

—原著—

違法ドラッグとして流通している合成カンナビノイド類の分析

財津 桂^{*1}, 片木宗弘^{*1}, 中西啓子^{*1}, 志摩典明^{*1}, 鎌田寛恵^{*1},
鎌田 徹^{*1}, 西岡 裕^{*1}, 三木昭宏^{*1}, 辰野道昭^{*1},
岩村樹憲^{*2}, 佐藤貴子^{*3}, 土橋 均^{*3}, 鈴木廣一^{*3}

大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所^{*1}, 松山大学薬学部医療薬学科^{*2},
大阪医科大学社会医学講座法医学教室^{*3}
〒541-0053 大阪市中央区本町1-3-18^{*1}
〒790-8578 松山市文京町4-2^{*2}
〒569-8686 大阪府高槻市大学町2-7^{*3}

Comprehensive Analytical Methods of the Synthetic Cannabinoids Appearing In the Illicit Drug Market

Kei Zaitso^{*1}, Munehiro Katagi^{*1}, Keiko Nakanishi^{*1}, Noriaki Shima^{*1}, Hiroe Kamata^{*1},
Tooru Kamata^{*1}, Hiroshi Nishioka^{*1}, Akihiro Miki^{*1}, Michiaki Tatsuno^{*1},
Tatsunori Iwamura^{*2}, Takako Sato^{*3}, Hitoshi Tsuchihashi^{*3} and Koichi Suzuki^{*3}

Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police H.Q.^{*1}
1-3-18, Hommachi, Chuo-ku, Osaka 541-0053, Japan
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University^{*2}
4-2, Bunkyo-Cho, Matsuyama, Ehime 790-8578, Japan
Department of Legal Medicine, Osaka Medical College^{*3}
Daigakumachi 2-7, Takatsuki City, Osaka, 569-8686, Japan

(Received 2 March 2011; accepted 27 April 2011)

Comprehensive analytical method to identify 11 kinds of synthetic cannabinoids has been investigated by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The analytes used in this study have already been detected from various herbal-type designer drugs: 8 kinds of aminoalkylindoles (AAIs) (JWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-200, JWH-250, JWH-251 and JWH-398), two kinds of cyclohexylphenols (CPs) (CP 47,497 and Cannabicyclohexanol), and a Δ^9 -tetrahydrocannabinol analog (HU-210).

Although specific color changes were observed for the cannabinoids using Marquis reagent, identification of each analyte based on R_f values was difficult to be obtained by TLC.

On the other hand, GC/MS and LC/MS/MS were appropriate for their qualita-

*本論文の内容は日本科学技術学会第16回学術集会発表における奨励賞を受賞した。

tive analyses because of their chromatographic and mass spectral differentiation. A semi-polar capillary column DB-5MS showed the best separation and retention properties of the targeted cannabinoids among the tested GC column phases. Also, characteristic fragment ions were observed in each electron ionization-mass spectrum. The observed fragment ions were mainly derived from α -cleavage of ketone and α -cleavage of amine for AAs, simple cleavage for CPs, and McLafferty rearrangements for HU-210.

Based on the ionization efficiency of the target analytes using LC/MS/MS, electrospray ionization positive mode was selected for AAs, and negative mode for CPs and HU-210. All analytes were completely separated by gradient elution of ammonium formate aqueous solution-acetonitrile mobile phase on a C₁₈ (ODS) separation column. In addition, characteristic fragment ions were observed in product ion spectra of AAs and second generation product ion spectra of CPs and HU-210, enabling reliable confirmation.

These results provide useful information not only for simultaneous analyses of the targeted cannabinoids but also for structural assignment of future cannabimimetic compounds that may appear in the illicit drug market.

Key words: Synthetic cannabinoids, herbal-type designer drug, TLC, GC/MS, LC/MS/MS

緒言

「ゲートウェイドラッグ」と呼ばれる大麻の乱用は、わが国において低年齢化が進んでおり、覚せい剤メタンフェタミンの乱用と並んで深刻な社会問題の1つである¹⁾。さらに近年、大麻や覚せい剤の乱用と並んで、違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)と呼ばれる薬物の乱用が新たな社会問題となっている²⁾。これらは覚せい剤や麻薬といった既存の規制薬物の構造を一部改変し、法規制を意図的に逃れるために合成された薬物であり、これまでに流通が確認されている主な違法ドラッグは、その基本構造からフェネチルアミン系、トリプタミン系あるいはピペラジン系に大別されている²⁻⁴⁾。違法ドラッグは官能基の一部を変換することで、次々と類似の化合物を合成することができるため、今なお、新たな違法ドラッグは増え続けている。これらの多くは親化合物となる麻薬や覚せい剤と同等あるいはそれ以上の薬理作用を有するものもあり、厚生労働省は麻薬及び向精神薬取締法や薬事法の改正により違法ドラッグの規制強化を進めてきた。

しかし、2006年ごろからヨーロッパを中心に、大

麻の代替を目的とした植物様ドラッグが「Spice」などの名称で流通し始め、現在ではその乱用が世界規模に拡大し、国際的な問題となっている⁵⁾。これら植物様ドラッグには、当初から多量のトコフェロール(ビタミンE)が添加されていることが知られていたが、大麻様作用を示す有効成分の詳細については不明であった。しかし、2008年に Auwärter らが、これら植物様ドラッグから 2-[(1R, 3S)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl) phenol (通称 CP 47,497)、その C₈ 同族体である 2-[(1R, 3S)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methylnonan-2-yl) phenol (通称カンナビシクロヘキサノール) およびインドール誘導体の 1-pentyl-3-(1-naphthoyl) indole (通称 JWH-018) を検出し、これら植物様ドラッグには人工的に合成された薬物が添加されていることが明らかとなった^{5,6)}。

さらに2009年には、JWH-018の構造類似体である 1-propyl-3-(1-naphthoyl) indole (通称 JWH-073)、1-pentyl-3-(4-chloro-1-naphthoyl) indole (通称 JWH-398) および 3-(2-methoxyphenyl) acetyl-1-pentylindole (通称 JWH-250)、あるいはジベンゾピラン環を有する (6aR, 10aR)-9-

(hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-3-(2-methyloctan-2-yl)-6a,7,10,10a-tetrahydrobenzo[*c*]chromen-1-ol (通称 HU-210) といった薬物の検出が次々と報告され⁵⁾, 2010年以降も新たな薬物の検出が相次いで報告されている⁷⁻¹³⁾.

現在乱用されている植物様ドラッグに添加されている薬物は, 大麻の幻覚成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) と同じく, いずれもカンナビノイド受容体のアゴニストであり, 「合成カンナビノイド」 (synthetic cannabinoid) あるいは

「擬似カンナビノイド」 (cannabimimetic) と呼ばれ, これらを摂取することで大麻と同様の薬理作用を発現すると考えられている⁵⁾. このような植物様ドラッグからは, これまでに Fig. 1 に示すような多種の合成カンナビノイド類の検出が報告されているが, これらは構造的に幾つかのグループに大別できる^{5,14-19)}.

最も検出例の多いアミノアルキルインドール (AAI) 類は, 1990年代に J. W. Huffman により合成されたもので, その多くがカンナビノイド受容体

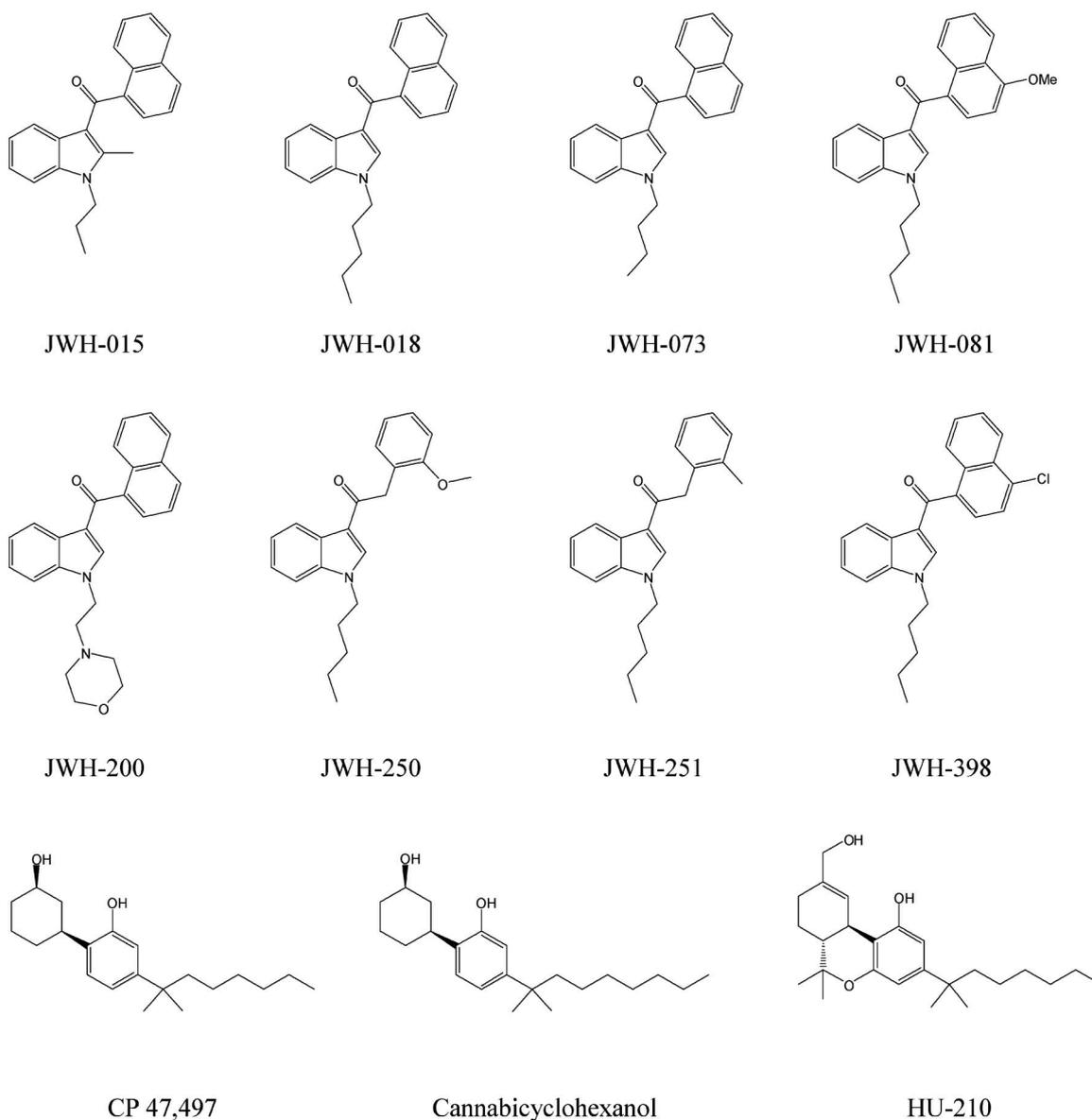


Fig. 1 Chemical structures of the synthetic cannabinoids targeted in this study.

CB₁あるいはCB₂のアゴニストである^{5,14-19}。これらはJ. W. Huffmanの頭文字を取って「JWH compounds」とも称され、化合物ごとにJWH-018やJWH-250といった略号が付けられている。AAI類は基本骨格の違いによって、さらにナフトイルインドール類、フェニルアセチルインドール類、ベンゾイルインドール類などに分類することができる。

一方、CP 47,497やカンナビシクロヘキサノールは、シクロヘキシルフェノール (CP) 類と呼ばれ、1980年代にファイザー社で合成されたカンナビノイド受容体CB₁のアゴニストである^{5,20}。またHU-210は、1988年にMechoulamらにより合成されたカンナビノイド受容体のアゴニストであり、 Δ^9 -THCと同じジベンゾピラン環を有し、 Δ^9 -THCと比べて数百倍のアゴニスト活性を発現するとされている^{5,21}。

一般的に、大麻喫煙による幻覚作用、多幸感、陶酔感、高揚感などは、大麻の含有成分である Δ^9 -THCが、中枢および自律神経系に存在するカンナビノイド受容体CB₁に主として作用するためであるとされている^{1,22}。乱用されている合成カンナビノイド類は、カンナビノイド受容体、特に幻覚作用に寄与するとされるCB₁受容体に対する結合親和力が Δ^9 -THCと同程度あるいはそれ以上のものが多く、極微量で大麻様効果が発現するとされている。そのため、過剰摂取による急性中毒事故や長期摂取による依存の形成などの危険性が指摘されており^{5,23}、実際にロシアではJWH-018過剰摂取による急性中毒事故も発生している²⁴。

これら合成カンナビノイド類の取締りは、当初は世界的にも行われていなかったが、近年の乱用の拡大を受け、世界各国で合成カンナビノイド類の規制強化が進んでいる。わが国においても、数年前から合成カンナビノイドを添加した植物様ドラッグがインターネットあるいはアダルトショップなどで違法ドラッグとして販売されており、その乱用の拡大が懸念された。そこで2009年10月からJWH-018、CP 47,497およびカンナビシクロヘキサノールが薬事法に規定の「指定薬物」に指定され、その製造、販売および輸入が禁止されている。さらに2010年8月にはJWH-073およびJWH-250が指定薬物に追加さ

れ、違法ドラッグとして流通している合成カンナビノイド類の規制強化が進んでいる。しかし、指定薬物による規制強化後も、規制化合物と構造が酷似した新たな合成カンナビノイド (特にAAI類) が次々と出現し、まさに「いたちごっこ」の様相を呈しているのが現状である。従って、違法ドラッグとして流通している合成カンナビノイド類の信頼性の高い分析法を確立することが急務となっている。しかし現在のところ、これら合成カンナビノイドの分析法について系統的に検討したものはない。加えて、今後も新たな合成カンナビノイドが流通することは想像に難しくなく、それらの分析や構造推定を行う上でも、上記合成カンナビノイド類の分析法を確立しておくことが不可欠である。

そこで本研究では、現在までに市場での流通が確認されている主な合成カンナビノイド11種類について、法薬毒物分野における汎用分析法である薄層クロマトグラフィー (TLC) およびガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) と共に、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC/MS/MS) を組み合わせた包括的な分析法について検討を行った。

材料および方法

1. 試料

2-methyl-1-propyl-3-(1-naphthoyl) indole (通称JWH-015)、JWH-018、JWH-073、1-pentyl-3-(4-methoxy-1-naphthoyl) indole (通称JWH-081)、JWH-250、3-(2-methylphenyl) acetyl-1-pentylindole (通称JWH-251) およびJWH-398はHuffmanらの方法に従って合成した^{14-18,25}。各合成標準品は核磁気共鳴分析、質量分析などでその構造を確認した。CP 47,497およびカンナビシクロヘキサノールはCayman Chemicalより購入したものを、HU-210はTocris bioscienceより購入したものをそれぞれ用いた。各標準品は全てメタノールに溶解し、1 mg/mlの濃度に調整したものを標準溶液とした。これらの標準溶液は使用時まで冷凍庫で保存し、用時メタノールで希釈して用いた。その他の試薬は全て和光純薬製の特級試薬あるいはそれ以上のグレードの試薬を用いた。

2. 分析方法

(1) TLC

各標準溶液をシリカゲルプレート（メルク社製，シリカゲル60F₂₅₄）に点着し，展開溶媒1~3を用いてTLCを行い，風乾した．マルキス試薬，ドラーゲンドルフ試薬，Fast Blue BB 試薬およびUVを用いて各スポットの検出を行い，*R_f*値を求めた^{26,27}．

展開溶媒1：トルエン・ヘキサン・ジエチルアミン（25：10：1，*v/v*），展開溶媒2：ヘキサン・酢酸エチル・28%アンモニア水（30：10：1，*v/v*），展開溶媒3：アセトン・トルエン・28%アンモニア水（20：10：1，*v/v*）．

(2) GC/MS

装置は島津製作所製 GCMS-QP2010 Plus を用いて，以下の条件で分析を行った．

分析カラム：Agilent Technologies 社製 DB-1MS, DB-5MS および DB-17MS（何れも0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚0.25 μm），カラム温度：80°C（1分間保持）-320°C（10°C/min, 10分保持），キャリアガス：ヘリウム，キャリアガス流量：1.0 ml/min，試料注入法：スプリットレス（試料導入時間：1分），注入口温度：250°C，イオン化法：電子イオン化（EI），イオン化エネルギー：70 eV，スキャンモードにおける走査範囲：*m/z* 40-450，選択イオンモニタリングモード（SIM）におけるモニターイオン：*m/z* 100（JWH-200），*m/z* 214（JWH-250およびJWH-251），*m/z* 215（CP 47,497およびカンナビシクロヘキサノール），*m/z* 302（HU-210），*m/z* 327（JWH-015およびJWH-073），*m/z* 341（JWH-018），*m/z* 371（JWH-081），*m/z* 375（JWH-398），試料注入量：1 μl

(3) LC/MS/MS

液体クロマトグラフは島津製作所製 Prominence，質量分析計は Thermo Scientific 社製リニアイオントラップ型 LXQ を用いて，以下に示す条件で分析を行った．

C₈カラム：CAPCELL PAK C₈（資生堂製，150 mm × 1.5 mm i.d., 粒子径 5 μm），C₁₈（ODS）カラム：L-column 2 ODS（化学物質評価研究機構製，150 mm × 1.5 mm i.d., 粒子径 5 μm），移動相1：A

液10 mM ギ酸アンモニウム水溶液（pH 3.5）-アセトニトリル（50：50），B液10 mM ギ酸アンモニウム水溶液（pH 3.5）-アセトニトリル（5：95），移動相2：A液10 mM ギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル（50：50），B液10 mM ギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル（5：95），グラジエント条件：B液0%から100%まで15分のリニアグラジエント後，B液100%で10分間保持，流速0.1 ml/min，イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）-ポジティブあるいはESI-ネガティブ，キャピラリー電圧：40 V（ESI-ネガティブモード）あるいは-40 V（ESI-ポジティブモード），Activation type: CID, Isolation width: 2.0, Normalized collision energy: 35.0, Activation Q: 0.250, Activation time: 30 msec, product mass width: ±0.50, プリカーサーイオン：*m/z* 328（JWH-015），*m/z* 342（JWH-018），*m/z* 328（JWH-073），*m/z* 372（JWH-081）*m/z* 385（JWH-200），*m/z* 336（JWH-250），*m/z* 320（JWH-251），*m/z* 376（JWH-398），*m/z* 317（CP 47,497），*m/z* 331（カンナビシクロヘキサノール），*m/z* 385（HU-210），試料注入量：5 μl

結果および考察

1. TLC

各展開溶媒におけるJWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-250, JWH-251, JWH-398, CP 47,497, カンナビシクロヘキサノールおよびHU-210の各検出試薬による検出限界および色調をTable 1に，また各化合物の*R_f*値をTable 2に示す．

AAI類は，何れの化合物もUVで比較的高感度に検出されるが，モルフォリノ基を持つJWH-200を除いて何れもドラーゲンドルフ試薬には低感度であった．また，何れのAAI類もマルキス試薬で感度よく検出され，3-ナフトイルインドール骨格のものは黄色，3-フェニルアセチルインドール骨格のものは桃色あるいは褐色を示し，インドール環の3位官能基の違いによって特徴的な色調を呈した．なお，インドール誘導体であるトリプタミン系幻覚剤の検出試薬として用いられる*p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒド試薬²⁶には，各AAI類を10 μg スポットした場合でも呈色が観察されなかった．

Table 1 Detection limits obtained by TLC using detection reagents 1, 2, 3 and UV.

Compound	Detection limits (μg)			UV
	Detection reagent ^{a)}			
	1	2	3	
JWH-015	0.5 (dark yellow) ^{b)}	5	— ^{c)}	0.05
JWH-018	0.5 (yellow→brownish yellow)	5	—	0.5
JWH-073	0.5 (yellow→brownish yellow)	5	—	0.5
JWH-081	0.5 (yellow→brownish yellow)	5	—	0.05
JWH-200	0.5 (yellow)	0.5	—	0.5
JWH-250	0.5 (pink)	5	—	0.5
JWH-251	0.5 (brown)	5	—	0.5
JWH-398	0.1 (yellow)	5	—	0.1
CP 47,497	5 (orange)	—	0.5 (orange)	5
Cannabicyclohexanol	5 (orange)	—	0.5 (orange)	5
HU-210	5 (lemon yellow)	—	0.1 (red)	10

a) Detection reagents: 1, Marquis reagent; 2, Dragendorff reagent; 3, Fast blue BB reagent.

b) Final colors produced by reagents 1 and 3 are also shown in parentheses.

c) — : Not detected.

Table 2 R_f values of the synthetic cannabinoids and Δ^9 -THC obtained by TLC^{a)} with the developing solvents 1, 2 and 3.

Compound	R_f value		
	Developing solvents ^{b)}		
	1	2	3
JWH-015	0.27	0.36	0.94
JWH-018	0.37	0.45	0.97
JWH-073	0.34	0.43	0.96
JWH-081	0.26	0.36	0.96
JWH-200	0.10	0.05	0.86
JWH-250	0.27	0.35	0.94
JWH-251	0.34	0.45	0.96
JWH-398	0.53	0.53	0.96
CP 47,497	0.01	0.05	0.77
Cannabicyclohexanol	0.01	0.05	0.80
HU-210	0.02	0.04	0.80
Δ^9 -THC	0.28	0.55	0.97

a) Plate: Merck silica gel 60F₂₅₄

b) Developing solvent: 1, toluene-*n*-hexane-die-thylamine solution (25 : 10 : 1, *v/v*); 2, *n*-hexane-ethyl acetate-28% ammonia solution (30 : 10 : 1, *v/v*); 3, acetone-toluene-28% ammonia solution (20 : 10 : 1, *v/v*).

一方, CP 類およびジベンゾピラン骨格を持つ HU-210はマルキス試薬によりそれぞれ橙色, 淡黄色を呈したが, AAI 類と比較して検出感度は10分の1程度であった. しかし, これらは何れも Fast Blue BB 試薬に特徴的な呈色 (CP 類: 橙色, HU-210: 赤色) を示し, 感度よく検出することが可能であった.

大麻成分 Δ^9 -THC の TLC に汎用される展開溶媒 1 を用いた場合, AAI 類のスポットは何れもテーリングを起こし, 検出試薬による検出感度は他の展開溶媒を用いた場合と比べて10分の1程度に低下した. また, 展開溶媒 2 では JWH-200, CP 類および HU-210は何れも R_f 値が0.04~0.05とほとんど展開されなかった. 同溶媒で JWH-200以外の AAI 類は R_f 値0.36~0.45に展開されるものの, 各スポットを分離することは困難であった. さらに, 展開溶媒 3 では, AAI 類は何れも R_f 値0.86~0.97, CP 類および HU-210は R_f 値0.77~0.80と高い値に展開されたものの, AAI 類あるいは CP 類の各スポットを分離することは困難であった.

以上の結果, 各検出試薬によって構造に特徴的な呈色が観察されたものの, TLC により同類化合物を分離することは困難であった.

2. GC/MS

各標準溶液を混合し、メタノールで希釈して各化合物の濃度を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ としたものについて、3種類の異なる分析カラム (DB-1MS, DB-5MS および DB-17MS) を用いて検討を行った。各化合物の保持指標を Table 3 に示す^{28,29)}。

今回分析対象とした11種類の合成カンナビノイドは注入口などでの熱分解などは観察されず、何れのカラムを用いても本分析条件下で各ピークは良好に分離した。しかし、中極性カラムである DB-17MS

を用いた場合はカラムへの保持が強くなり、溶出時間が非常に遅くなり、特に5種類の化合物 (JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-200 および JWH-398) については保持指標が何れも4000以上となった。加えて、これら高沸点成分のピークはブロードとなり検出感度も低下したことから、DB-17MS の様な中極性カラムは合成カンナビノイド類の分析には適さないと考えられる。一方、無極性カラムである DB-1MS および微極性カラムである DB-5MS を用いた場合は、全ての化合物の保持指標は何れも4000以下であった。しかし、異性体である JWH-015 および JWH-073 の分離については DB-5MS の方が良好であったことから、DB-5MS を分離カラムとして用いることとした。Fig. 2 に DB-5MS により11種の合成カンナビノイド類を分析した結果を示す。極性の高いモルフォリノ基を持つ JWH-200 については、微極性カラムである DB-5MS を用いた場合でも保持時間が約31分 (保持指標3678) と比較的強くカラムに保持されることから、320°C への昇温終了後、10分程度恒温に保つ必要があった。なお、DB-5MS を用いた本分析条件において、スキャンモードで各化合物の良好なマススペクトルが観察される検出限界は CP 類, JWH-250 および JWH-251 で 50 ng/ml, JWH-015, JWH-018 および JWH-

Table 3 Retention indices of the synthetic cannabinoids obtained by using different column phase.

Compound	Retention index		
	DB-1MS	DB-5MS	DB-17MS
JWH-015	3044	3109	3956
JWH-018	3172	3251	>4000
JWH-073	3078	3163	>4000
JWH-081	3446	3532	>4000
JWH-200	3589	3678	>4000
JWH-250	2927	2991	3704
JWH-251	2831	2891	3541
JWH-398	3355	3434	>4000
CP 47,497	2580	2628	3066
Cannabicyclohexanol	2682	2730	3172
HU-210	3005	3066	3656

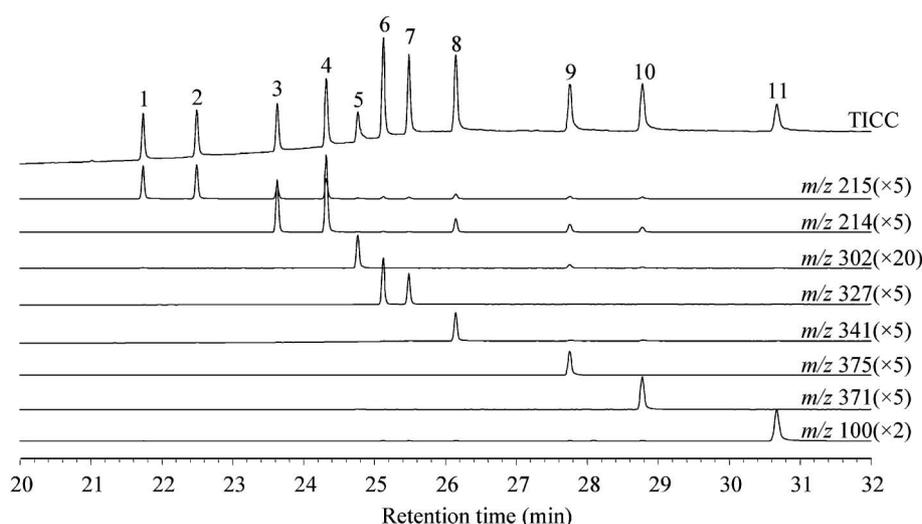


Fig. 2 Total ion current chromatogram (TICC) and extracted ion chromatograms obtained by GC/MS. Peaks: 1, CP 47,497; 2, Cannabicyclohexanol; 3, JWH-251; 4, JWH-250; 5, HU-210; 6, JWH-015; 7, JWH-073; 8, JWH-018; 9, JWH-398; 10, JWH-081; 11, JWH-200.

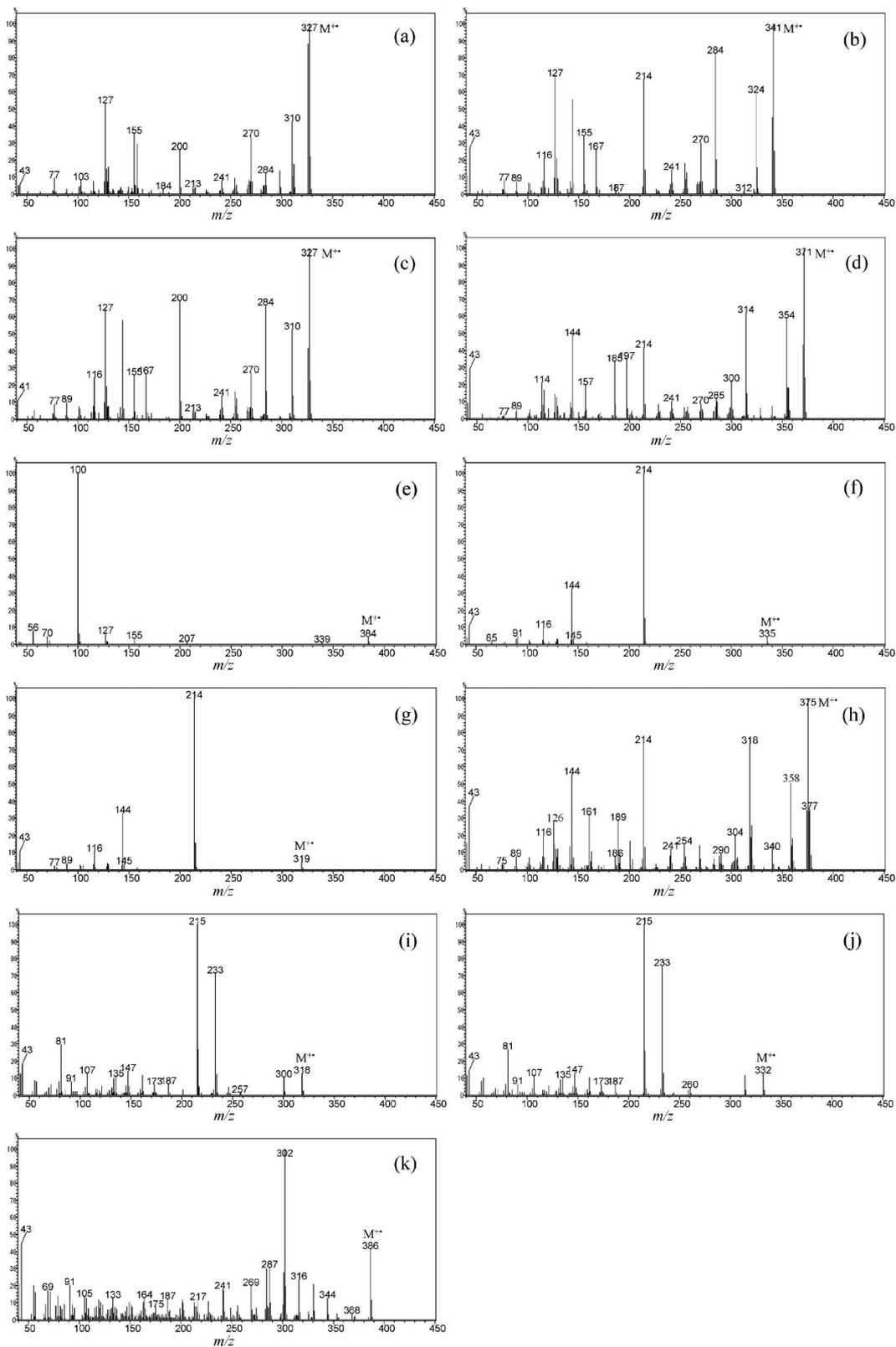


Fig. 3 EI-mass spectra of the synthetic cannabinoids. (a) JWH-015, (b) JWH-018, (c) JWH-073, (d) JWH-081, (e) JWH-200, (f) JWH-250, (g) JWH-251, (h) JWH-398, (i) CP 47,497, (j) Cannabicyclohexanol, (k) HU-210.

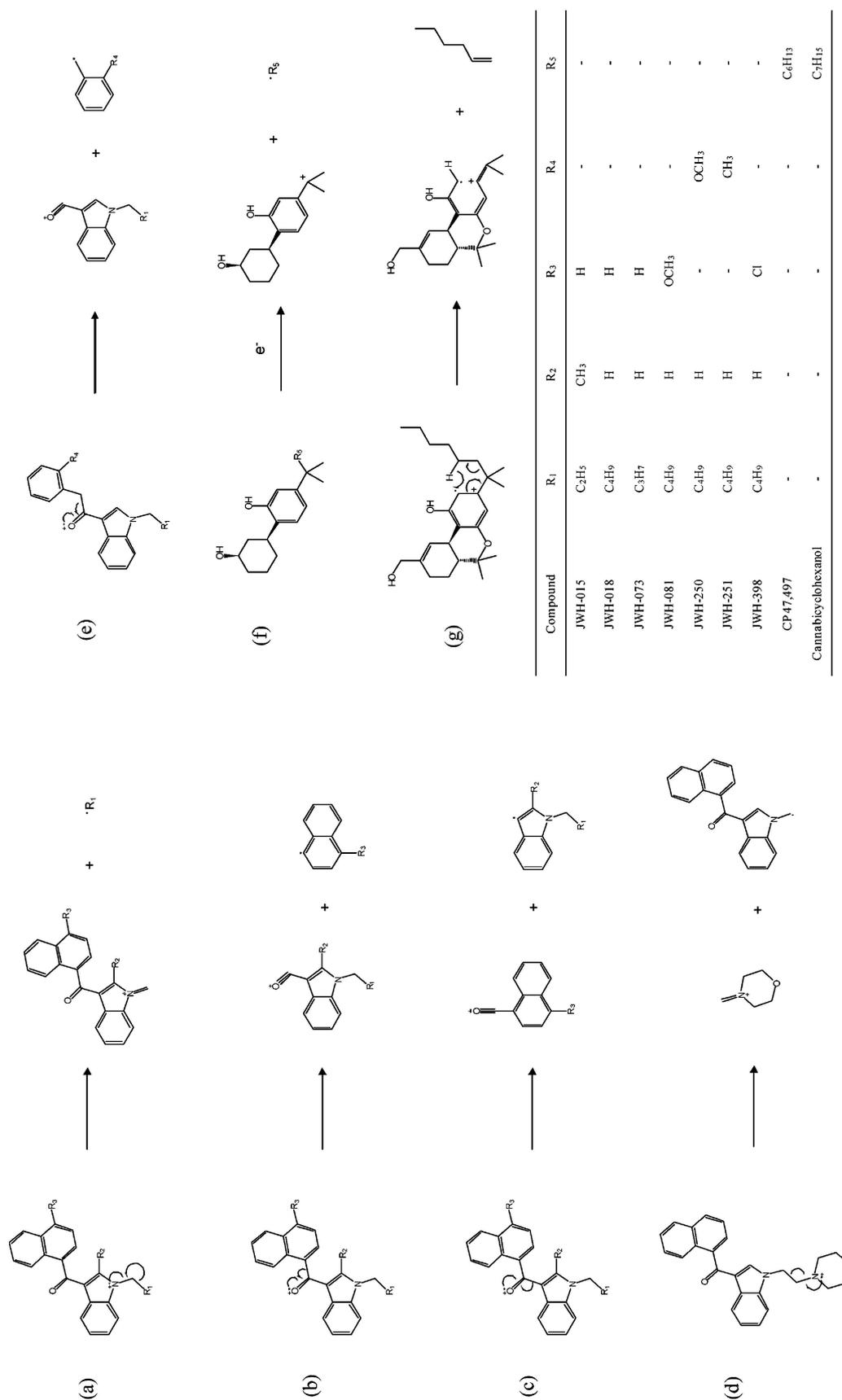


Fig. 4 Proposed mechanisms of the major fragment ions for the targeted synthetic cannabinoids. (a) α -cleavage of carbonyl group for naphthoylindoles, (b) and (c) α -cleavage of carbonyl group for naphthoylindoles, (d) α -cleavage of carbonyl group of morpholine for JWH-200, (e) α -cleavage of carbonyl group for phenylacetylindoles, (f) simple cleavage of C-C bond for Cyclohexylphenols, and (g) McLafferty rearrangements for HU-210.

073で100 ng/ml, JWH-081, JWH-200および JWH-398で500 ng/ml, HU-210で1 μ g/mlであった。また, SIMモードにおける検出限界はCP類, JWH-250および JWH-251で5 ng/ml, JWH-015, JWH-073および JWH-200で10 ng/ml, JWH-018, JWH-081, JWH-398および HU-210で50 ng/mlであった。

次に, AAI類, CP類および HU-210のEI-マススペクトルをFig. 3に示す。AAI類のうち, JWH-200を除くナフトイルインドール骨格を有する化合物 (JWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-081および JWH-398)は, 何れも分子イオン ($M^{+\cdot}$) が比較的強く観察されることに加え, ナフトイルインドール類に特徴的な水素ラジカルの脱離に伴う $[M-1]^+$ およびヒドロキシラジカルの脱離によると推定される $[M-17]^+$ のフラグメントイオンが観察された。これらのイオンはナフトイルインドール骨格に特徴的であり, フェニルアセチルインドール骨格を有する JWH-250および JWH-251では観察されなかった。さらに, ナフトイルインドール類では Fig. 4-(a)に示すようなアミンの α 開裂由来と考えられるフラグメントイオン m/z 284 (JWH-081では314, JWH-398では318) や, Fig. 4-(b)に示すようなカルボニル基の α 開裂に伴うインドール骨格側由来のフラグメントイオン (m/z 200あるいは214) ならびに Fig. 4-(c)に示すようなナフトイリウムイオン m/z 155 (JWH-081では m/z 185, JWH-398では189) および CO 脱離に伴うナフタレニウムイオン m/z 127 (JWH-081では m/z 157, JWH-398では161) がそれぞれ観察された^{30,31)}。さらに, インドール骨格に由来すると考えられる m/z 144のフラグメントイオンから CO 脱離, HCN 脱離によって生じる m/z 116, 89のフラグメントイオンが共通して観察された³⁰⁾。なお, これらのイオンは, 2-メチルインドール誘導体である JWH-015では, m/z が+14シフトした m/z 155, 130および103のフラグメントイオンとして観察された。モルフォリノ基を持つ JWH-200では, モルフォリノ基の窒素上にある非共有電子対からのラジカルイオン化が優先的に起こると考えられ³¹⁾, この窒素からの α 開裂に伴う m/z 100のフラグメントイオンが極めて強

く観察された (Fig. 4-(d))。また, フェニルアセチルインドール骨格を有する JWH-250および JWH-251では, 共通して分子イオンがほとんど観察されず, インドール骨格側のフラグメントイオン (m/z 214) が強く観察された (Fig. 4-(e))。これはフェニルアセチル基では, ベンジル位でのカルボニル基の α 開裂が非常に起こりやすいためと考えられる。

一方, CP 47,497およびカンナビシクロヘキサノールのマススペクトルは何れも類似のパターンを示し, H_2O の脱離に加えて, 側鎖アルキル基の単純開裂由来と考えられるフラグメントイオン (m/z 233) が共通して観察された (Fig. 4-(f))。また, HU-210では, H_2O の脱離に加えて, 側鎖アルキル基上の水素のマクラファティ転移によって生じると考えられるフラグメントイオン (m/z 302) が観察された (Fig. 4-(g))^{30,31)}。

このように, 各化合物のEI マススペクトルにおいては, 構造に特徴的なフラグメントイオンが観察された。これらのフラグメントイオンの把握は, 今後新たな合成カンナビノイド類が違法ドラッグとして流通した際に, それらの構造を推定する上でも非常に有用であると考えられる。

3. LC/MS/MS

(1) イオン化法の検討

各標準溶液を混合し, メタノールで希釈して各化合物の濃度を1 μ g/mlとしたもの (標準混合液) について, フローインジェクション法によりイオン化法の検討を行った。AAI類は何れもESI-ポジティブモードでプロトン化分子が検出されたが, ESI-ネガティブモードでは脱プロトン分子は全く観察されなかった。逆にCP類では, ESI-ポジティブモードではプロトン化分子が全く観察されず, ESI-ネガティブモードでのみ脱プロトン分子が観察された。また, HU-210は, ESI-ポジティブモードでプロトン化分子が, ESI-ネガティブモードで脱プロトン分子がそれぞれ観察された。HU-210のESI-ポジティブモードにおけるプロトン化分子のイオン強度とESI-ネガティブモードで観察される脱プロトン分子のイオン強度には相対的にほとんど差がなかったものの, カラムを通して分析を行う

と、S/Nに関してはESI-ネガティブモードの方が2倍程度良い結果が得られた。

なお、CP類およびHU-210何れのESI-マスペクトルにおいても、脱プロトン分子に加えて、ギ酸付加体 ($[M+HCOO]^-$) が観察された。また、実験的に移動相を酢酸アンモニウム水溶液に変更して分析を行うと、これらの酢酸付加体 ($[M+CH_3COO]^-$) が観察されたことから、CP類およびHU-210はイオン化時に酸付加体を形成しやすいものと考えられる。なお、これら酸付加体をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行うと、ギ酸のみが脱離し、脱プロトン分子 ($[M-H]^-$) に相当するイオンが観察されることから、このイオンをセカンドプリカーサーとして二次プロダクトイオンスキャンを行えば、遊離体のプロダクトイオンスペクトルに相当するマスペクトルを得ることもできる。

以上の検討結果から、AAI類のイオン化法としてはESI-ポジティブモードを、CP類およびHU-210のイオン化法としてはESI-ネガティブモードを用いることとし、AAI類はプロトン化分子を、CP類およびHU-210は脱プロトン分子をプリカーサーイオンとして選定した。なお、CP類およびHU-210については、先述のように分析時にギ酸付加体が観察されることから、ギ酸付加体をプリカーサーイオンとして分析することも可能である。

(2) 分離条件の検討

上記標準混合液を用いて、分離条件の検討を行った。AAI類、CP類およびHU-210は何れも疎水性が高いと考えられることから、移動相にアセトニトリルを使用し、分離カラムにC₈カラムあるいはC₁₈(ODS)カラムを用いて、分離条件について検討した。この結果をTable 4に示す。

予備実験においてAAI類、CP類およびHU-210は何れもODSカラムに強く保持されたことから、初期移動相のアセトニトリル濃度を50%とし、95%までのリニアグラジエント条件を用いた。ODSカラムを用いた場合、移動相のpHに関わらず各ピークは良好に分離し、異性体であるJWH-015およびJWH-073の分離も可能であった。移動相を酸性条件にした場合は、モルフォリノ基を持つJWH-200はカラムへの保持が弱まり、pHを調整しなかった場合と比べて溶出時間は2分ほど短くなった。しかし、JWH-200以外の化合物の保持時間はほとんど変化しなかったことから、これらは主に疎水性相互作用によってカラムに保持されるものと考えられる。

次に分離カラムをC₈カラムに変更し、同じ移動相条件を用いて検討を行ったところ、各化合物の保持が弱まり、ODSカラムの場合と比べて相対的に溶出時間が2~3分程度短くなった。しかし、各ピークが接近し、特に異性体であるJWH-015およびJWH-073の分離が悪くなったことから、一斉分

Table 4 Retention time of the synthetic cannabinoids obtained by using C₈ and C₁₈ (ODS) columns (n=3).

Compound	Retention time (min)			
	C ₈		C ₁₈ (ODS)	
	mobile phase pH 3.5	mobile phase no adjustment	mobile phase pH 3.5	mobile phase no adjustment
JWH-015	11.2	11.3	14.4	14.3
JWH-018	13.1	13.1	16.8	16.7
JWH-073	12.0	12.0	15.4	15.3
JWH-081	13.3	13.4	17.3	17.1
JWH-200	5.3	7.7	8.1	10.2
JWH-250	11.8	11.9	15.0	14.9
JWH-251	12.6	12.6	16.0	16.0
JWH-398	14.6	14.6	19.0	19.0
CP 47,497	11.9	11.9	15.9	15.7
Cannabicyclohexanol	13.0	13.0	17.5	17.3
HU-210	13.6	13.5	18.2	18.0

Table 5 Comparison of peak height of deprotonated molecule and formate adduct, and the adduct formation rate.

Compound	Detected form	Peak height (n = 3)		Formate adduct formation rate (n = 3)	
		Mobile phase pH 3.5	Mobile phase no adjustment	Mobile phase pH 3.5	Mobile phase no adjustment
CP 47,497	[M-H] ⁻	3963	15133	0.94	0.89
	formate adduct	3737	13433		
Cannabicyclohexanol	[M-H] ⁻	4740	16633	1.04	0.95
	formate adduct	4923	15733		
HU-210	[M-H] ⁻	7487	13967	2.59	2.62
	formate adduct	19400	36600		

析用の分離カラムとしては ODS カラムを使用することとした。

また、JWH-200を除く AAI 類の検出感度は移動相の pH によらず一定であったが、JWH-200のみ pH を酸性 (pH 3.5) にすると、検出感度が 3 分の 2 程度に低下した。

一方、Table 5 に示すように、CP 類および HU-210 のギ酸付加体の生成率は移動相の pH には依存しなかったが、移動相の pH を酸性にすると、CP 類および HU-210 の検出感度は pH を調整しなかった場合と比べて 2 分の 1 から 4 分の 1 程度に低下した。

以上の結果、移動相を酸性にすると JWH-200、CP 類および HU-210 の検出感度がそれぞれ低下したことから、一斉分析に用いる移動相の pH 調整は行わないこととした。

(3) LC/MS/MS による合成カンナビノイド類の一斉分析

上記検討結果から、分離カラムに ODS カラムを使用し、10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 未調整)-アセトニトリル系移動相を用いたリニアグラジエント条件による合成カンナビノイド 11 種類の一斉分析を行った (Fig. 5)。本分析条件において、各化合物の良好なプロダクトイオンスペクトルが観察される検出限界は JWH-200 を除く AAI 類では何れも 5 ng/ml、JWH-200、CP 類および HU-210 は何れも 50 ng/ml であった。なお、合成カンナビノイド類をギ酸アンモニウム水溶液で希釈し、LC/MS の前処理に汎用されているポリフッ化ビニリデ

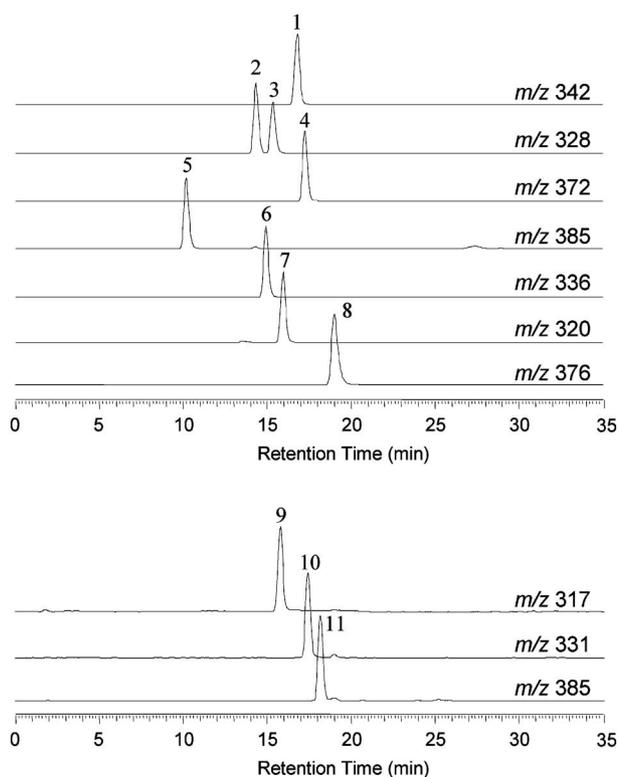


Fig. 5 Extracted ion chromatograms obtained by LC/MS/MS. Peaks: 1, JWH-018; 2, JWH015; 3, JWH-073; 4, JWH-081; 5, JWH-200; 6, JWH-250; 7, JWH-251; 8, JWH-398; 9, CP 47,497; 10, Cannabicyclohexanol; 11, HU-210.

ン (PVDF) 製フィルターで処理すると、全ての化合物が検出されなくなった。これは合成カンナビノイド類の高い脂溶性によって、フィルターへ吸着したことが主因であると考えられた。そこで希釈溶媒をメタノールに変更したところ、この現象が観察さ

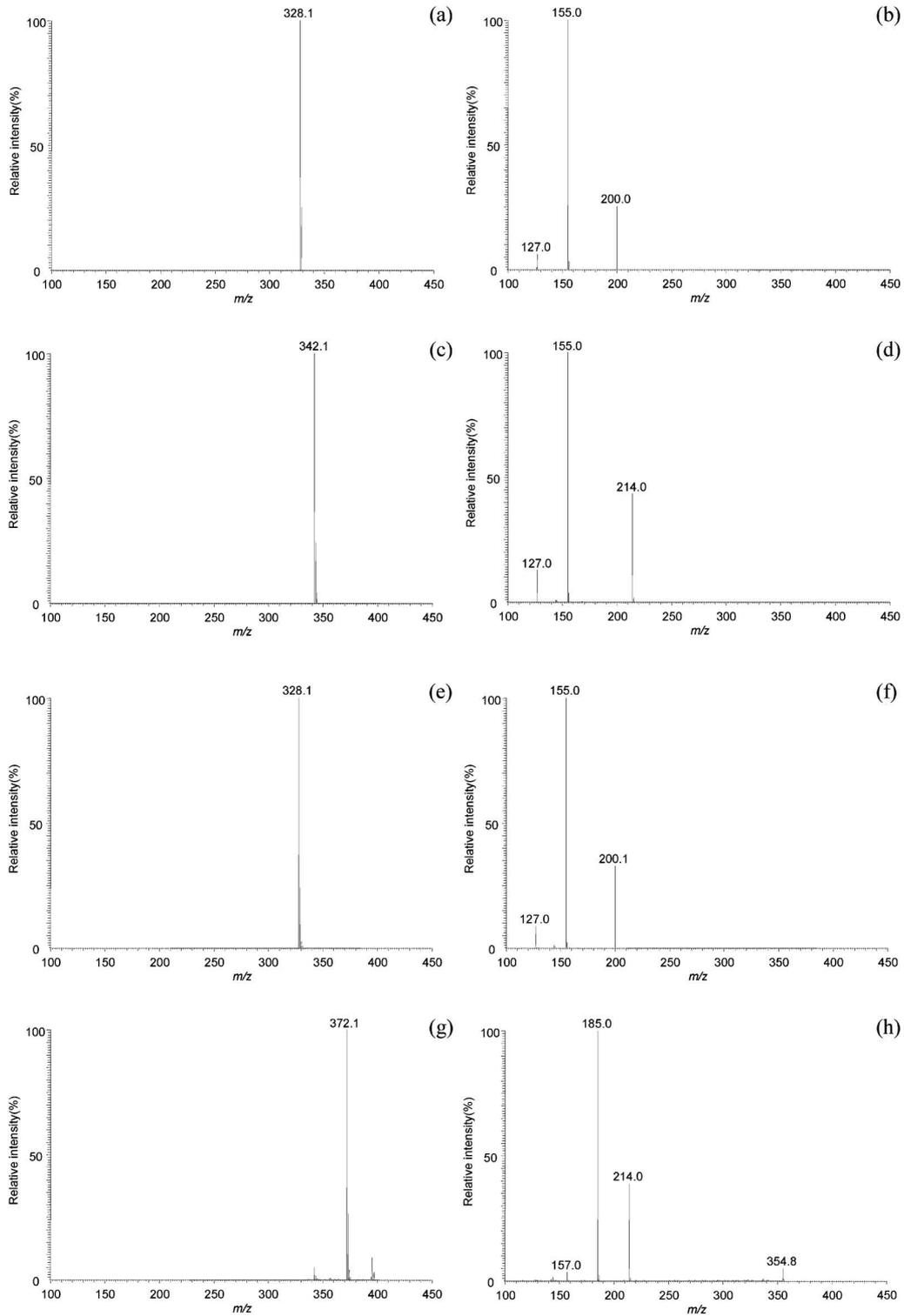


Fig. 6 ESI-mass spectra and product ion spectra of the synthetic cannabinoids. (a) ESI-mass spectrum and (b) product ion spectrum of JWH-015, (c) ESI-mass spectrum and (d) product ion spectrum of JWH-018, (e) ESI-mass spectrum and (f) product ion spectrum of JWH-073, (g) ESI-mass spectrum and (h) product ion spectrum of JWH-081.

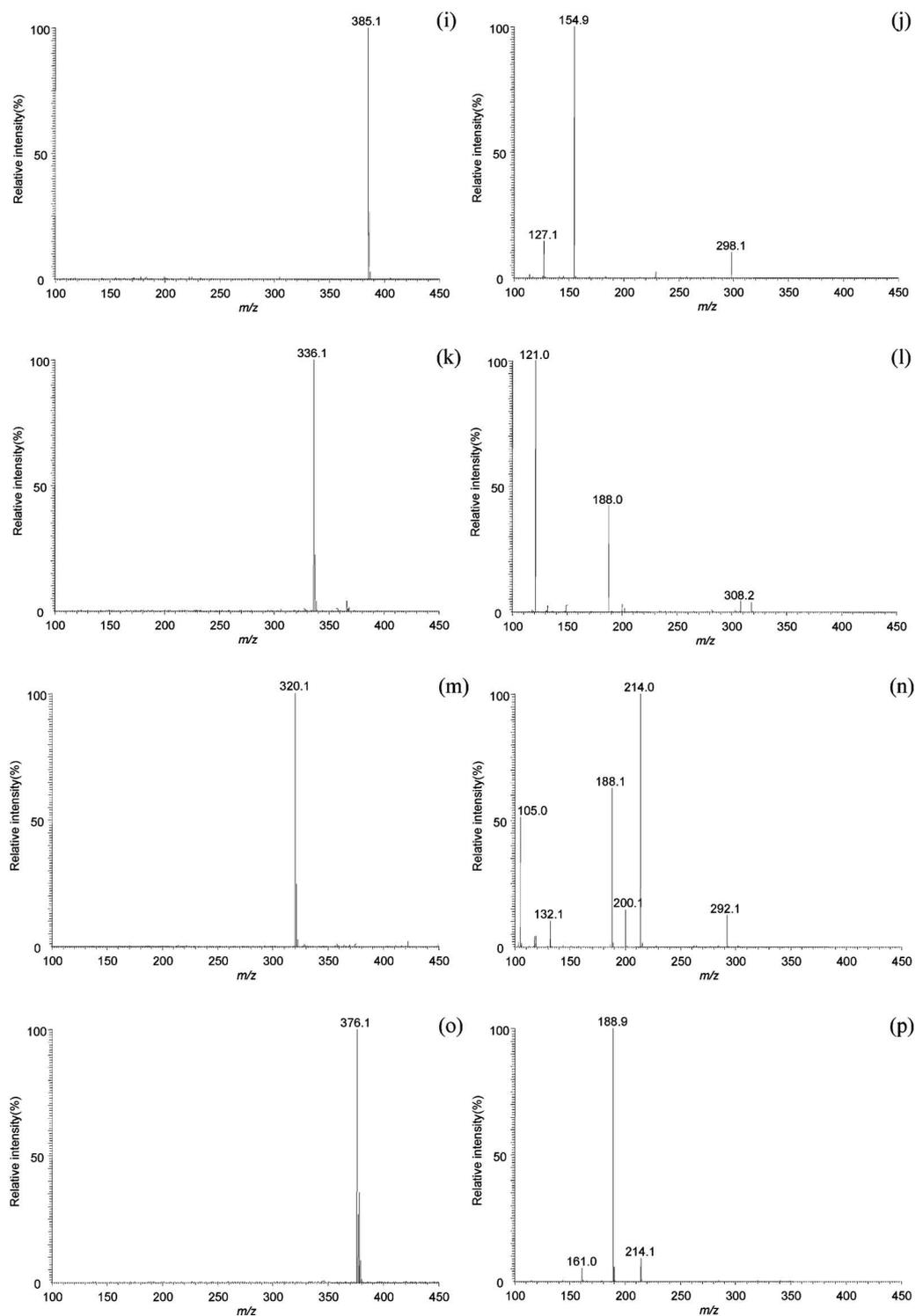


Fig. 6 ESI-mass spectra and product ion spectra of the synthetic cannabinoids. (i) ESI-mass spectrum and (j) product ion spectrum of JWH-398, (k) ESI-mass spectrum and (l) product ion mass spectrum of JWH-250, (m) ESI-mass spectrum and (n) product ion spectrum of JWH-251, (o) ESI-mass spectrum and (p) product ion spectrum of JWH-398.

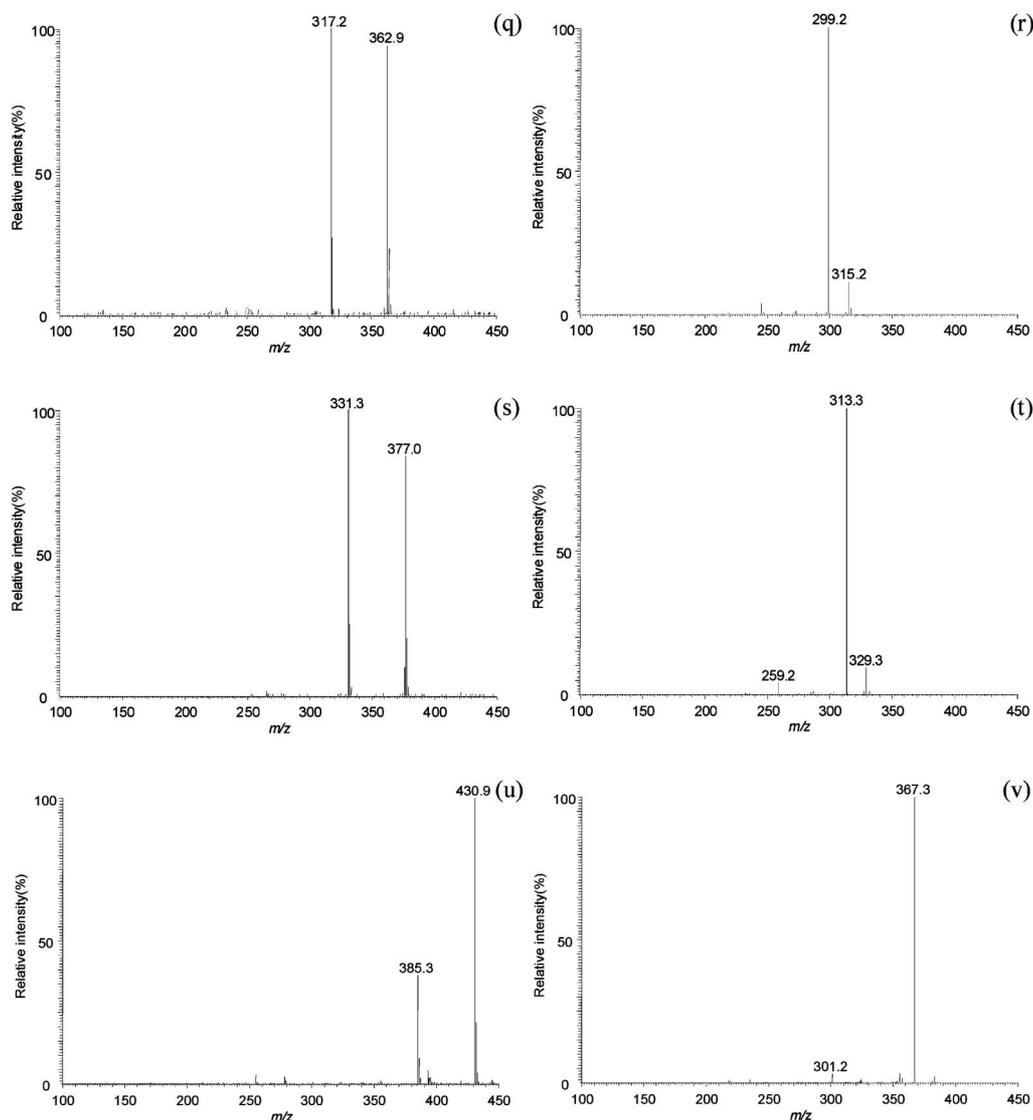


Fig. 6 ESI-mass spectra and product ion spectra of the synthetic cannabinoids. (q) ESI-mass spectrum and (r) product ion spectrum of CP 47,497, (s) ESI-mass spectrum and (t) product ion spectrum of Cannabicyclohexanol, and (u) ESI-mass spectrum and (v) product ion spectrum of HU-210.

れなくなったことから、LC/MS/MS用試料の調製時にフィルター過を行う場合は、メタノールを使用することが望ましい。

AAI類についてはプロトン化分子をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行った。また、CP類およびHU-210については脱プロトン分子をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行い、さらにプロダクトイオンスペクトルで観察された脱水体をセカンドプリカーサーとして二次プロダクトイオンスキャンを行った。

Fig. 6に示すように、AAI類のプロダクトイオ

ンスペクトルでは何れも構造を反映したフラグメントイオンが観察された。すなわち、ナフタレン骨格を有するJWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-200およびJWH-398は、何れもナフタレン骨格由来のフラグメントイオンが観察された。また、フェニルアセチル基を持つJWH-250およびJWH-251では、インドール骨格由来と推定されるフラグメントイオン m/z 188が共通して観察されたほか、フェニルアセチル基を反映したフラグメントイオン（メトキシフェニルアセチル基では m/z 121, メチルフェニルアセチル基では m/z 105）が

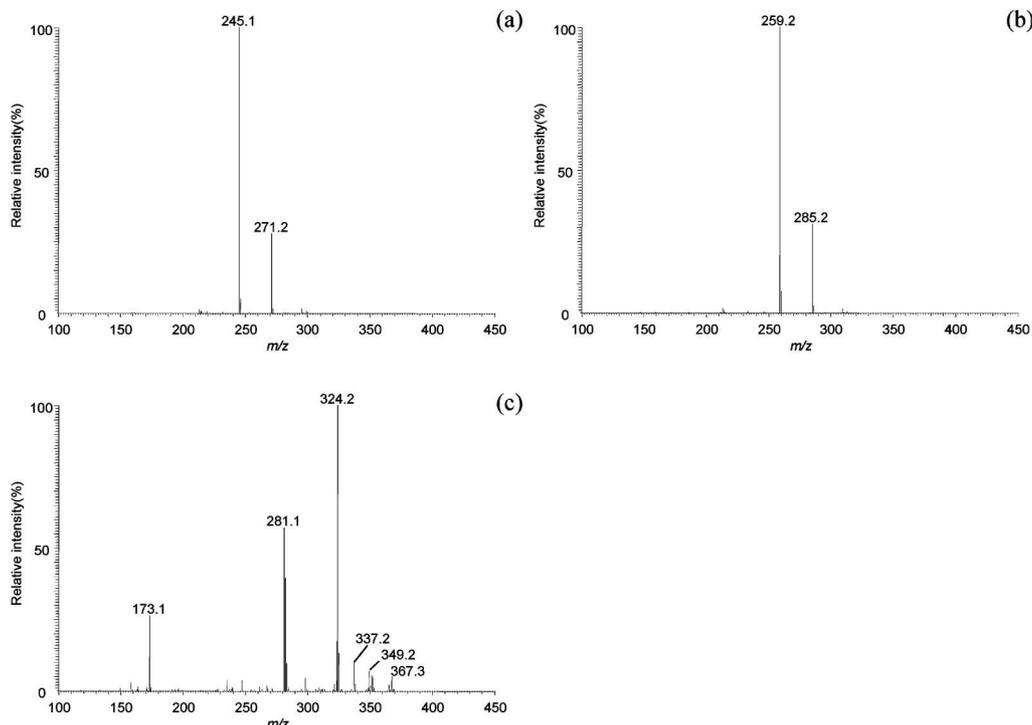


Fig. 7 Second generation product ion spectra of (a) CP 47,497, (b) Cannabicyclohexanol and (c) HU-210.

観察された。なお、JWH-250とJWH-251ではマススペクトルのパターンは若干異なり、特にJWH-250ではメトキシフェニルアセチル基由来と推定される m/z 121のフラグメントイオンが強く観察されたが、これは生成したイオンがメトキシ基によって共鳴安定化されるためと考えられる。

一方、CP類およびHU-210のプロダクトイオンスペクトルでは、プリカーサーイオンから脱水が起こったフラグメントイオンしか観察されず、構造に特徴的なフラグメントイオンが観察されなかった。そこで、このイオンをセカンドプリカーサーとして二次プロダクトイオンスキャンを行ったところ、Fig. 7に示すように、各化合物の構造を反映した二次プロダクトイオンスペクトルが観察された。よって、CP類およびHU-210については、脱プロトン分子から脱水して生成するイオンについて、二次プロダクトイオンスキャンを行うことで、より定性能力が高くなるものと考えられる。

結 語

近年、違法ドラッグとして流通が確認されている

11種類の合成カンナビノイドについて、これらの標準品を用いて包括的な分析法を構築した。TLCでは、各種呈色試薬により、各化合物に特徴的な発色が観察されたものの、 R_f 値による同類化合物の分離は困難であった。GC/MSにおいては、中極性カラムを用いると溶出時間が極めて遅くなることから、合成カンナビノイド類の分析には適さないと考えられた。また、無極性カラムよりも微極性カラムを用いた場合に異性体であるJWH-015およびJWH-073の分離が良好であったことから、本分析法では微極性カラムを用いることとした。本法における検出限界はスキャンモードで50–1000 ng/ml、SIMモードで5–50 ng/mlであった。また、EI-マススペクトルにおいては、各化合物の構造に特徴的なフラグメントイオンが観察されたことから、これらの特徴的なフラグメントイオンを把握することで、今後新たに流通する恐れのある合成カンナビノイド類の構造推定に役立つものと考えられる。

さらに、LC/MS/MSにおいてはギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル系移動相とODSカラムを用いた11種類の合成カンナビノイド一斉分析法を

構築した。イオン化法として、AAI 類についてはESI-ポジティブモード、CP 類およびHU-210についてはESI-ネガティブモードを使用した。予備実験から、移動相のpHを酸性にするとCP 類およびHU-210の感度が低下したことから、本分析条件では移動相のpHを調整しないこととし、さらに合成カンナビノイド類の高脂溶性を考慮して、アセトニトリル50%から95%のグラジエント条件を用いた。本分析条件において各ピークは良好に分離し、検出限界も5-50 ng/mlと良好な結果を得た。

GC/MS および LC/MS を中心とした合成カンナビノイド類の包括的な分析法の構築は、今後ますます増加すると考えられる新たな合成カンナビノイド類の分析に応用できるものと考えられ、加えてEI-マススペクトルやプロダクトイオンスペクトルを用いた構造推定にも応用できる。今後、合成カンナビノイド類の過剰摂取による急性中毒事故などが発生した場合に必要となる、生体試料の分析にも本法は有用であると考えられる。

文 献

- 1) 山本郁男：大麻の文化と科学，pp. 53-56, 151, 廣川書店 (2001)。
- 2) Namera, A., Nakamoto, A., Saito, T. and Nagao, M.: Colorimetric detection and chromatographic analyses of designer drugs in biological materials: a comprehensive review, *Forensic Toxicol.*, **29**, 1-24 (2011)。
- 3) Erowid: The vaults of Erowid. <http://www.erowid.org>. (Cited January 2011)。
- 4) Takahashi, M., Nagashima, M., Suzuki, J., Seto, T., Yasuda, I. and Yoshida, T.: Creation and application of psychoactive designer drugs data library using liquid chromatography with photodiode array spectrophotometry detector and gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*, **77**, 1245-1272 (2009)。
- 5) European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Understanding the 'spice' phenomenon (2009)。
- 6) Auwärter, V., Dresen, S., Weinmann, W., Müller, M., Pütz, M. and Ferreirós, N.: 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs?, *J. Mass Spectrom.*, **44**, 832-837 (2009)。
- 7) Dresen, S., Ferreirós, N., Pütz, M., Westphal, F., Zimmermann, R. and Auwärter, V.: Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *J. Mass Spectrom.*, **45**, 1186-1194 (2010)。
- 8) Vardakou, I., Pistos, C. and Spiliopoulou, Ch.: Spice drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation. *Toxicol. Lett.*, **197**, 157-162 (2010)。
- 9) 財津 桂, 片木宗弘, 中西啓子, 志摩典明, 鎌田 徹, 西岡 裕, 三木昭宏, 辰野道昭, 土橋 均, 鈴木廣一: 新規インドール系合成カンナビノイドの分析, 法科学技術, **15** (別冊), 34 (2010)。
- 10) Hudson, S., Ramsey, J., King, L., Timbers, S., Maynard, S., Dargan, P. I. and Wood, D. M.: Use of high-resolution accurate mass spectrometry to detect reported and previously unreported cannabinomimetics in "herbal high" products, *J. Anal. Toxicol.*, **34**, 252-260 (2010)。
- 11) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J. and Goda, Y.: Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products, *Forensic Sci. Int.*, **198**, 31-38 (2010)。
- 12) Uchiyama, N., Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R. and Goda Y.: Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products, *Forensic Toxicol.*, **29**, 25-37 (2011)。
- 13) Nakajima, J., Takahashi, M., Seto, T. and Suzuki, J.: Identification and quantitation of cannabimimetic compound JWH-250 as an adulterant in products obtained via the Internet, *Forensic Toxicol.*, **29**, 51-55 (2011)。

- 14) Huffman, J. W., Dai, D., Martin, B. R. and Compton, D. R.: Design, synthesis and pharmacology of cannabimimetic indoles, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 563–566 (1994).
- 15) Huffman, J.W.: Cannabimimetic indoles, pyrroles and indenones, *Curr. Med. Chem.*, **6**, 705–720 (1999).
- 16) Huffman, J. W., Mabon, R., Wu, M. J., Lu, J., Hart, R., Hurst, D. P., Reggio, P. H., Wiley, J. L. and Martin B. R.: 3-Indolyl-1-naphthylmethanes: new cannabimimetic indoles provide evidence for aromatic stacking interactions with the CB₁ cannabinoid receptor, *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 539–549 (2003).
- 17) Huffman, J. W., Szklennik, P. V., Almond, A., Bushell, K., Selley, D. E., He, H., Cassidy, M. P., Wiley, J. L. and Martin, B. R.: 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4110–4113 (2005).
- 18) Huffman, J. W., Zengin, G., Wu, M. J., Lu, J., Hynd, G., Bushell, K., Thompson, A. L. S., Bushell, S., Tartal, C., Hurst, D. P., Reggio, P. H., Selley, D. E., Cassidy, M. P., Wiley, J. L. and Martin, B. R.: Structure-activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles at the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB₂ receptor agonists, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 89–112 (2005).
- 19) Manera, C., Tuccinardi, T. and Martinelli, A.: Indoles and related compounds as cannabinoid ligands, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **8**, 370–387 (2008).
- 20) Weissman, A., Milne, G. M. and Melvin, L. S. Jr.: Cannabimimetic activity from CP-47,497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol, *J. Pharmacol. Experimental Therapeutics*, **223**, 516–523 (1982).
- 21) Mechoulam, R., Feigenbaum, J. J., Lander, N., Segal, M., Järbe T. U., Hiltunen A. J. and Consroe, P.: Enantiomeric cannabinoids: stereo specificity of psychotropic activity, *Experientia*, **44**, 762–764 (1988).
- 22) 和久敬蔵：内在性カンナビノイド受容体リガンド-アナンダミドと2-アラキドノイルグリセロール, *YAKUGAKU ZASSHI*, **126**, 67–81 (2006).
- 23) Zimmermann, U. S., Winkelmann, P. R., Pilhatsch, M., Nees, J. A., Spanagel, R. and Schulz, K.: Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of “spice gold”, *Dtsch. Arztebl. Int.*, **106**, 464–467 (2009).
- 24) Sobolevsky, T., Prasolov, I. and Rodchenkov, G.: Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine, *Forensic Sci. Int.*, **200**, 141–147 (2010).
- 25) Huffman, J. W., Wu, M. J. and Lu, J.: A very facile S_NAr reaction with elimination of methoxide, *J. Org. Chem.*, **63**, 4510–4514 (1998).
- 26) 日本薬学会編, 薬毒物試験法と注解2006 分析・毒性・対処法, pp. 153, 東京化学同人, 東京 (2006).
- 27) Moffat, A.: Clarke’s Isolation and Identification of Drugs. Pharmaceutical Press; 2nd edn., The Pharmaceutical Press, London (1986).
- 28) Kovats, E. S.: Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, *Adv. Chromatogr.*, **1**, 229–247 (1965).
- 29) Van Den Dool, H. and Kratz, P. D.: A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatography*, **11**, 463–471 (1963).
- 30) 中川有造, 池田正澄 (訳) : 有機化合物のマススペクトル, pp. 50–55, 82–87, 162–169, 614–616, 丸善 (1973).
- 31) McLafferty, F. W. and Turecek, F.: Interpretation of mass spectra, 4th edn., pp. 36, 238–240, 246–252, University Science Books, Mill Valley (1993).