

Fig. 15. LC-MS and GC-MS analyses of product N.

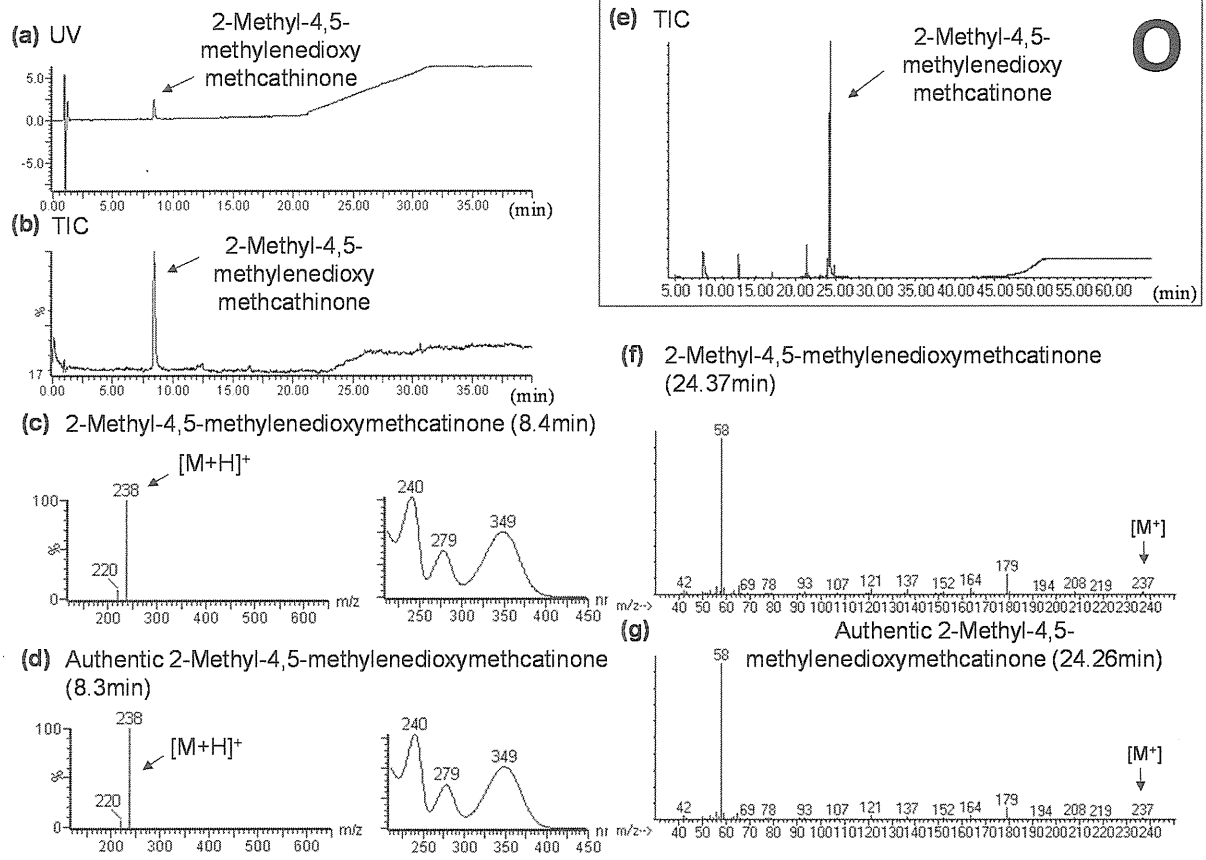


Fig. 16. LC-MS and GC-MS analyses of product O.

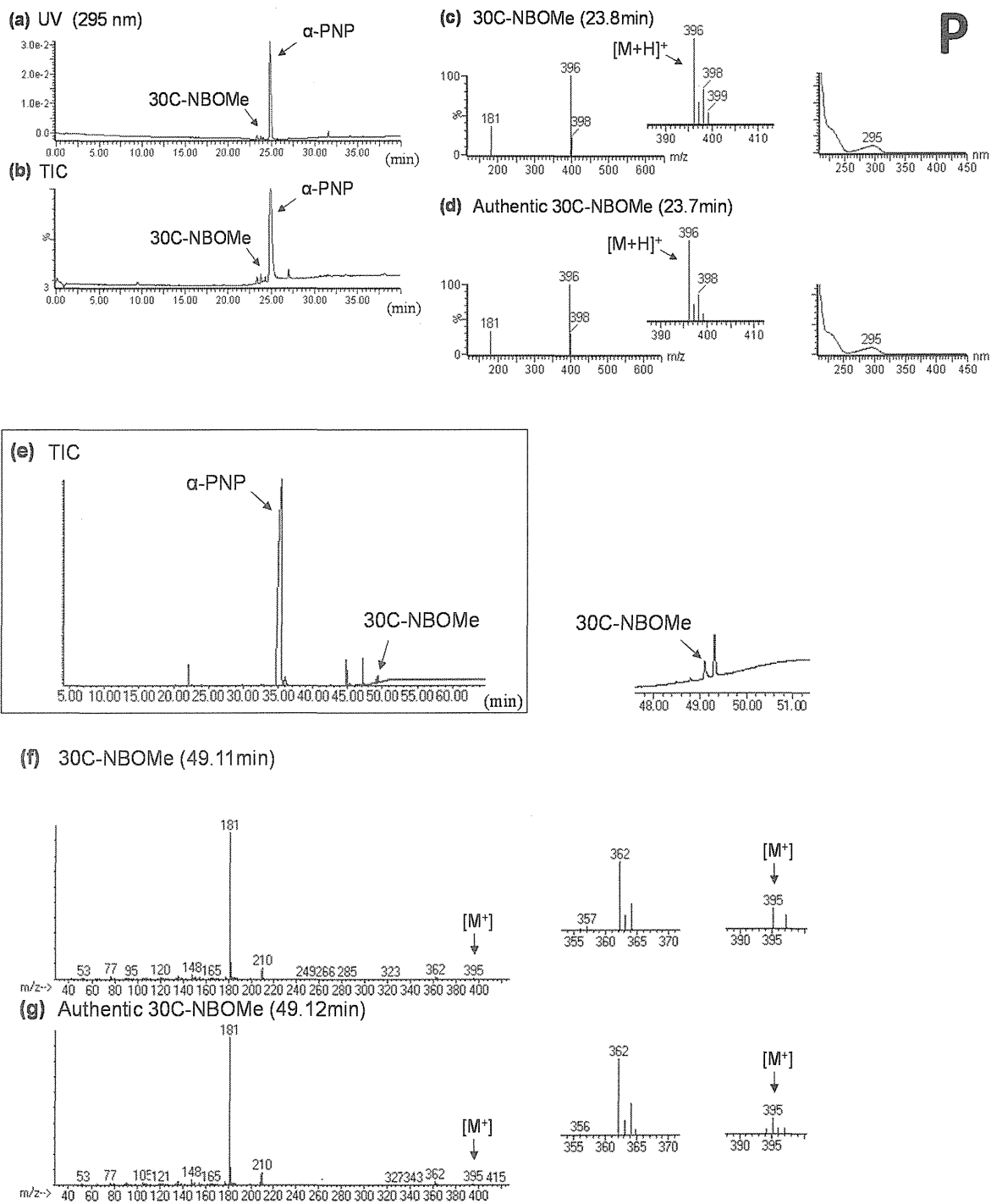
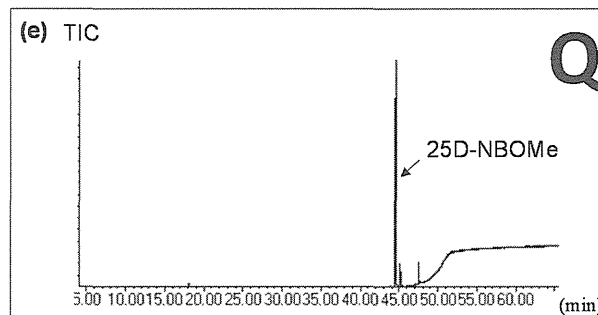
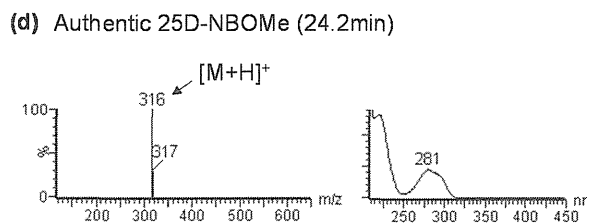
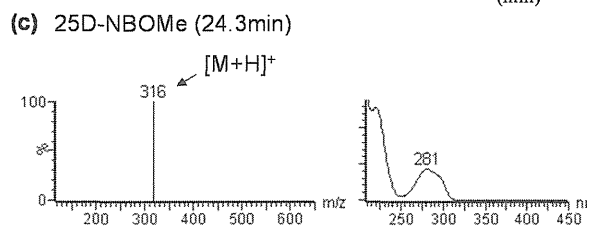
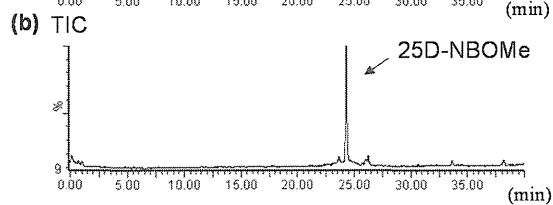
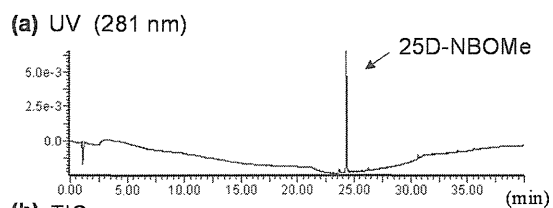
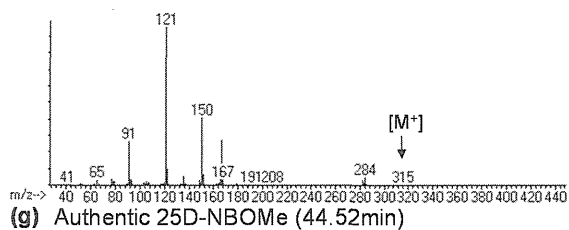


Fig. 17. LC-MS and GC-MS analyses of product P.



**(f) 25D-NBOMe (44.52min)**



**Fig. 18.** LC-MS and GC-MS analyses of product Q.

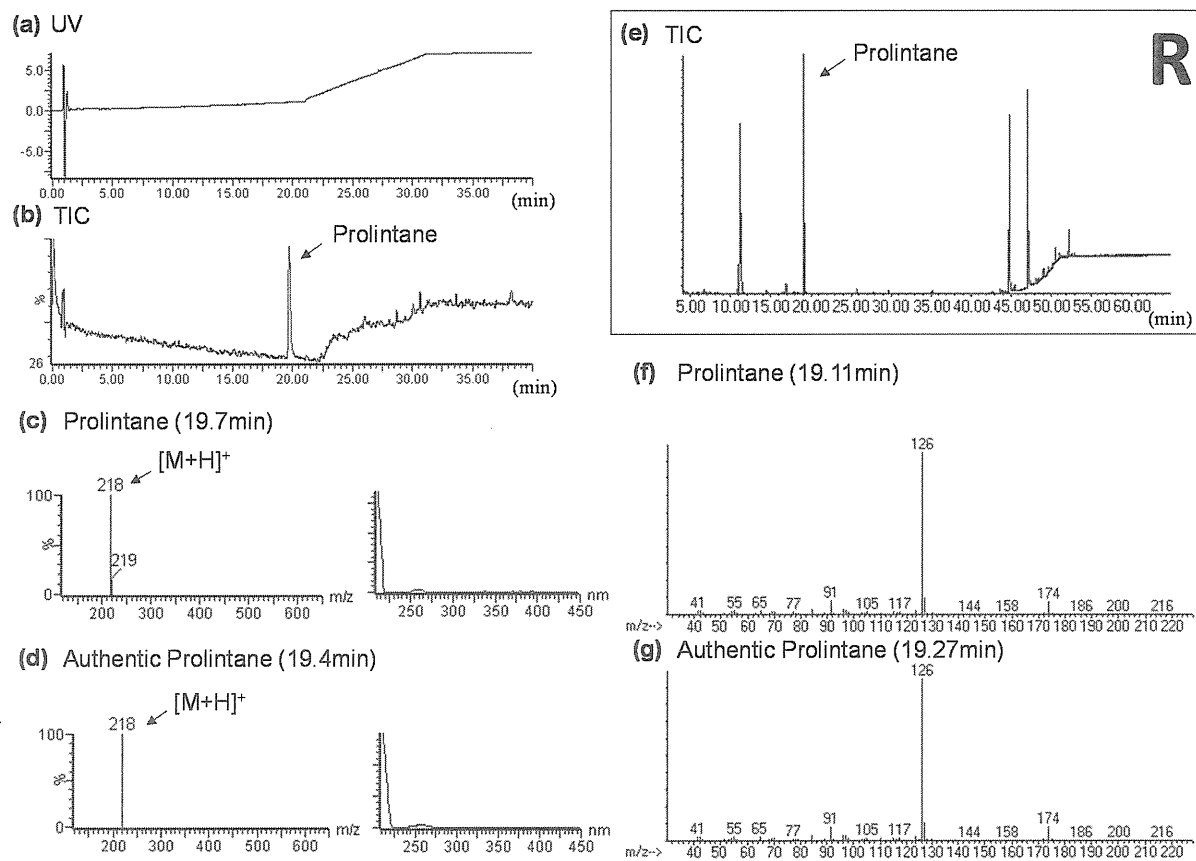


Fig. 19. LC-MS and GC-MS analyses of product R.

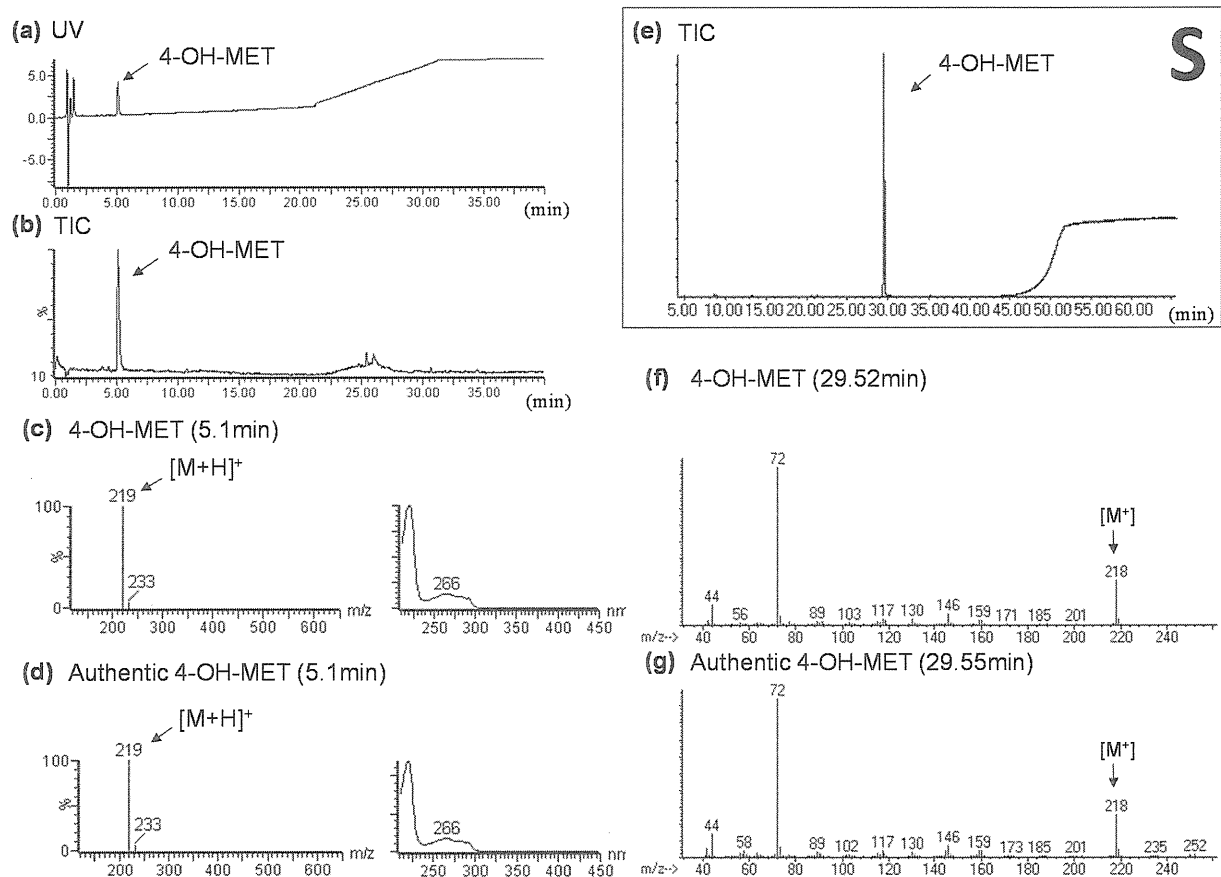


Fig. 20. LC-MS and GC-MS analyses of product S.

分担研究課題:違法ドラッグ成分の中枢に及ぼす作用評価

分担研究者: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

—合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB および JWH-018 の

神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* m-RNA)発現への影響—

研究協力者:小早川 令子 (公財)大阪バイオサイエンス研究所神経機能学部門・研究室長

研究要旨:乱用が懸念される危険ドラッグを迅速に規制するためには、その有害性を的確に把握し評価することが重要である。しかし、現状では危険ドラッグに関する科学的知見は少なく、また作用についても不明な点が多い。そこで本研究では、これら危険ドラッグの中枢神経系に及ぼす作用を評価する方法として、マウスの全脳を用いて、大脳における神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* m-RNA)の発現に及ぼす作用を検討することとした。本研究では、合成カンナビノイドとして、新規流通成分 5-fluoro-ADB および麻薬成分である JWH-018 の *c-fos* 発現への影響を検討した。また同時に、大麻の主活性カンナビノイド:Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (Δ<sup>9</sup>-THC, 麻薬)の結果と比較した。

その結果、Δ<sup>9</sup>-THC, 5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与は共通して扁桃体中心核(CeA)の *c-fos* 発現の上昇を誘発した。扁桃体は情動を制御する最も重要であると考えられている中枢なので、これらの薬剤の投与は情動の異常を誘発する可能性がある。さらに、Δ<sup>9</sup>-THC とは異なり、5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与は室傍核 (PVN) や視索上核 (SO) における顕著な *c-fos* 発現の上昇も誘導した。従って、PVN や SO の *c-fos* 発現を指標にすることで、Δ<sup>9</sup>-THC と 5-fluoro-ADB および JWH-018 の作用を区別できると考えられる。また、全脳活動マッピングの結果から、5-fluoro-ADB および JWH-018 はΔ<sup>9</sup>-THC よりも大きな影響を脳活動に与えると推定される。さらに、5-fluoro-ADB および JWH-018 によって活性化される PVN や SO には、oxytocin や vasopression などのホルモンを分泌する神経細胞が存在するので、これら薬剤の投与はホルモンの過剰分泌による脳や心臓などの活動異常も引き起こし、重篤な行動異常を誘発する可能性がある。従って、今後、様々な薬剤を投与した条件で、大脳の神経活動と、扁桃体、室傍核や視索上核の神経活動を解析することで、その薬剤が重篤な行動異常を誘発するリスクを評価できる可能性が示唆された。

研究協力者

裏出 良博 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構 (IIS) 教授

A. 研究目的

乱用が懸念される危険ドラッグを迅速に規制するためには、その有害性を的確に把握し評価す

ることが重要である。しかし、現状では危険ドラッグに関する科学的知見は少なく、また作用についても不明な点が多い。これまで我々は、危険ドラッグ成分の中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを導入し、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討して

きた[1-4]. さらにこれら危険ドラッグの中枢神経系に及ぼす作用を評価する新たな方法として, マウスの全脳を用いて, 大脳における神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* mRNA)の発現に及ぼす作用を検討することとし, 平成 25 年度は, 大麻の主活性成分である代表的カンナビノイド:  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC, 麻薬)の *c-fos* 発現への影響を検討した[5]. さらに今年度の研究では, 合成カンナビノイドとして, 新規流通成分 5-fluoro-ADB (Figure では 5F と表記, 平成 26 年 11 月より指定薬物) および麻薬成分である JWH-018 (Figure では JWH と表記)の *c-fos* 発現への影響を検討した. また同時に,  $\Delta^9$ -THC (Figure では THC と表記)の結果と比較した.

## B. 研究方法

JWH-018 および 5-fluoro-ADB (Cayman chemical 社製)は, DMSO/emurphor® EL-620 (GAF Chemical, Wayne, NJ)/生理食塩水(1/1/18)の溶媒に溶解させた. Control (vehicle)として, 上記溶媒 DMSO/emurphor® EL-620/生理食塩水(1/1/18)を用いた.

日本 SLC から購入した約 9 週齢の雄の C57/BL6 マウスを, 1 匹ずつテストケージに移し, 実験環境で約 2 時間馴化を行った. 馴化後, 5-fluoro-ADB(5 mg/kg), JWH-018(5 mg/kg)又は vehicleを腹腔内に注射し(各 n=2), 60 分後にマウスをイソフルラン麻酔し, 4% パラホルムアルデヒドで還流固定後, 脳を摘出した. 摘出した脳は 4% パラホルムアルデヒドで一晩後固定したのちに, パラフィンブロックを作成し, 自動パラフィン切片作製装置(KURABO, AS-200S)を用いて 5  $\mu$ m の切片を作成した. 切片は, 4枚の連続切片を 50  $\mu$ m 毎に作成し, これを全脳にわたって行った. 得られた切片は自動 *in situ* Hybridization 装置(Roche, VENTANA XT)を用いて *c-fos* mRNA の発現を検出した. なお,  $\Delta^9$ -THC は 10 mg/kg を腹腔内投与した結果を比較として示した [9].

(倫理面の配慮)

動物実験は, 大阪バイオサイエンス研究所の「動物実験に関する指針」を厳守し, 動物福祉の観点に基づいて, 適切な実験計画, 実験手技のもとで実施した.

## C. 研究結果および考察

【扁桃体中心核 (central amygdala) における *c-fos* mRNA の発現】

Fig. 1 に, control (vehicle),  $\Delta^9$ -THC, 5-fluoro-ADB および JWH-018 を投与したマウスの扁桃体中心核 (central amygdala) における *c-fos* mRNA の発現結果を示した. それぞれの条件につき 2 個体ずつの解析結果を示す. 上段 (a)に central amygdala (CeA, 赤で示す領域)を含む脳の切片, 下段(b)に CeA 周辺部位 (黒い四角) の拡大図を示す. Control では CeA に *c-fos* 発現は殆ど認められなかった. 一方,  $\Delta^9$ -THC, 5-fluoro-ADB および JWH-018 の投与ではいずれの条件でも CeA における *c-fos* 発現上昇が認められた.

【室傍核 (paraventricular hypothalamic nucleus, PVN) および視索上核 (supraoptic nucleus, SO) における *c-fos* mRNA の発現】

Fig. 2 に, control (vehicle),  $\Delta^9$ -THC, 5-fluoro-ADB および JWH-018 を投与したマウスの室傍核 (PVN) および視索上核 (SO) における *c-fos* mRNA の発現結果を示した. それぞれの条件につき 2 個体ずつの解析結果を示す. 上段 (a)は, 室傍核 (PVN, 青色で示す領域)と視索上核 (SO, 赤色で示す領域)を含む脳の切片, 中段(b)は, SO を含む領域の拡大図, 下段(c)は, PVN を含む領域の拡大図を示す. Control では SO と PVN に *c-fos* 発現は殆ど認められなかった. 一方,  $\Delta^9$ -THC を投与した 2 個体中の 1 個体では SO と PVN に弱い *c-fos* 発現が誘導された. これに対して, 5-fluoro-ADB および JWH-018 ではいずれの個体においても, SO と PVN で強い *c-fos* 発現が認められた.



【各薬物投与後の *c-fos* mRNA の発現部位の相違点】

上記 (Fig. 1 および 2) 結果のまとめを Fig. 3 に示す。 $\Delta^9$ -THC, 5-fluoro-ADB および JWH-018 の投与は共通して扁桃体中心核(CeA)の *c-fos* 発現の上昇を誘発する。扁桃体は情動を制御する最も重要であると考えられている中枢なので、これらの薬物の投与は情動の異常を誘発する可能性がある。興味深い点は、 $\Delta^9$ -THC とは異なり、5-fluoro-ADB および JWH-018 の投与は室傍核 (PVN) や視索上核 (SO) における顕著な *c-fos* 発現の上昇も誘導することである。従って、PVN や SO の *c-fos* 発現を指標にすることで、 $\Delta^9$ -THC と 5-fluoro-ADB, JWH-018 の作用を区別できると考えられる。

全脳活動マッピングの結果から、5-fluoro-ADB, JWH-018 は $\Delta^9$ -THC よりも大きな影響を脳活動に与えると推定される。さらに、5-fluoro-ADB, JWH-018によって活性化されるPVNやSOには、oxytocin や vasopression などのホルモンを分泌する神経細胞が存在するので、これら薬物の投与はホルモンの過剰分泌による脳や心臓などの活動異常も引き起こし、重篤な行動異常を誘発する可能性がある。この可能性は、5-fluoro-ADB や JWH-018 投与動物での血中ホルモン量の計測などの実験によって検証できるだろう。また、5-fluoro-ADB, JWH-018 が $\Delta^9$ -THC よりも広い領域の神経活動を誘発した原因は不明である。5-fluoro-ADB, JWH-018 は $\Delta^9$ -THC と 共通する受容体以外に、別の受容体も活性化しているのかもしれない。

#### D. 結論

本研究では、合成カンナビノイドとして、新規流通成分 5-fluoro-ADB および麻薬成分である JWH-018 の *c-fos* 発現への影響を検討した。また同時に、 $\Delta^9$ -THC の結果と比較した。

その結果、 $\Delta^9$ -THC, 5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与は共通して情動を制御する中枢である扁

桃体中心核(CeA)の *c-fos* 発現の上昇を誘発した。さらに、 $\Delta^9$ -THC とは異なり、5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与は室傍核 (PVN) や視索上核 (SO) における顕著な *c-fos* 発現の上昇も誘導した。従って、PVN や SO の *c-fos* 発現を指標にすることで、 $\Delta^9$ -THC と 5-fluoro-ADB および JWH-018 の作用を区別できると考えられる。以上のように、全脳活動マッピングの結果から、5-fluoro-ADB および JWH-018 は $\Delta^9$ -THC よりも大きな影響を脳活動に与えると推定される。従って、今後、様々な薬物を投与した条件で、大脳の神経活動と、扁桃体、室傍核や視索上核の神経活動を解析することで、その薬物が重篤な行動異常を誘発するリスクを評価できる可能性が考えられる。今後さらに、興奮薬、鎮静薬、幻覚薬等の薬物に関して中枢神経への影響を検討し、薬物の中枢作用評価法を確立すべく検討を行う予定である。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 19 年度, 20 度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用」及び「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用および血漿中薬物濃度に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 2) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度-23 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」, 「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究 (2)」及び「麻薬成分ケタミン誘導体:メトキセタミンのラット脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)

- 3) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Matsumoto N., Huang Z.L., Urade Y., Goda Y. Effects of synthetic cannabinoids on electroencephalogram power spectra in rats. *Forensic Sci. Int.* (2012) 215:179-183.
- 4) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグ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」平成 24 年度, 25 年度研究分担報告「カチノン系化合物  $\alpha$ -VVP 及び合成カンナビノイド MAM-2201 のラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」及び「新規流通合成カンナビノイド QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC 及び NNEI indazole analog のラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 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)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 25 年度研究分担報告「大麻主活性成分  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC)の神経活動マーカー遺伝子(c-fos m-RNA)発現への影響」(内山奈穂子, 小早川令子)

F. 健康危険情報  
特になし.

G. 研究発表  
特になし.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし.

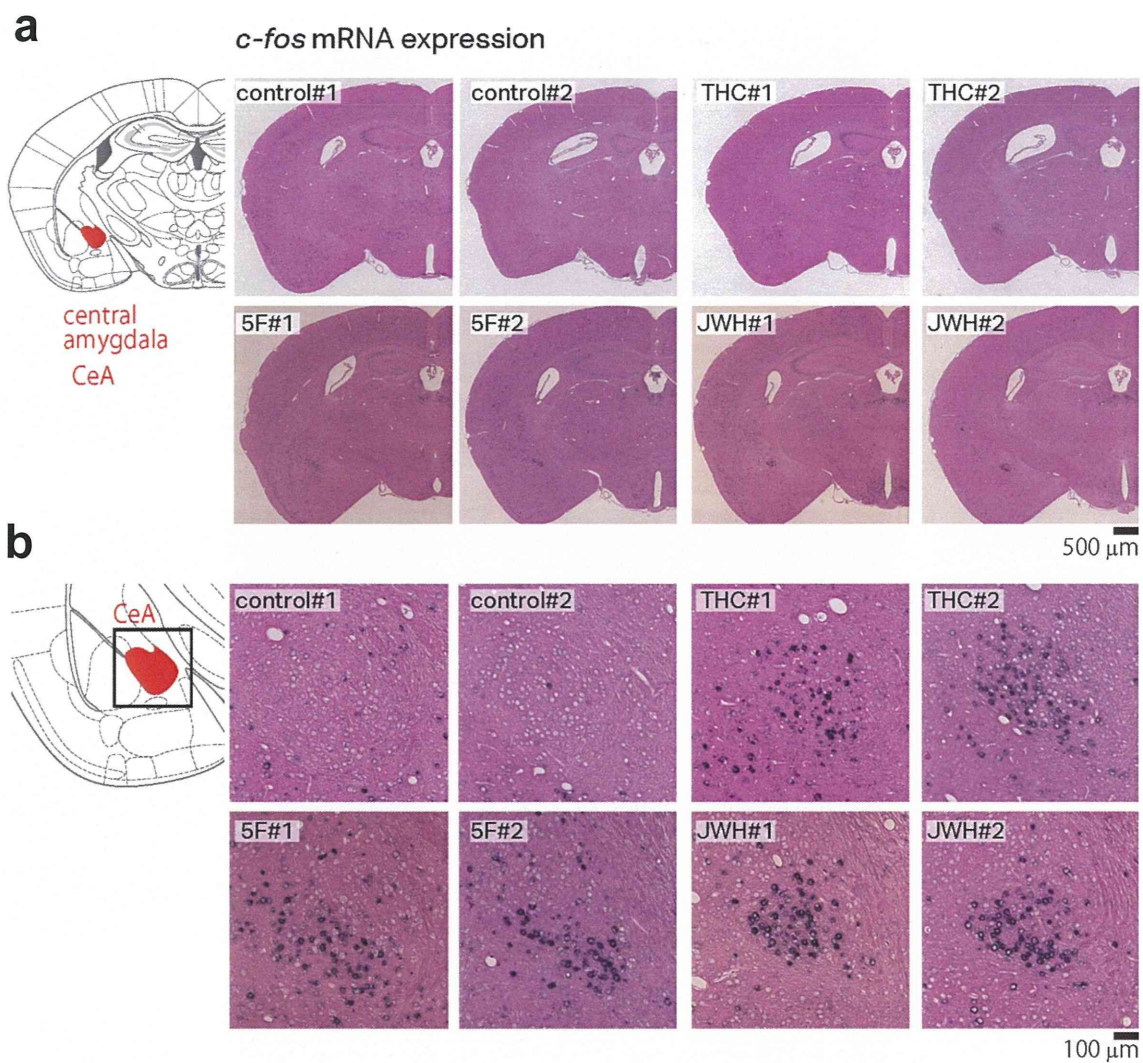


Fig. 1. 扁桃体中心核 (central amygdala, CeA) における *c-fos* mRNA の発現



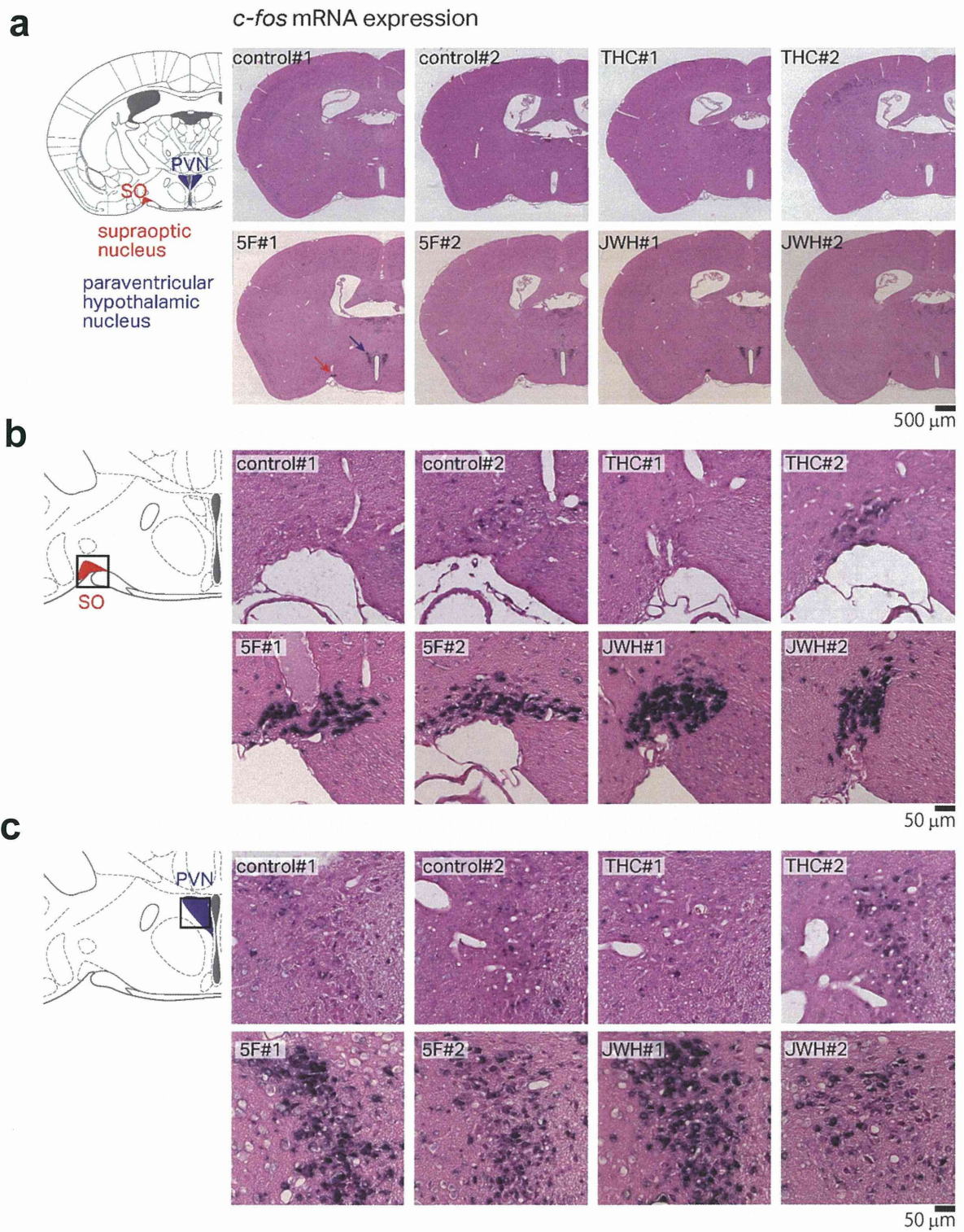


Fig. 2. 室傍核 (paraventricular hypothalamic nucleus, PVN) および視索上核 (supraoptic nucleus, SO) における *c-fos* mRNA の発現

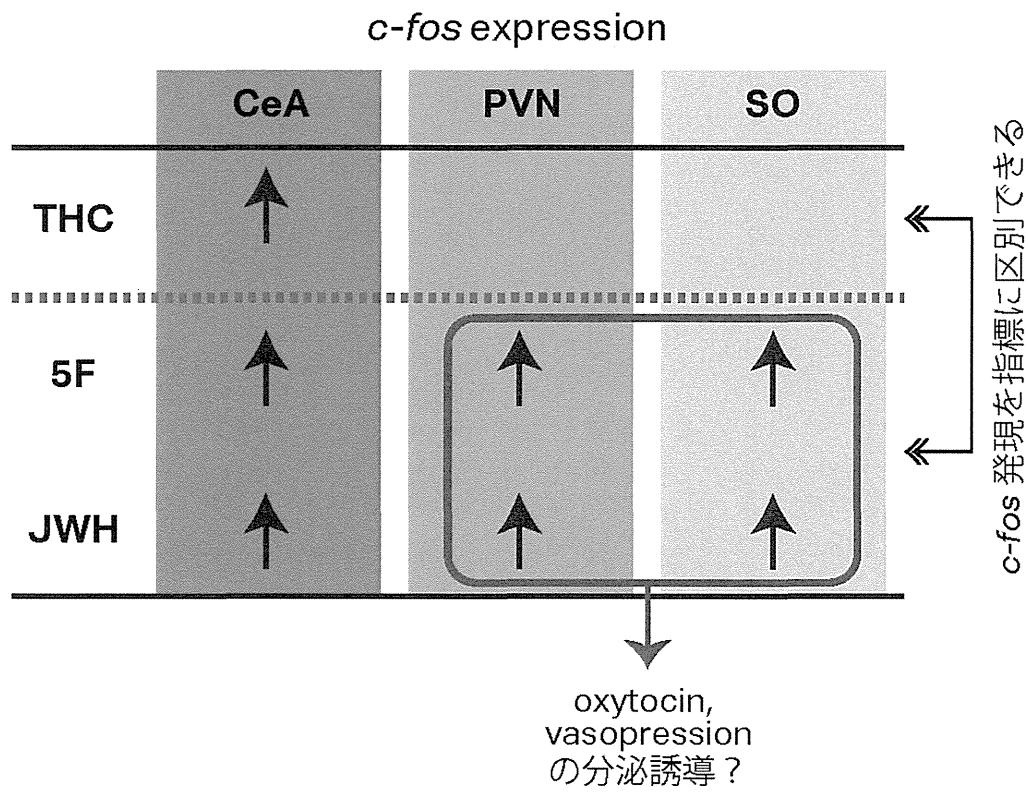


Fig. 3. 各薬物投与後の *c-fos* mRNA の発現部位の相違点

分担研究報告書

分担研究課題:違法ドラッグの分析に関する研究  
分担研究者:豊岡利正 静岡県立大学薬学部 教授

—超臨界流体クロマトグラフィー質量分析法によるカンナビノイド類の測定に関する研究—

研究要旨: 国内外を問わず、様々な危険ドラッグが市場に出回っており、社会問題となっている。通常、これらの薬物に対する分析法としては定性・定量の両面から、ガスクロマトグラフィー(GC)や液体クロマトグラフィー(LC)と質量分析法(MS)を組み合わせた方法がとられている。本研究では、比較的脂溶性の高い化合物の分離手段として最近注目されている超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)に着目し、合成カンナビノイド類の分離検出法を確立し、実試料(乾燥植物片)の測定を行った。はじめに BEH 2-EP カラムによる分離検出を実施した。グラジエント溶出条件下、8種類の合成カンナビノイド類を12分以内に分離・検出することができた。また、キラルカラム(Trefoil AMY1)による分離では、光学不活性な化合物のみならず、CCHのcis体とtrans体の光学異性体を含めて4分以内の短時間で分離検出できた。本法を3種の実試料(乾燥植物片)の測定に応用したところ、JWH-018は、実試料GとYからは検出され、JWH-073は、実試料Aから低濃度検出された。一方、CCHでは、cis体、trans体、それらの光学異性体の4種すべてが実試料AとYにおいて検出された。しかし、実試料Gでは、cis体の2種のみでtrans体は検出されなかった。以上の結果からSFC-MSは、GC-MSやLC-MSに続く第三の方法としなり得ることが示唆された。

A. 研究目的

危険ドラッグは、催眠・興奮・幻覚作用などを引き起こす成分を含み、治療法の確立されていない薬物も多いため極めて危険である。実際に、吸引・飲用者による意識障害や嘔吐・痙攣などによる緊急搬送の事例や交通事故や死亡事件が急増している。厚生労働省は2007年から「指定薬物」制度をスタートさせているが、主成分の化学構造の一部を変えて規制の網をくぐり抜ける「新製品」が後を絶たず、いたちごっこが続いている。このため2013年3月から化学構造が似た物質を一括して規制する「包括規制」を導入し、更に2014年4月には指定薬物の所持・使用を罰則付きで禁止した。しかし有害成分を特定できないければ、指定薬物として取締りができないため、迅速な検査・鑑定が望まれている。

一般に成分の特定には、定性・定量性の両面からGC-MS法やLC-MS法が汎用されており、多くの分析例が報告されている。しかし更に、鑑定精度を上げるためには、複数の分析法の併用が望まれる。近年、脂溶性化合物の分離分析法の一つとして超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)が注目されている。SFCでは、溶出溶媒としては二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)を主に用い、大量に有機溶媒を使用しないため環境への負荷も少なく、更に短時間で分析できるため、LCの順相分析法に代り得る方法と考えられる。このような背景から本研究では、SFC-MSによる合成カンナビノイド類の分析および実試料の測定を実施した。

B. 研究方法

1. 試薬

合成カンナビノイド標準品 (カンナビシクロヘキサノール (CCH), CP-47497, JWH-073, JWH-250, HU210, CP-55940, CBD) (Fig. 1)は、国立医薬品食品衛生研究所より入手した。これらの標準品 1mg を量り、アセトニトリル (ACN) 1mL に溶解し標準溶液とした。2009 年に入手した実試料3種 (乾燥植物片) は、各 10mg に ACN 1mL を加え、ボルテクスミキサーで 1 分攪拌、次いで遠心分離後、その上清液を実試料溶液とした。ACN およびメタノール (MeOH) は、関東化学より購入した (LC-MS 用)。二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) ガスは、食品添加物用を使用した。

## 2. SFC-MS/MS 分析

SFC-MS 測定には、ACQUITY UPC<sup>2</sup>/Xevo TQD タンデム四重極型質量分析計 (Waters)、カラムは UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP (3.0 mm, i.d., x 100 mm, 1.7µm; Waters), UPC<sup>2</sup> Trefoil AMY1 (3.0 mm, i.d., x 150 mm, 2.5µm; Waters)、カラム温度は、40°C、移動相として、MeOH 含有の CO<sub>2</sub> を用いた。MS/MS 測定はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法の positive ion mode (ESI<sup>+</sup>) および negative ion mode (ESI<sup>-</sup>) で行った。その他の溶出条件および MS 測定条件は、Table 1 と Table 2 に示した。自動解析ソフトとして MassLynx XS を使用した。

## C. 研究結果

はじめに 2-EP カラムによる分離検出を実施した。CO<sub>2</sub> とモデファイアーとして少量の MeOH を用いグラジエント溶出条件下、8種類の合成カンナビノイド類を 12 分以内に分離することができた (Fig. 2)。MS の測定では、JWH 系の薬物では、ポジティブイオン化モードにおいて感度が高く、構造中に N 原子を持たない CCH, CP-47497, CP-55940 等では、ネガティブイオン化モードでの検出が優れていた (Table 3)。検量線の直線性も 1-1000ppb の範囲において良好であり (Table 4)、いずれの薬物の検出限界は 1ppb 以下 (絶対量として 1pg 以下) と高感度であった。さらに本法を実

試料の測定に応用したところ、簡単な抽出操作のみで実試料 A と Y から、高濃度の CCH (cis 体) とその trans 異性体が検出された (Fig. 3)。CCH の構造から、cis 体と trans 体には、それぞれ異性体が存在すると考えられることから、次に、キラルカラム (Trefoil AMY1) による分離検出を試みた。Fig. 4 に示すように、本カラムを用いることにより、光学不活性な化合物のみならず、CCH の cis 体と trans 体の光学異性体を短時間 (4 分以内) で分離検出することが可能となった。検量線の直線性や検出限界も 2-EP カラムを使用した場合と同様に良好で高感度であった (Table 5)。そこで、本法を3種の実試料 (乾燥植物片) の測定に応用した。その結果、Table 6 に示すように JWH-018 は、実試料 G から高濃度検出された、また実試料 Y からは G の 1/3 程度が認められ、A からは検出されなかった。一方、JWH-073 は、実試料 A から低濃度、Y と G からは、定量限界以下であった。これらに対して、CCH では、cis 体、trans 体、それらの光学異性体の4種すべてが濃度は異なるものの実試料 A と Y において検出された。しかし、実試料 G では、cis 体の2種のみで trans 体は検出されなかった (Table 6 and Fig. 5)。

## D. 考察

SFC 用の通常カラムである 2-EP を使用することにより、立体異性体 (cis 体と trans 体) を含む合成カンナビノイド類を分離検出することができた。今回の結果では、分離に 12 分を要しているが、モデファイアーの MeOH 含量を増やすことにより、更に短時間の分析が可能と考えられる。一方キラルカラムの Trefoil AMY1 の利用によって更に光学異性体の分離検出ができ、実試料の測定によりその有用性が示された。実試料 A や Y の結果から4種の異性体がすべて検出されておりその割合も異なることから、製造過程や製造場所の特定もできる可能性もある。一方検出感度に関しては、現状においても高感度ではあるが、更に make-up 液の種類や組成を変えることにより更に高感度化

も期待でき、血液や尿等の生体試料分析にも応用できるものと示唆される。

#### E. 結論

SFC-MS/MS を用いることで、アキラルな化合物のみならずキラルな合成カンナビノイド化合物を短時間で分離検出ができた。スループットも高く溶媒の使用量を極端に抑えることができるためコストおよび環境負荷の面でも優れた方法と考えられた。今後 GC-MS や LC-MS に続く第三の方法として汎用される可能性が示唆され、危険ドラッグの鑑別の一助となるものと期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

1) 豊岡 利正, 花尻(木倉) 瑠理, 池田 日高: 超臨界流体クロマトグラフィー質量検出法 (SFC-MS) による危険ドラッグの分析, 第 25 回クロマトグラフィー科学会議, 京都 (2014.12).

2) 豊岡 利正, 花尻(木倉) 瑠理, 轟木堅一郎, 井之上浩一, 関俊哲, 池田 日高: 超臨界流体クロマトグラフィー質量検出法 (SFC-MS) による合成カンナビノイド類の分析と実試料への応用, 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015. 3).

##### 2. 論文発表

1) Takayama, T., Suzuki, M., Inoue, K., Todoroki, K., Min, J, Z., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Toyo'oka, T. UPLC-ESI-MS/MS based determination of metabolism of several new designated substances, ADB-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, QUPIC, 5F-QUPIC and  $\alpha$ -PVT, by human liver microsome. *Biomed. Chromatogr.*, **28**, 831-838 (2014).

#### G. 知的財産所有の取得状況

なし



Table 1 SFC-MS/MS conditions using 2-EP column

SFC condition	UPC <sup>2</sup>				
Column	2-EP, 1.7 $\mu$ m, 3.0mm x100mm				
Column Temp.	40°C				
Injection	1 $\mu$ L				
Mobile phase A	CO <sub>2</sub>				
Mobile phase B	MeOH				
Elution	Time (min)	Flow Rate	%A	%B	Profile
	0	2.5	99.5	0.5	
	5.0	2.5	99.5	0.5	Hold
	10.0	2.5	90	10	linear GR
	12.0	2.5	90	10	Hold
MS interface	Splitter / make-up : MeOH 0.2mL/min				
ABPR Pressure	2,500psi				
MS/MS condition	Xevo TQD Tandem quadrupole MS				
Ion mode:	ESI <sup>+</sup> and ESI <sup>-</sup>				
Capillary Voltage:	2.5 kV				
Des. Temp.:	550°C				
Ion Source Temp.	150°C				
Cone Voltage:	20V				
Desolvation gas flow:	1000L/hr				
Cone gas flow:	50L/hr				
Collision gas flow:	on				

Table 2 SFC-MS/MS conditions using AMY1 column

SFC condition	UPC <sup>2</sup>					
Column	Trefoil AMY1, 2.5 $\mu$ m, 3.0mm x150mm					
Column Temp.	40°C					
Injection	2 $\mu$ L					
Mobile phase A	CO <sub>2</sub>					
Mobile phase B	MeOH					
Elution	Time (min)	Flow Rate	%A	%B	Profile	
	0.0	2.0	90	10		
	4.3	2.0	45	55	linear GR	
	6.5	2.0	90	10	Hold	
MS interface	Splitter / make-up : MeOH 0.2mL/min					
ABPR Pressure	2,000psi					
MS/MS condition	Xevo TQD Tandem quadrupole MS					
Ion mode:	ESI <sup>+</sup> and ESI <sup>-</sup>					
Capillary Voltage:	2.5 kV					
Des. Temp.:	550°C					
Ion Source Temp.:	120°C					
Cone Voltage:	52V					
Desolvation gas flow:	900L/hr					
Cone gas flow:	50L/hr					
Collision gas flow:	on					

Table 3 Detection conditions of SFC-MS/MS of cannabinoids using different columns

Drug	Formula	M.W	ESI	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (eV)	
						2-EP	AMY1
CCH (trans)	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	332.52	—	331.5	313.4	30	26
CCH (cis)	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	332.52	—	331.5	313.4	30	26
CP-47497	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318.49	—	317.5	299.2	30	30
CP-55940	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	376.57	—	375.5	357.7	30	30
JWH-073	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> NO	327.40	+	328.5	155.1	30	30
JWH-018	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> NO	341.44	+	342.4	155.1	28	28
JWH-250	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	335.20	+	336.2	121.1	20	20
HU210	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	386.56	+	387.6	71.1	20	20
CBD	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314.46	+	315.5	193.1	20	20

Table 4 Calibration curves of tested cannabinoids

Drug	Range (ppb)	Linear equation	r
CCH (trans)	1-100	$y = 10.17x - 2.442$	0.9999
CCH (cis)	1-100	$y = 7.698x - 5.951$	0.9996
CP-47497	1-100	$y = 3.824x - 2.220$	0.9995
JWH-073	1-100	$y = 257.9x + 223.0$	0.9966
JWH-018	1-100	$y = 128.0x + 78.57$	0.9998
JWH-250	1-100	$y = 220.9x + 16.80$	0.9998
HU210	1-100	$y = 50.34x - 13.25$	0.9999
CP-55940	5-100	$y = 1.370x - 4.585$	0.9996
CBD	5-100	$y = 1.655x + 0.1013$	0.9983

Table 5 Retention time and sensitivity of cannabinoids by SFC-MS/MS analysis

Drug	2-EP		AMY1	
	RT (min)	LOD(S/N=3)ppb	RT (min)	LOD(S/N=3)ppb
CCH (trans)	8.12	0.200	2.24 3.53	0.116 (trans-1)* 0.188 (trans-2)*
CCH	8.64	0.750	2.10 2.87	0.137 (cis-1)* 0.188 (cis-2)*
CP-47497	8.61	0.370	2.65	0.750
JWH-073	4.17	0.004	2.78	0.002
JWH-250	3.64	0.012	2.47	0.015
HU210	9.19	0.300	1.65	0.075
CP-55940	10.24	3.750	1.96	2.000
CBD	4.21	1.500	1.45	0.091
JWH-018	3.92	0.012	2.76	0.030

\* Calculated as 1:1 mixture of trans-1 (cis-1) and trans-2 (cis-2).

Table 6 Determination of dried plant pieces products by SFC-MS/MS using 2-EP column

Product	Concentration (ppm)				Ratio
	JWH-018	JWH-073	CCH (trans)	CCH (cis)	(cis/trans)
A	ND	8.78	1079	4802	4.45
Y	4803	ND	308.6	4983	16.15
G	10612	ND	ND	29.42	-

ND: not detected

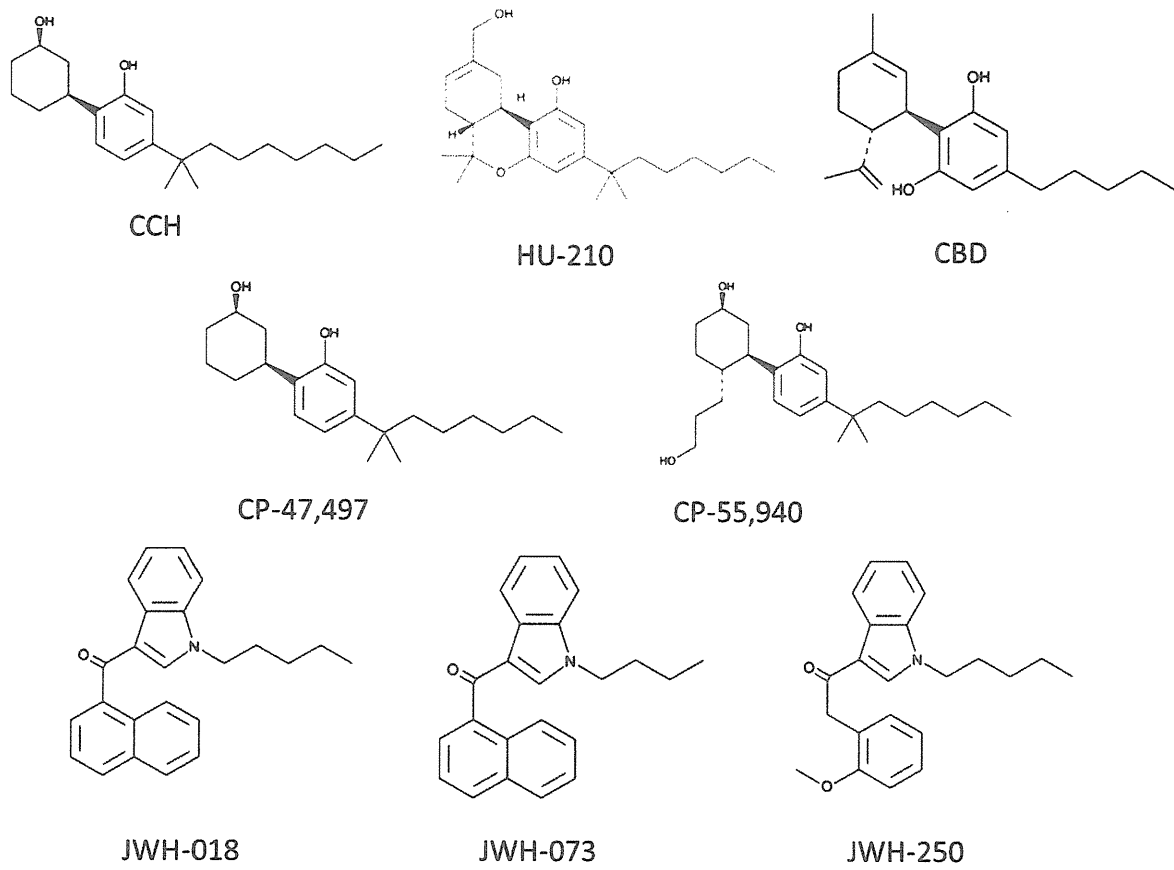


Fig. 1 Structure of cannabinoids