試料を分析する際には、除タンパク処理後に固相分散を実施する方がより確

実と推察された。

また、SPE 法では、1 検体につきカートリッジを 1 本使用するのに対して、SPDE 法では 1 検体当たり 10 mg の固相量で十分クリーンアップすることができることが判明し、市販のカートリッジ(固相担体が約 200 mg 充填)よりも SPDE 法の方が低コストで運用が可能であり、実用的であった。

E. 結論

本研究では、血液からの試料調製が容易となり、且つ分析対象物質について比較的高い回収率が得られたことから、SPDE 法は、血中合成カンナビノイド JWH-018 にかかる前処理法として有用であることが示唆された。今後は、他の合成カンナビノイドへの適用を検討すると共に、尿などの生体試料についても検討を行う予定である。

謝辞

本研究の遂行に当たり、星薬科大学薬品分析化学教室 齊藤貢一教授より貴重な御助言をいただきました。深謝申し上げます。

F. 参考文献

1. 花尻(木倉)瑠理:“脱法ドラッグ(脱法ハーブ)”による健康被害を防ぐために、日本法科学技術学会誌, **18** 別冊, 1, (2013).
2. 渡辺和人:脱法ハーブの法規制, *ファルマシア*, **48**, 1101-1104(2012).
3. 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課:麻薬・覚醒剤行政の概況, 198(2012).
4. Hutter M, Broecker S, Kneisel S, Auwärter V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkindole type present as adulterants in “herbal mixtures” using LC-MS/MS techniques. *J. Mass. Spectrom.*(2012), 47, 54-65
5. Sobolevsky T, Prasolov I, Rodchenkov G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Sci*

Int.(2010), 200(1-3), 141-7.

6. Teske J, Weller JP, Fieguth A, Rothämel T, Schulz Y, Tröger HD. Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl) methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, (2010) 878(27), 2659-63.
7. Kneisel S, Auwärter. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *J. Mass. Spectrom.*(2012), 47, 825-835.
8. 齊藤貢一, 科学研究費補助金研究:法科学及び臨床化学に役立てる乱用薬物の迅速分析法の開発. (2011)
9. 嘉数一路, 久恒一晃, 石場厚, 松本智寛:血清中合成カンナビノイド類の抽出方法の検討, 日本法科学技術学会誌, **18** 別冊, 44, (2013).

G. 健康危機情報

特になし

H. 研究発表

特になし

I. 知的所有権の取得状況

特になし

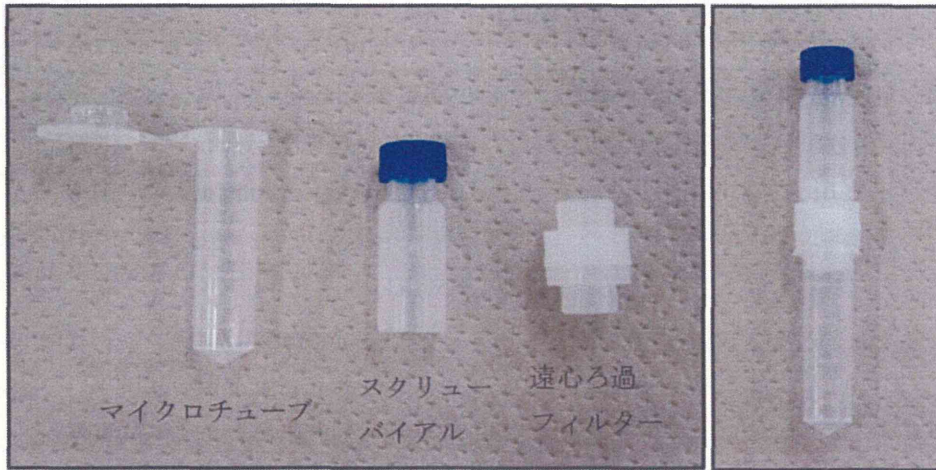


図 1. SPDE 法で使用する実験器具

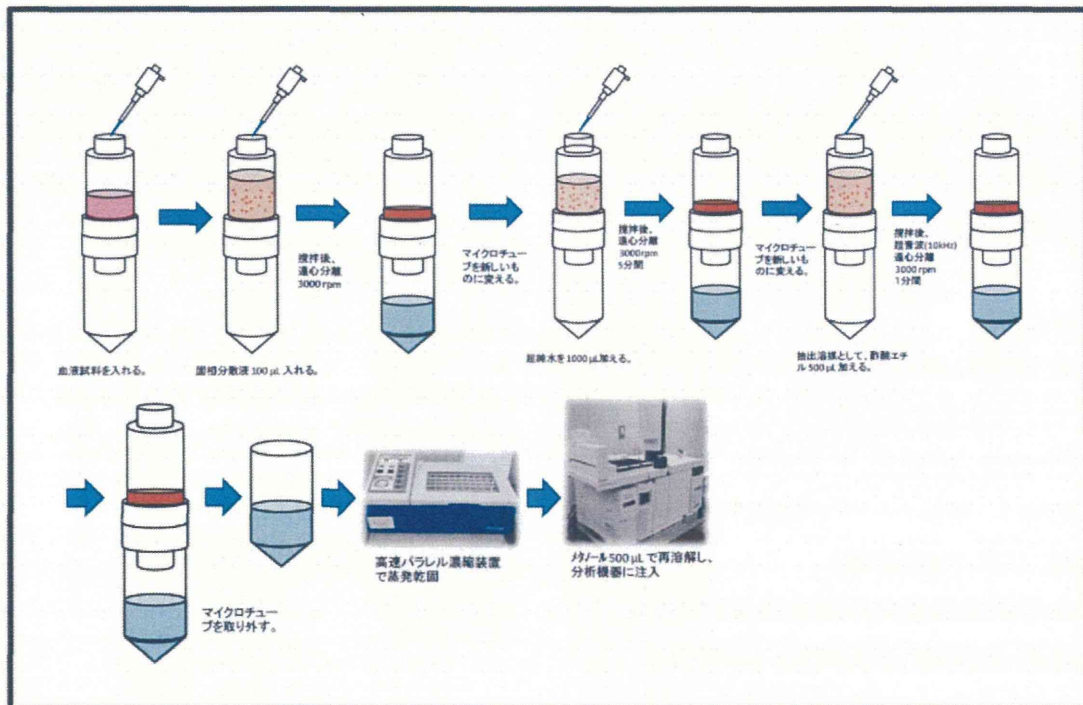


図 2. SPDE 法の操作方法.

表 1. 添加固相量に対する固相懸濁液と超純水の添加量

添加固相量	固相懸濁液	超純水
5mg	50 μ L	350 μ L
10mg	100 μ L	300 μ L
20mg	200 μ L	200 μ L
30mg	300 μ L	100 μ L
40mg	400 μ L	0 μ L

表 2. GC-MS における検出限界, 定量下限, 範囲及び直線性

	検出限界 (ng/mL)	定量下限 (ng/mL)	定量範囲 (ng/mL)	直線性 (r)
JWH-018	5	15	15-500	0.999

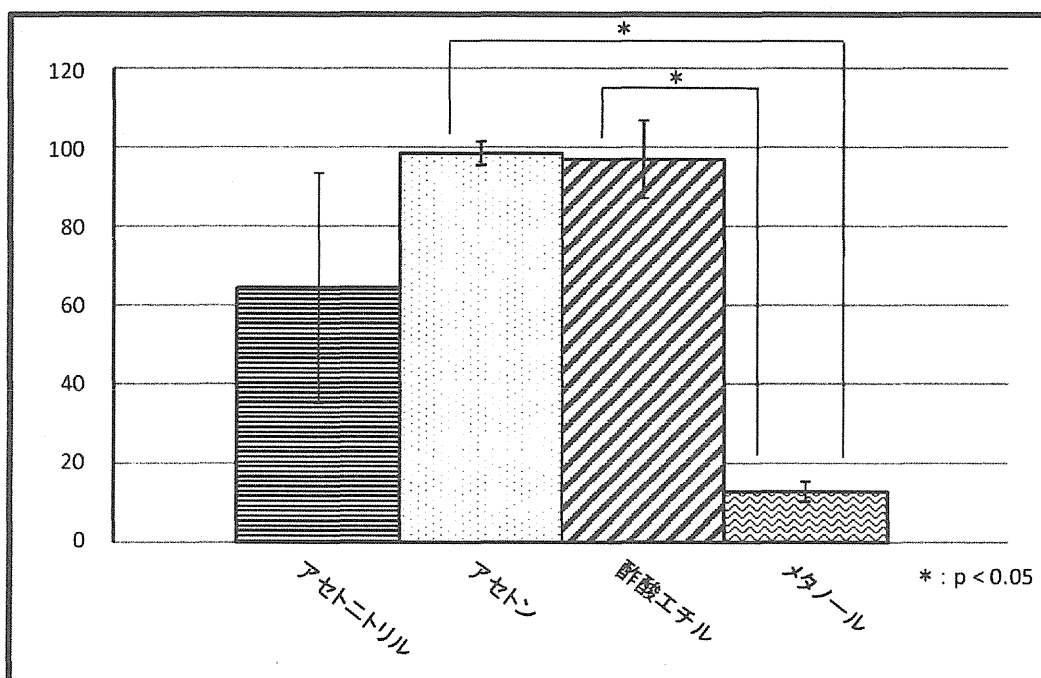


図 3. 各抽出溶媒における JWH-018 の回収率 (n = 3)

表 3. 各固相添加量における JWH-018 の回収率 (n = 3)

Amount of solid phase	5mg	10mg	20mg	30mg	40mg
Recovery (%)	75.0	84.0	75.5	69.0	70.0
SD	19.7	18.0	14.2	15.4	12.6

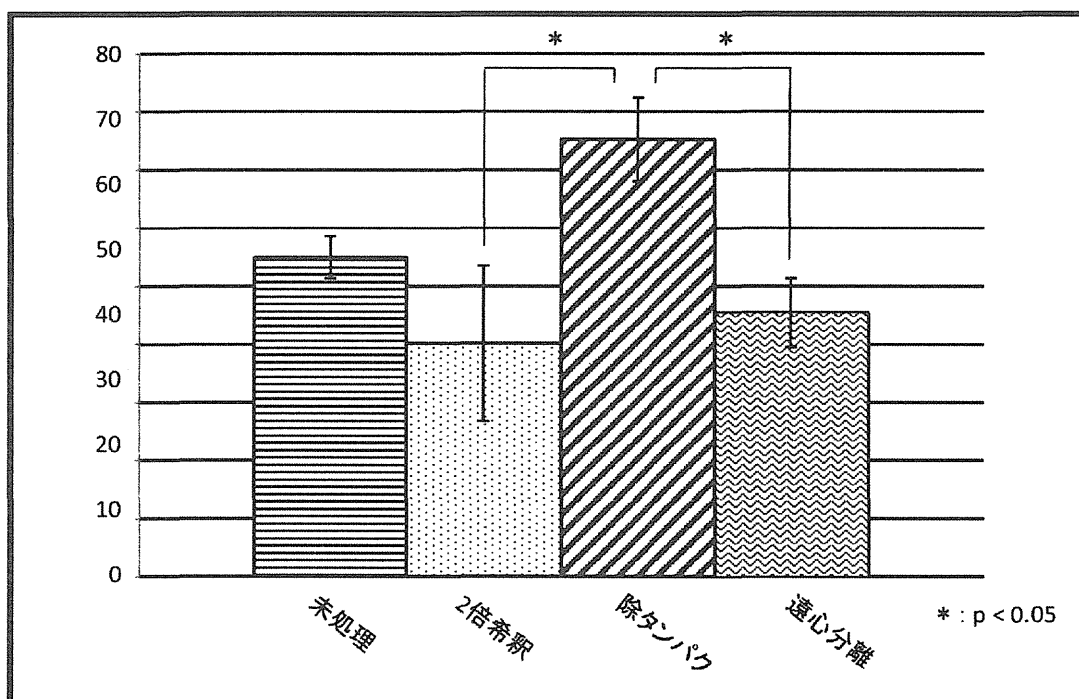


図 4. 各種前処理における JWH-018 の回収率 (n = 3)

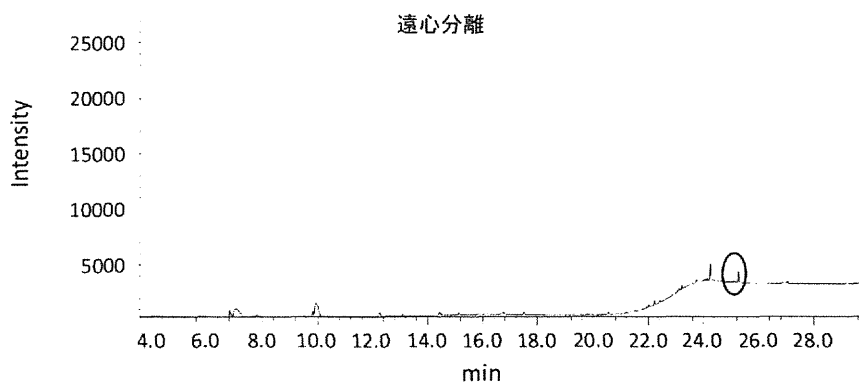
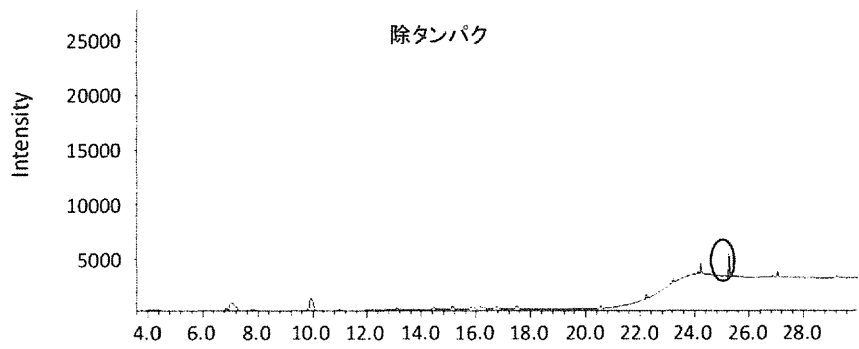
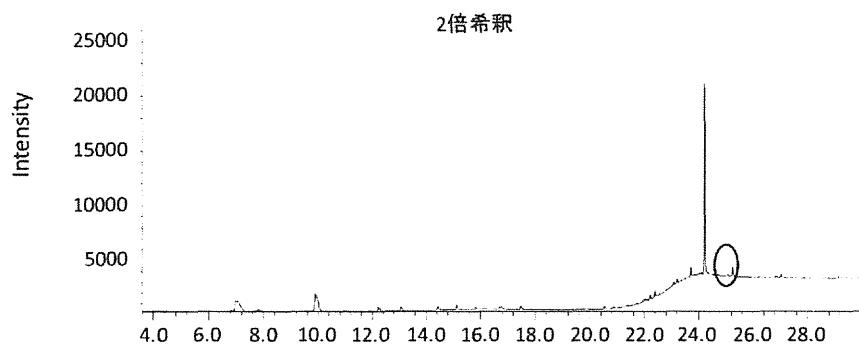
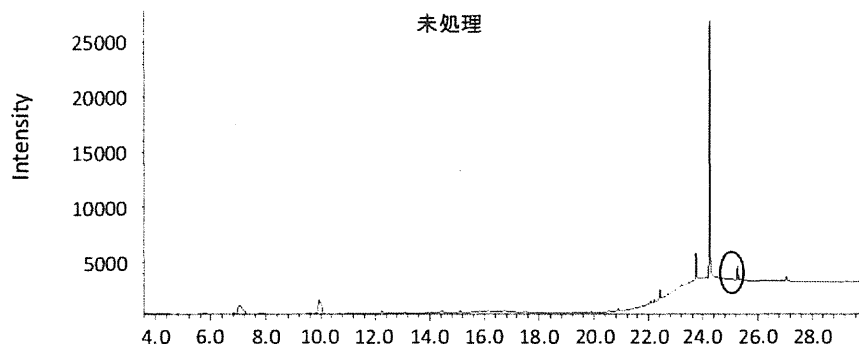


図 5. 各種前処理後の GC-MS クロマトグラム (m/z 214 及び 341)
 円で開んだ部分が JWH-018 のピークを示す。