

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590055

研究課題名(和文)大麻および痩身薬などゲートウェイドラッグの乱用を迅速に判定する方法の開発

研究課題名(英文)The development of a method for determining rapidly the abuse of gateway drugs, such as slimming drugs and cannabis

研究代表者

斉藤 貢一 (SAITO, KOICHI)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40386347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：LC/TOFMSを用いた、痩身薬 - リポ酸のキラル分析法を構築した。本分析法は痩身目的のサプリメント製品の表示違反を判定することが可能となった。  
DART-TOF-MSによる脱法ハーブ製品中の合成カンナビノイド系および合成カチノン系薬物の迅速スクリーニング法を検討した。本分析法は、大麻との識別も可能であった。  
乱用の恐れのある医療用薬物として鎮痛薬・鎮痛補助薬30種を選定し、LC/TOFMSを用いた分析法を構築した。前処理に新規に開発した固相分散抽出法を選択することで、除タンパクを必要とせずに試料精製を迅速に行えるようになった。

研究成果の概要(英文)：A chiral analytical method of alfa-lipoic acid, a kind of slimming drugs, was constructed using LC-TOFMS. The method made it possible to determine the display violations of dietary preparations and supplements for slimming purposes.  
A rapid screening method of synthetic cannabinoids and cathinones in illegal herbal products was constructed by using DART-TOF-MS. This method was also able to discriminate between synthetic cannabinoids and cannabis plant.  
30 kinds of analgesics and adjuvant analgesics were selected as medical drugs, capable of causing abuse, and the analytical method of the drugs was constructed by using LC/TOF-MS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：法科学 大麻 脱法ハーブ 痩身薬 ゲートウェイドラッグ スクリーニング 分析法

### 1. 研究開始当初の背景

世界の薬物乱用者は、現在約2～3億人と言われ、欧米先進国でも薬物乱用は社会的に大きな問題となっている。わが国においては、現在、第3次覚せい剤乱用期にあるとされているが、行政による「薬物乱用防止5か年戦略」や薬事法の改正などにより、従来の麻薬関連法では規制対象外であった依存性薬物を指定薬物として速やかに取り締まることができるようになり、薬物乱用者は減少の兆候をみせている。しかし、その一方で、薬物乱用の低年齢化が進み、大学生から中学生による覚せい剤や麻薬の乱用がたびたび報道されている。その原因の一つとして大麻や痩身薬など、いわゆるソフトドラッグと言われる薬物乱用が乱用薬物の導入機会(ゲートウェイドラッグ)として若年層へ広がっていることが考えられる。実際、国立精神・神経医療研究センターによる薬物使用に関する調査(2009年)によると、麻薬・覚せい剤など薬物乱用が約164万人と推計されているが、そのうち、約8割が大麻であった。大麻事件も最近大きく増加傾向にあり、2009年は約3千人と過去最高となった。すなわちゲートウェイドラッグの使用により、ドラッグ全般への抵抗感が薄くなり、より副作用や依存性の強いドラッグ(ハードドラッグ)の使用の契機になると言われている。

また、若年層への拡大の背景としては、薬物乱用の危険性に対する認識欠如や薬物乱用への抵抗感低下や、インターネットを利用して誰でも容易に入手が可能な状況にあることが挙げられる。最近の特徴として、大麻を中心とした薬物乱用は大学キャンパスに広がっており、多くの大学など学校教育機関ではその対策に憂慮している。これに対し、学校を基盤とした薬物乱用防止教育をはじめとした防止のための対策が実施されているが、現在のところ大麻の乱用は拡大の一途をたどっているのが現状である。また、乱用薬物の中には、規制薬物の分子構造の一部を組み替えただけの類似薬物もあり、「デザイナードラッグ」と呼ばれている。大麻や痩身薬においても次々に新しいデザイナードラッグが登場するため、規制が追いつかない状況になっている。

### 2. 研究の目的

未成年者による薬物乱用の増加傾向は大きな社会問題であり、その原因の一つとして、大麻や痩身薬など、いわゆるゲートウェイドラッグの安易な乱用が挙げられる。特に大麻の薬物乱用が大学生や高校生などに広まり、教育機関ではその対策に憂慮している。また、乱用薬物の中には、それぞれ薬事法に抵触しないよう化学構造を変化させたデザイナードラッグも次々と出現していることから、薬物の同定も困難となることが予想される。そのため、ヒトにおけるゲートウェイドラッグ乱用を判定する為の分析法の構築が急務と

考える。そこで、本研究では非侵襲的で採取、いたちごっこのように出現するデザイナードラッグに対応するため、測定装置として同定能力に優れた液体クロマトグラフ/飛行時間型質量分析計(LC/TOFMS)やLC/MS(MS)、GC/MS等を駆使して、標準品なしでも迅速にこれらの乱用薬物を同定できる方法を確認する。本研究により、青少年の薬物乱用の根絶および薬物乱用を拒絶する規範意識の向上に貢献することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)平成23年度の研究では、痩身薬としての乱用が懸念されるサプリメントとして、 $\alpha$ -リポ酸に着目し、これらの分析法について検討した。 $\alpha$ -リポ酸については、LC/MSを用いて光学異性体分離分析法を検討した。光学純度としてエナンチオマー過剰率( $ee$ (%))を使用した。 $ee$ は次式から算出した。 $[d]$ と $[l]$ はそれぞれの $d$ 、 $l$ の光学異性体のピーク面積を表す。

$$ee(\%) = \frac{|[d] - [l]|}{([d] + [l])} \times 100$$

試験溶液の調製では、カプセル剤は内容物を取り出し、錠剤はそのまま、精製水10mLとサロゲート物質(10 $\mu$ g/mL)100 $\mu$ Lを加えて30分間超音波による抽出を行った。その後、遠心分離操作(3000rpm、10min)を行い、上清に酢酸エチル2mLを加え、液液分配抽出を2回行った。酢酸エチル相を合わせて窒素気流下(60 $^{\circ}$ C/10分)で乾固した後、得られた残渣にメタノール2mLを加えて再溶解させた。次いでWaters社製Oasis<sup>®</sup>MAXを用いた固相抽出法を適用した。

(2)平成24年度の研究では、合成カンナビノイド系(14種)および合成カチノン系薬物(3種)を測定対象とした、DART-TOF-MSによる迅速スクリーニング法の有用性について検討した。DART-TOF-MSにおける試料導入方法として、標準品の場合、形態が粉末状のものは約0.1mgをセラミックシートの中心部に取り、二つ折りにして挟んだものを、また、溶液としたものは約10 $\mu$ Lをガラス棒(長さ約8cm、太さ直径約2mm)の先端に塗布し、風乾せずそのままの状態のものをそれぞれ測定試料とした。測定に際しては、それぞれの試料をDARTイオン源の間に3秒程度かざすことで試料のイオン化およびTOF-MSへの導入を行った。

また、実試料である合法ハーブ製品の植物片、植物の葉、錠剤および紙巻タバコについては、砕いたり、あるいは抽出操作を行ったりせずに、そのままの状態でも直接、DARTイオン源にかざして測定した。

GC/MSにおける試料溶液の調製方法(概略)は以下のとおりである。実試料の植物片については、酢酸エチルを加え、1分間超音波抽出した。抽出液をクエッチャーズチューブにとり、攪拌、遠沈後、上清をGC/MS用試験溶液とした。他方、錠剤につ

いては水に溶かし、アルカリ性条件下、酢酸エチルで液液抽出し、得られた有機相をGC/MS用試験溶液とした。

(3) 平成25年度の研究では、乱用の恐れのある医療用薬物として鎮痛薬・鎮痛補助薬30種(中等度オピオイド系鎮痛薬(トラマドール、ペンタゾシ)、NSAIDs(イブプロフェン)、抗うつ薬(ミプラミン、アミトリプチン、ノルプロピラミン、ルトリプチン、アモキシシリン、ドキシピン、トリスピン、マロキサシリン、ミアセリン、トラゾドン、フルボキサミン、パロチチン、セルトラリン、フルオキサチン、シタロプラム、ミルタピリン、デュロキサチン、ベンゾジアゼピン、ミルガピリン、レボセチン、ブプレピオン、モクロヘミド)、抗てんかん薬(カルバマゼピン)および抗不整脈薬(リドカイン、メチルフェニレート)を選定し、LC/TOFMSを用いた分析法を検討した。測定試料には血清を対象とし、血清の前処理法には、市販の固相を分散させることで迅速な抽出ができ、閉鎖系での操作が可能な固相分散抽出(SPDE)法を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 平成23年度の研究： $\alpha$ -リポ酸の光学異性体分離を行なうために、キラルカラムにCHIRALPAK AD-RHを、移動相にアセトニトリル、メタノールの等量混液を用いることで、良好な光学異性体分離が達成された。

MSの測定条件として、 $\alpha$ -リポ酸のイオン化について検討したところ、エレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization, ESI)を用い、ネガティブイオンモードで $\alpha$ -リポ酸が良好にイオン化されることが分かった。マススペクトルをスキャン測定した結果をFig. 1に示した。

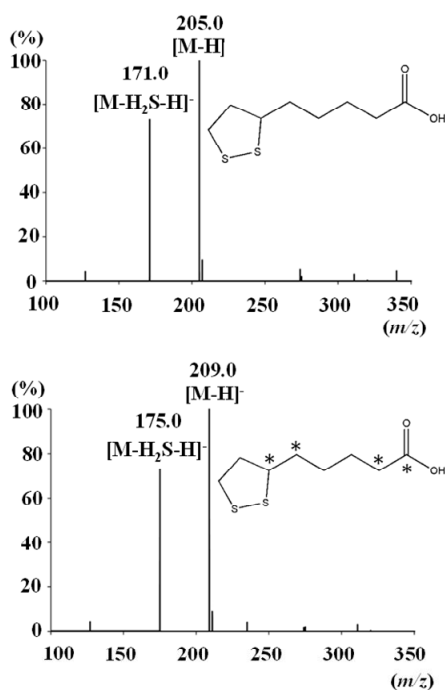


Fig. 1 MS spectra of (A)  $\alpha$ -lipoic acid and (B) surrogate

Asterisk (\*) indicates carbon 13-labeled.

また、 $\alpha$ -リポ酸( $m/z$  205)および $^{13}\text{C}$  1, 2, 5, 6- $\alpha$ -リポ酸( $m/z$  209)のそれぞれの選択イオン検出(selected ion monitoring, SIM)のクロマトグラム(標準品)をFig. 2に示した。

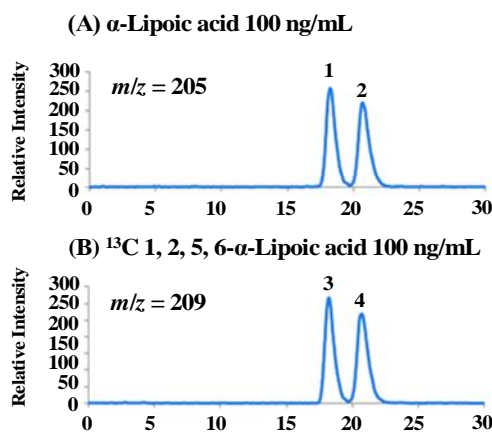


Fig. 2 Typical chromatograms of (A)  $\alpha$ -lipoic acid standards (100 ng/mL), (B) surrogate (100 ng/mL)

Peak 1,  $l$ - $\alpha$ -lipoic acid; Peak 2,  $d$ - $\alpha$ -lipoic acid; Peak 3,  $^{13}\text{C}$  1,2,5,6- $l$ - $\alpha$ -lipoic acid; Peak 4,  $^{13}\text{C}$  1,2,5,6- $d$ - $\alpha$ -lipoic acid

また、前処理として液液分配抽出およびOasis<sup>®</sup> MAXを用いた固相抽出を行うことによって食品マトリックス由来の多くの夾雑物を取り除くことができ、平均回収率は97%(R.S.D. = 4.6; n = 6)と良好な結果が得られ、定量性が向上した。LC/MSによる $\alpha$ -リポ酸の検出限界および定量限界は5 ng/mLおよび10 ng/mLであった。

実際に数種類の痩身用サプリメントへ適用したところ、光学異性体に関する表記が無い製品に関しては、ほぼラセミ体であることが判明した。また、 $d$ - $\alpha$ -リポ酸と表記されながら、 $l$ - $\alpha$ -リポ酸が含有されている製品も確認された。当該製品においては、 $d$ 体の不斉合成が不十分な $\alpha$ -リポ酸の原薬を用いたため $l$ 体が混入した可能性や、製造の段階において $d$ 体が $l$ 体に変換した可能性も考えられた。これらの結果から、痩身用サプリメント中の $\alpha$ -リポ酸の光学異性体分析法の有用性が示唆され、食品衛生分野および今後の法科学分野における貢献が期待される。

(2) 平成24年度の研究：溶液または固体状の試料をDART-TOF-MSに導入したところ、いずれの試料も測定を開始してから数秒以内に各薬物の $[\text{M}+\text{H}]^+$ のピークがリアルタイムで確認され、理論値と測定値の質量誤差は $\pm 10$  mmu以内と、測定精度の高い結果が得られ、

試料形態(液体、固体)によらずに、薬物の精密質量測定が可能となった。また検出感度については、各薬物の絶対量として 5 µg あれば測定できることが確認された。代表的な合成カンナビノイド系薬物 JWH-081 および合成カチノン系薬物 4-Methylethcathinone のマススペクトルを Fig.3 に示した。

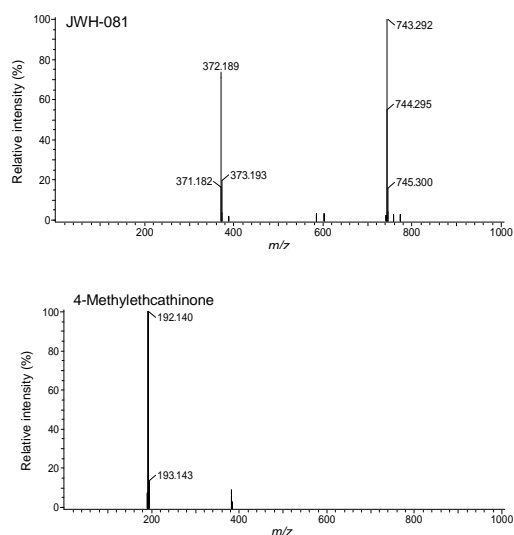


Fig. 3 Typical mass spectra of synthetic cannabinoid and cathinone standards measured by DART-TOF-MS

なお、測定結果のうち、JWH-019 および JWH-122 は構造異性体であることから同じ  $[M+H]^+$  ピークを示すマススペクトルが得られた。このことから、試料の前処理やターゲット化合物の分離操作を伴わない DART では、MS 測定においてフラグメントイオンに違いが見出せない場合、構造異性体の識別は困難であったが、スクリーニング法としては十分であると考えられた。

実試料とした合法ハーブ製品(20 検体)および植物の葉(101 検体)について、いずれも前処理をすることなく、そのまま DART-TOF-MS に導入して測定した結果、全ての合法ハーブ製品には、さまざまな合成カンナビノイド系および合成カチノン系薬物が含有されていることが分かった。合法ハーブ製品については、溶媒抽出による前処理操作後、GC/MS によるクロスチェックを行ったところ、DART-TOF-MS で陽性と推定された薬物については、GC/MS のマススペクトルから、それぞれ当該薬物の含有が確認された。

また、外観から大麻の葉と推察された植物の生葉を測定した結果、テトラヒドロカンナビノールの含有が示唆され、全て大麻であると判定された。また、上記の合法ハーブ製品のマススペクトルは大麻のマススペクトルとは異なり、識別が可能であることが確認された。

実試料の“錠剤”は覚せい剤簡易検査で陽性の判断がつかず、麻薬や覚せい剤に類似した合成カチノン系薬物の含有も疑われていた。しかし、DART-TOF-MS から得られたマススペクトルでは、麻薬や合成カチノン系薬物に該当するピークが見当たらなかった。他方、DART-TOF-MS により覚せい剤であるメタンフェタミンが検出可能であることは既に報告されている。そこでこれら既報のデータを参照してマススペクトルを精査したところ、全ての検体から  $m/z$  150.130 が認められ、メタンフェタミンの含有が示唆された。簡易検査では錠剤に含有される賦形剤などの不純物により結果に影響が生じることがあるが、DART-TOF-MS は試料をかざすだけで、感度良く精密質量が得られ、明確に成分含有の有無が判断できた。

また、大麻や合法ハーブ製品は、通常「ジョイント」と呼ばれる紙巻タバコの形状で使用されることが多いことから、市販のタバコのマススペクトルについても DART-TOF-MS で測定した。その結果、ニコチンのプロトン付加体が  $m/z$  163.119 のピークとして検出され、合法ハーブ製品や大麻のマススペクトルと明確に区別することができた。

(3) 平成 25 年度の研究 ; LC では 30 成分の分離を行うために、分離性能の高いコアシェルカラムである Kinetex C18 を用いて、その最適なサイズ(長さ、直径および粒径)の異なった 4 本のカラム (150 mm × 2.1 mm、1.7 µm、100 mm × 2.1 mm、2.6 µm、100 mm × 4.6 mm、2.6 µm および 150 mm × 4.6 mm、2.6 µm) を検討した。その結果、150 mm × 2.1 mm、1.7 µm および 150 mm × 4.6 mm、2.6 µm のカラムを使用した場合、30 成分の相互分離を達成したが、150 mm × 4.6 mm、2.6 µm のカラムでは測定に 90 分もの時間を要した。他方、150 mm × 2.1 mm、1.7 µm のカラムでは 50 分で測定が可能であったため、後者のカラムを選択した。

前処理における除タンパク操作の有無について検討した結果、除タンパク操作を行った場合の回収率(49 - 87%)と行わなかった場合の回収率(77 - 112%)を比較すると、除タンパクを行わなかった場合の回収率の方が良好であったため、除タンパク操作を省くことにした。これにより作業時間を大幅に短縮することが可能となった。続いて、血清試料のクリーンアップとして、Oasis<sup>®</sup> MCX を SPDE で用いることで、夾雑物が効果的に除去された。また、TOF-MS でのマスクロマトグラムにおいて、イオンサプレッションを受けることなく、また妨害ピークもほとんど検出されずに、信頼性の高い分析法を構築できた。構築した分析法の定量限界は 5-10 ng/mL であり、検量線の相関係数はトリアドール、メシリンおよびデヒドロキサロンについては 0.998、その他 27 成分については 0.999 と良好な直線性が得られた。血清の添加回収試験(100 ppb)

の結果は、77 - 112 % (RSD 1.6 - 9.7) と良好であった。

以上の結果から、SPDE 法を用いることで除タンパクをすることなく前処理を迅速に行うことが可能となった。また LC/TOF-MS の測定により、生体試料中の複数の薬物を高感度に一斉分析することが可能となったことから、本法は法科学や救急医療現場における中毒原因物質の特定などでの有用性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

K. Saito, R. Saito, Y. Kikuchi, Y. Iwasaki, R. Ito: Analysis of drugs of abuse in biological specimens. J. Health Sci., 査読有、57(6)、2011、472-487

小林 由幸、齋藤 貢一、岩崎 雄介、伊藤 里恵、液体クロマトグラフィー/質量分析法による健康食品中の  $\beta$ -リポ酸の光学異性体の定量分析、分析化学、査読有、61(2)、2012、109-114

樋口 美代子、齋藤 貢一、リアルタイム直接分析(DART)-TOF-MSを用いる合成カンナビノイド系及び合成カチノン系薬物の迅速スクリーニング法、分析化学、査読有、61(8)、2012、705-711

〔学会発表〕(計 6件)

第55回日本薬学会 関東支部大会、2011年10月8日(千葉県) LC/MS/MSを用いた尿中  $\beta$ -リポ酸の光学異性体分析、小林 由幸、齋藤 貢一、岩崎 雄介、伊藤 里恵 日本法科学技術学会 第17回学術集会、2011年11月17日(東京都) 改良型固相分散抽出-LC/TOF-MS法による生体試料中のバルピツール酸系薬物の分析、齋藤 貢一、小鍛冶 好恵、菊地 優、小林 由幸、岩崎 雄介、伊藤 里恵

日本薬学会 第132年会、2012年3月28日-31日(北海道) 健康食品中  $\beta$ -リポ酸の光学異性体の検討、小林 由幸、齋藤 貢一、岩崎 雄介、伊藤 里恵

日本薬学会 第132年会、2012年3月28日-31日(北海道) 固相分散抽出-LC/TOF-MS法によるヒト血清および尿中バルピツール酸系薬物の分析、小鍛冶 好恵、齋藤 貢一、菊池 優、岩崎 雄介、伊藤 里恵

第56回日本薬学会 関東支部大会、2012年10月13日(東京都) 固相分散抽出-LC/MS法による血清中バンコマイシンの分析、坂本 泰洋、齋藤 貢一、篠塚 郁美、神野 佑輝、岩崎 雄介、伊藤 里恵

第57回日本薬学会 関東支部大会、2013年10月26日、東京都(帝京大学板橋キャンパス) 固相分散抽出 LC/TOF-MS法によるヒト血清中鎮痛薬・鎮痛補助薬(計

30種)の一斉分析、西山 莉可、岩崎 雄介、伊藤 里恵、齋藤 貢一、

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：遠心分離用チューブ

発明者：齋藤貢一

権利者：星薬科大学

種類：実用新案

番号：実願2011-005642号

出願年月日：2011年9月27日

国内外の別：国内

取得状況(計 1件)

名称：遠心分離用チューブ

発明者：齋藤貢一

権利者：星薬科大学

種類：実用新案

番号：登録番号：3172219

取得年月日：2011年11月16日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hoshi.ac.jp/home/kyoiku/kyoushitsu/gaid/2kyoushitsu.bunseki.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤貢一(SAITO, Koichi)

研究者番号：40386347

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：