

植物系違法ドラッグ製品及び法規制植物試料の Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS を用いた迅速スクリーニング法の検討

河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理,* 合田幸広

Simple and Rapid Screening for Psychotropic Natural Products Using Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS

Maiko KAWAMURA, Ruri KIKURA-HANAJIRI,* and Yukihiro GODA

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received February 9, 2009; Accepted March 13, 2009; Published online March 25, 2009)

Direct Analysis in Real Time (DART) is a novel ionization technique that provides for the rapid ionization of small molecules under ambient conditions. To investigate the trend of non-controlled psychotropic plants of abuse in Japan, a rapid screening method, without sample preparation, was developed using DART-time of flight mass spectrometer (TOFMS) for plant products. The major psychotropic constituents of these products were determined using liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). As a result of the DART-TOFMS analyses of 36 products, the protonated molecular ions $[M+H]^+$, corresponding to 6 kinds of major hallucinogenic constituents (mescaline, salvinorin A, *N,N*-dimethyltryptamine, harmine, harmaline and lysergamide), were detected in 21 products. It was possible to estimate their accurate elemental compositions through exact mass measurements. These results were consistent with those of the LC/MS analyses and the contents of the 6 psychotropic constituents were in the range from 0.05 to 45 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Typical controlled narcotic drugs, tetrahydrocannabinol, opioid alkaloids and psilocin were also directly detected in marijuana cigarette, opium gum and magic mushroom respectively. Although it is difficult to estimate the matrix effects caused by other plant ingredients, the DART-TOFMS could be useful as a simple and rapid screening method for the targeted psychotropic natural products, because it provides the molecular information of the target compounds without time-consuming extraction and pre-treatment steps.

Key words—Direct Analysis in Real Time (DART); TOFMS; LC/MS; psychotropic plants

緒 言

平成 18 年度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てきている. 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, 植物系違法ドラッグ製品の流通が深刻な問題となっている. 植物系違法ドラッグ製品に関しては, 製品が同一名称であっても異なった植物が流通していたり, 特定の活性成分を含有する植物が多数存在するために同定が困難であったり, 観賞用として流通している植物の近縁種であったりと, 一律に規制することが困難である. このような製品の流通実態を調査するためには, まずは, 個々の植物成分等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, 効率のよいスクリーニング手法の検討が重要な課題である.

近年開発されたイオン化法 Direct Analysis in Real Time (DART™) の動作原理は, 導入された He ガスをニードル電極の放電によりプラズマ化し, 励起状態の中性気体分子として大気ガス中に放出すると, 測定対象物に直接作用しイオン化することによる. 大気圧下で非接触に試料をイオン化でき, さらに質量検出器に 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.¹⁾ また, DART は試料表面からイオン化が可能な他手法 fast atom bombardment (FAB) 法及び matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) 法と比較して, マトリックスが不要であり, イオン源と質量検出器間が開放されているため, 液体, 固体等の試料形態を問わず, 間にかざすだけで試料表面がイオン化される利

国立医薬品食品衛生研究所

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

点がある。既に DART を使用した薬品,²⁾ 香料,³⁾ 食品添加物,⁴⁾ 薬物,⁵⁾ 培養植物^{6,7)}等への分析適用例が報告されている。

植物系違法ドラッグ製品は、乾燥植物の葉、樹皮、種子、樹脂、粉末など多様な形態で流通している。これらの製品について、抽出操作等の前処理を省いて直接分析が可能であれば、成分スクリーニングの簡便化、迅速化が期待できる。本研究では様々な形態の植物系違法ドラッグ 36 製品を対象として、DART-TOFMS を用いて、代表的な植物由来幻覚成分である *N,N*-dimethyltryptamine (DMT), mescaline, harmine, harmaline, salvinorin A 及び lysergamide (LSA) の検出を試みた (Fig. 1)。また、同製品について、過去に行った LC/MS 分析の結果⁸⁾と比較し、植物系違法ドラッグ製品のスクリーニング分析における DART-TOFMS の有用性について論じた。さらに、法律で規制されている植物試料として、大麻、psilocin, psilocybin 含有キノコ (いわゆるマジックマッシュルーム) 及びあへんに着目し、これら試料中の主活性成分分析に適用して、本法の有用性を検討した。

実験方法

1. 試料 2004–2007 年に市場で流通していた、向精神様活性を標榜する様々な形態の植物系違法ドラッグ 36 製品 [乾燥植物 (葉・花) 細片 11, 粉末 8, 樹脂状 5, 種子 4, 樹皮 3, タバコ状 2, そ

の他 3 試料] を測定試料とした。これらの 36 製品は、LC/MS 分析により、植物由来活性成分及び故意に添加された合成化合物について、既報⁸⁾により同定済みのものである。また、これら製品中に含まれる代表的な植物由来幻覚成分 DMT, mescaline, harmine, harmaline, salvinorin A, LSA の含有量は、LC/MS 分析による既報⁸⁾のものを参照した。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規制されている植物試料は、大麻 2 種、マジックマッシュルーム 1 種及びあへん 2 種を使用した。

2. 試薬 DMT, mescaline HCl, psilocin, psilocybin は過去に報告した方法⁹⁾で合成したものを使用した。Salvinorin A は徳島文理大学香川薬学部代田 修博士より、LSA は星薬科大学の細江智夫博士より供された。Harmine 及び harmaline は Aldrich 社 (MO, USA) より、 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) は Cerilliant 社 (TX, USA) より購入した。Morphine HCl, codeine H₃PO₄, thebaine, papaverine HCl 及び noscapine HCl は塩野義製薬から購入又は供されたものを使用した。各化合物は過去に HPLC, TLC を用いて純度確認を行い、標品として使用しているものを用いた。それぞれの化合物は 1 mg/ml のメタノール溶液を作成し、定性用の標準化合物溶液とした。その他の試薬は HPLC 用又は試薬特級に準じたものを使用した。また、LC/MS 測定時の抽出溶液の膜ろ過フィルターとして UltraFree-MC (孔径 0.45 μ m) Millipore 社製

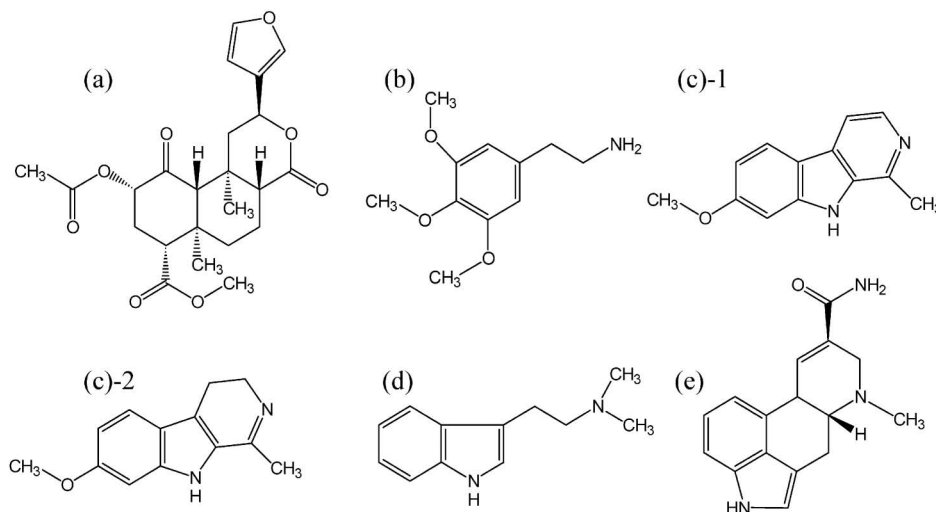


Fig. 1. Chemical Structures of Six Kinds of Major Hallucinogenic Plant Constituents Studied in This Study
(a): salvinorin A, (b): mescaline, (c)-1: harmine, (c)-2: harmaline, (d): *N,N*-dimethyltryptamine (DMT), (e): lysergamide (LSA).

(MA, USA) を使用した。

3. DART-TOFMS 測定条件 DART-TOFMS 測定装置として、イオン源 Direct Analysis in Real Time (DART) (日本電子社製) に質量分析計 AccuTOF JMS-T100 (日本電子社製) を連結したものを使用した。測定条件は以下の通りである。なお、質量校正には PEG600 を使用し、各測定の内標準物質として diphenhydramine ($C_{17}H_{21}NO$) 溶液を用いた。

DART 条件

Positive mode; gas flow: He, 2.0 l/min, gas temp.: 200–250°C, needle: 3200 kV, electrode 1: 100 V, electrode 2: 250 V

TOFMS 条件

Positive mode; orifice 1: 15 V, 80°C, orifice 2: 5 V, ring lens: 5 V, ion guide: 500 V, reflectron: 950 V, mass range: 10–1000 (Da)

4. DART-TOFMS 測定方法 測定試料を DART イオン源と TOFMS の間にかざすことで測定した。乾燥した植物試料 (葉, 樹皮, 根) 等は試料片をピンセットでつまみ, そのまま先端をイオン源にかざした。また粉末, 樹脂は葉包紙に包むか, 微量をガラス棒の先端に付着させ測定を行った。種子は乳棒を用いて粗く砕き, 内容物をガラス棒の先端に微量付着させた。また, 溶液はガラス棒に液体を付着させたのちに先端をかざして測定した。同一試料を 1 回の分析中で数回繰り返し測定し, 得られたスペクトルの精密質量値から化合物の組成推定を行った。試料から分析対象化合物の $[M+H]^+$ に相当するイオンピークが検出された場合には, さらに定性用標準化合物メタノール溶液を使用して分析を行い, 両者の測定値を比較した。

5. LC/MS 測定方法 粉末, 樹脂状の製品は 10 mg, その他の乾燥植物等は乳鉢で粉碎し 20 mg を量り取り, メタノール 2 ml を加えて 10 分間超音波抽出を行った。2000 rpm で 5 分間遠心後, 上清を膜ろ過して LC/MS 測定用試料とした。測定機器に LC/MSD 1100 (Agilent, CA, USA), カラムに Atlantis dC18 (2.1×150 mm, 5 μ m) (Waters, MA, USA) を使用し positive mode で測定を行った。その他の詳細条件は過去の報告に記載した通りである。⁸⁾

結果及び考察

1. 植物系違法ドラッグ製品の分析 DART-TOFMS で試料を測定するに当たり, 2004–2007 年に市場で流通していた様々な形態の植物系違法ドラッグ製品 36 試料を測定試料とした。乾燥した葉, 樹皮, サボテンの皮などからは, 試料の一部をイオン源にかざすと, そのままの状態でも容易に成分ピークが検出できた。種子は表面からでは検出できず, 殻を砕いて中身をガラス棒に微量付着させることで検出可能となった。

DART イオン源を用いた質量分析では, カラムによる分離を行わないので各成分はイオン化されると同時に検出され, スペクトル強度はイオン化の容易さに大きく左右される。¹⁾ また, 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った。さらに DART 測定に必要な試料は微量で, 葉 1 枚, 種子 1 粒から目的成分を検出できるため, 同一試料を LC/MS 等で測定可能であり, スクリーニングの信頼性を高めることができる。したがって, 1 次スクリーニングを簡便な DART-TOFMS で行ったのち, LC/MS 等を用いて確認及び定量を行う手法が有効である。

DART-TOFMS の positive mode で植物系違法ドラッグ製品の測定を行った結果, 測定した 36 製品のうち, 分析対象とした植物由来幻覚成分 6 化合物 (DMT, mescaline, harmine, harmaline, salvinorin A, LSA) に相当する $[M+H]^+$ イオンが主なピークとして 21 製品から検出された (Table 1)。本測定結果と過去に報告した LC/MS 分析による成分分析結果⁸⁾を比較すると, 検出化合物は両測定方法で一致した。さらに, 表中にこれら化合物について LC/MS 定量分析の結果を参考値として記載した。DART-TOFMS を用いた定量分析は, TLC を装着した分析についての報告があるものの, その再現性, 定量性は LC/MS に比べて低い。¹⁰⁾ また, DART-TOFMS 分析の検出限界について LC/MS 分析と単純に比較することはできないが, 今回使用した植物試料の対象成分量の範囲ではすべて検出可能であった。

分析対象化合物を検出した代表的な製品について, Fig. 2 に DART-TOFMS スペクトル及び同製品メタノール抽出液の LC/MS スペクトル及びクロマト

Table 1. DART-TOFMS and LC/MS Analyses of the 36 Plant Products Advertized Psychotropic Effects

Compounds	Plant products (Indicated name)	Form	DART-TOFMS			LC/MS ^{b)}	
			Detected ^{a)} (samples)	Accurate mass measurements	Estimated elemental compositions	Detected (samples)	Amount ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Salvinorin A	Salvia	Dried leaves, Cigarette	9	433.1887/ 373.1666	$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_8/$ $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_6[\text{M}+\text{H}-60]^+$	9	3.0-23.0
Mescaline	San pedro etc.	Cactus, Powder	3	212.1268	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_3$	3	2.0-17.0
Harmine	Harmala etc.	Bark, Seeds, Powder, Resin	5	213.1037	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$	5	0.8-35.0
Harmaline				215.1276	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$		0.1-45.0
DMT	Ayahuasca etc.	Bark	2	189.1397	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2$	2	11.0, 12.0
LSA	Woodrose etc.	Seeds	2	268.1448	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}$	2	0.05, 2.0

a) Detected the ion corresponding to the protonated molecular ion of the targeted compound. b) Data are from ref. 8).

グラムを示した。

「アヤワスカ」を標榜する乾燥植物片 2 製品から、DMT の $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当するイオンをメインピークとして検出し、精密質量の測定値 189.1397 から DMT のプロトン付加体の組成式 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2$ (理論値 189.1392) が推測された [Fig. 2(a)].

Salvinorin A に関しては、DART-TOFMS 測定において $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当するイオンと主ピークとして $[\text{M}+\text{H}-60]^+$ に相当するイオンが 9 製品から検出された。香料が添加されているものや、他の植物と混合している製品 (タバコ状) 等についても分析したが、いずれの試料からも m/z 433 及び 373 の精密質量値が測定可能であり、プロトン付加体の組成式が推定可能であった。LC/MS による定量分析では 9 製品中の salvinorin A の含有量は 3-23 $\mu\text{g}/\text{mg}$ であった。Figure 2(b) に salvinorin A を含有する代表的な製品 (乾燥葉) から得られた DART-TOFMS スペクトル及び LC/MS の測定結果を示した。

LSA の $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当するイオンが検出された 2 製品は外見の異なる種子で woodrose と Rivea corymbosa の表記があり、LC/MS 測定による LSA 含有量はそれぞれ 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 0.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ と大きく異なった。LSA は分解し易く、LC/MS 測定においては、迅速な抽出操作、測定が求められるが、DART-TOFMS を用いた分析は前処理が不要であり、含有量 0.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の試料からも検出可能であった [Fig. 2(c)]. また、LSA 含有植物には iso LSA が存在することが報告されている。¹¹⁾ LC/MS 分析では分離可能であっても、DART-TOFMS では異性体を区別できないため、同一ピークとして検

出されると考えられた。

Mescaline では、DART-TOFMS 測定において 3 製品から $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当するピークが検出された。また、精密質量の測定値 212.1285 から組成式 $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ (理論値 212.1287) が推測された [Fig. 2(d)]. LC/MS 分析においては乾燥したサボテン試料を粉砕する必要があるが、DART-TOFMS による分析では試料片から容易に測定が可能であった。

Harmine, harmaline は含有が確認された 5 製品のすべてで同時に検出され、LC/MS 測定における含有量に相関なく harmine 由来の $[\text{M}+\text{H}]^+$ ピークに相当する m/z 213 の強度が、harmaline 由来の $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当する m/z 215 より強く観察された [Fig. 2(e)]. Harmine, harmaline 含有植物製品は、種子や樹皮等の植物体及び樹脂や粉末状の製品が存在したが、加工された製品より植物体において、両化合物のピーク強度が高い傾向にあった。

以上の結果から、DART-TOFMS を用いた分析は、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優れた方法と考えられた。特に、Salvinorin A 含有植物 (*Salvia divinorum*) は、Salvinorin A とともに、平成 19 年 4 月より指定薬物として規制されているが、呈色反応やイムノアッセイなどの簡易スクリーニング手法は現在のところ報告されていない。また、Salvinorin A は、植物製品のメタノール抽出物を用いた GC/MS や HPLC 等の分析において、configuration の異なる化合物や分解物が一部検出されることが報告されており、¹²⁾ 様々な形態の製品から前処理を行わず迅速に測定することが可能な DART-TOFMS は、有用な分析手法であると考えられた。しかし、高濃度に添加される

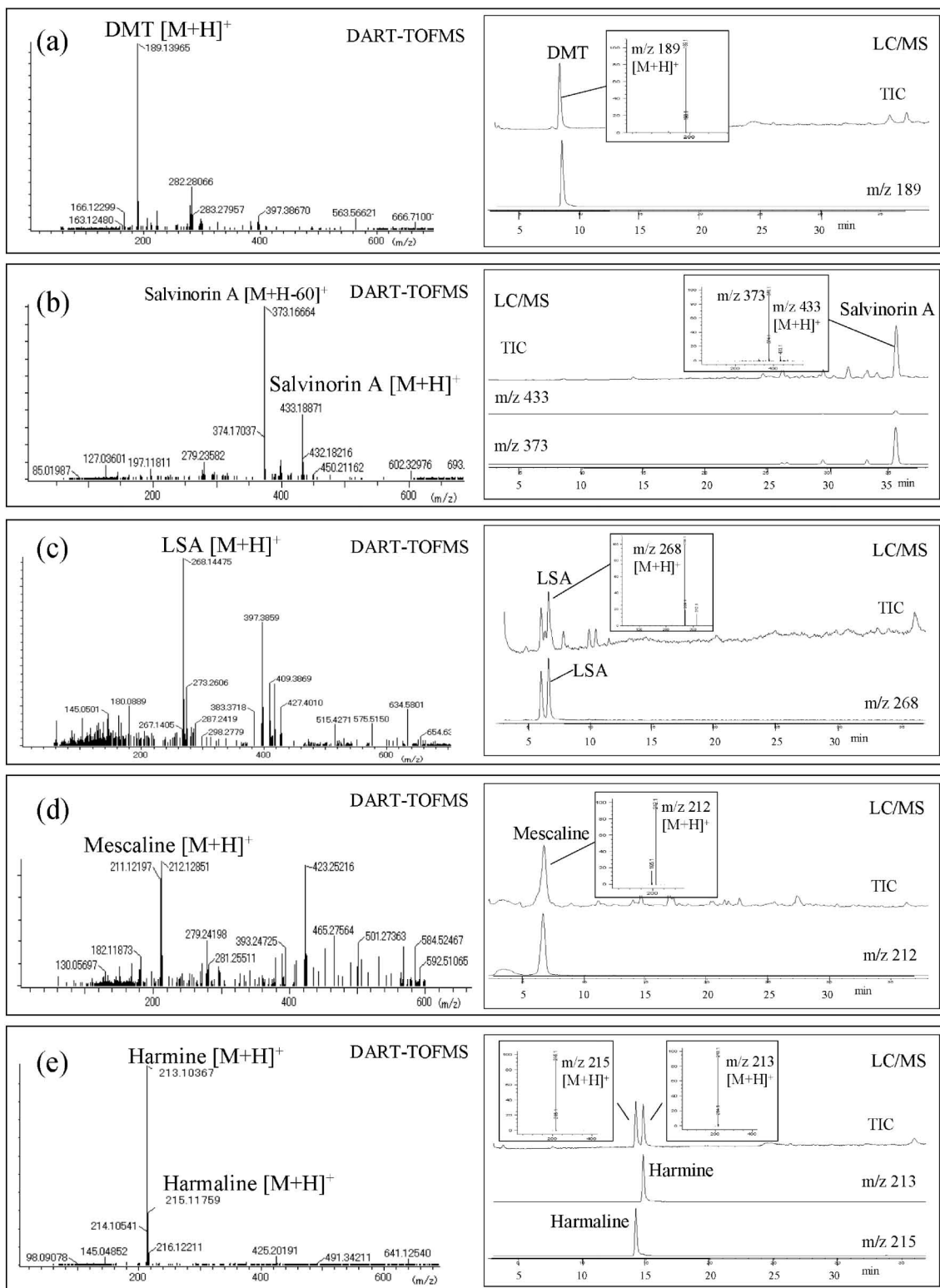


Fig. 2. DART-TOFMS Mass Spectra and LC/MS Ion Chromatograms of the Products

(a): “Ayawaska” (bark sample contained DMT), (b): “Salvia” (dried leaf sample contained salvinorin A), (c): “Rivea corymbosa” (seeds sample contained LSA), (d): “San pedro” (dried cactus sample contained mescaline), (e): “Harmala” (seeds sample contained harmine and harmaline).

可能性のある合成化合物や常在成分によるイオン化の妨害も否定できないため、強度の大きい他ピークが検出された場合には注意が必要である。また、構

造類似体や異性体の多い合成違法ドラッグ成分においては、組成式が同一な化合物が多く DART-TOFMS のみでは判別できないことに留意しなけれ

ばならない。

2. 法律で規制されている植物試料の分析 法律で規制されている植物試料として、大麻 (*Cannabis sativa* L.), psilocin, psilocybin 含有キノコ (いわゆるマジックマッシュルーム) 及び、アヘン試料の DART-TOFMS による測定を行い Fig. 3 に結果を示した。

大麻試料では、乾燥葉及びタバコ状の試料から、代表的な大麻成分である THC, cannabidiol (CBD) 及び cannabinol (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 (315.2330 及び 311.2018) から、THC/CBD 及び CBN のプロトン付加体の組成式 $C_{21}H_{31}O_2$ 及び $C_{21}H_{27}O_2$ (理論値 315.2324 及び 311.2011) が推定可能であった [Fig. 3(a)].

乾燥キノコ試料は試料片を直接イオン源にかざしたところ、psilocin 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った。また、精密質量の測定値 205.1324 から psilocin のプロトン付加体の組成式 $C_{12}H_{17}N_2O$ (理論値 205.1341) が推定可能であった [Fig. 3(b)]. しかし、主活性

成分の 1 つである psilocybin に相当する質量のイオンピークは検出されなかった。Psilocybin は熱等により容易に脱リン酸化され psilocin に分解されるため、GC/MS 分析では psilocin として検出されることが報告されている。¹³⁾ DART-TOFMS による測定でも同様に、標準品の psilocybin 溶液を測定したところ、イオン化時の熱により psilocin として検出されることを確認しており、そのために今回乾燥キノコ試料から psilocybin が検出されなかったと考えられる。

アヘン試料については樹脂状と粉末状の試料を、薬包紙に少量取りイオン源にかざして測定したところ、主要なアヘンアルカロイドの $[M+H]^+$ に相当するイオンが検出された。Morphine ($C_{17}H_{19}NO_3$, 理論値 286.1443, 測定値 286.1431), codeine ($C_{18}H_{21}NO_3$, 理論値 300.1559, 測定値 300.1579), thebaine ($C_{19}H_{21}NO_3$, 理論値 312.1599, 測定値 312.1595), papaverine ($C_{20}H_{21}NO_4$, 理論値 340.1549, 測定値 340.1535) 及び noscapine ($C_{22}H_{23}NO_7$, 理論値 414.1553, 測定値 414.1542) が、測定値よりプロトン付加体の組成式が推定可能であった 5 化合物であ

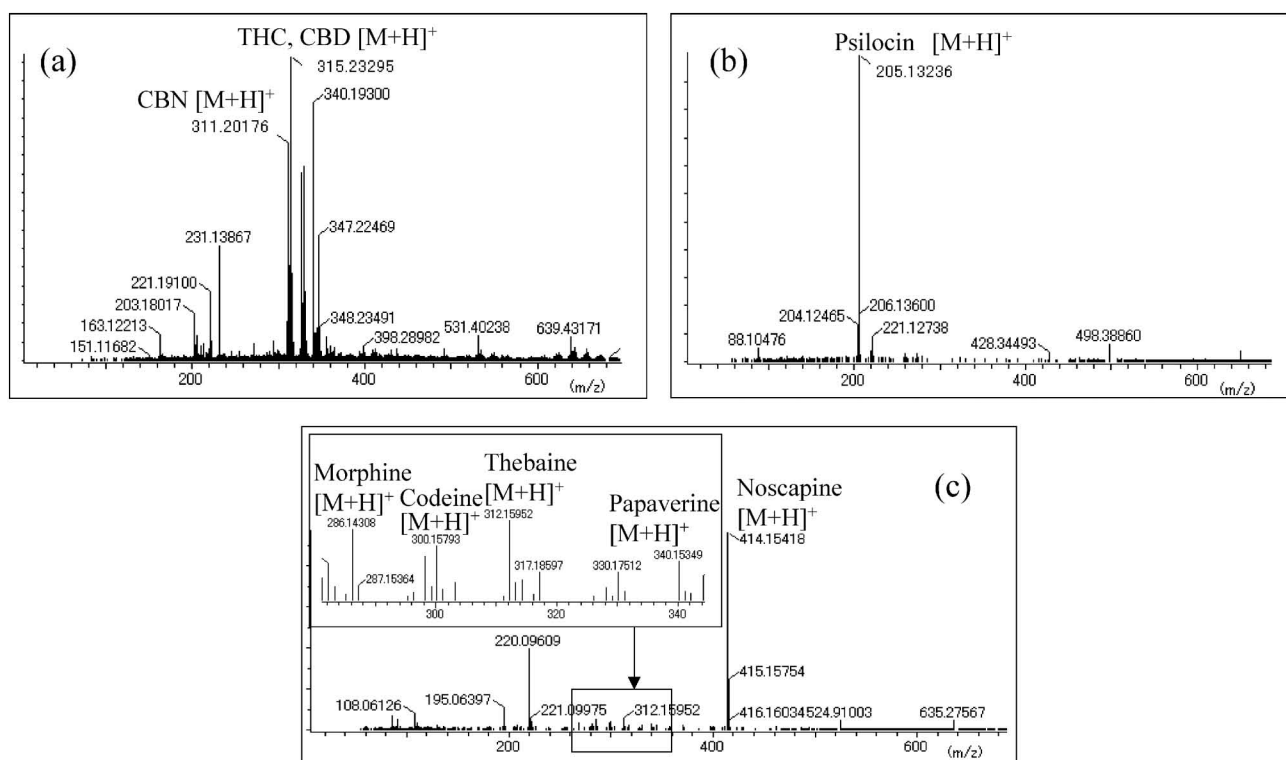


Fig. 3. DART-TOFMS Mass Spectra

(a): marijuana cigarette sample contained CBN, THC and CBD, (b): dried mushroom sample contained psilocin, (c): opium resin contained morphine, codeine, thebaine, papaverin and noscapin.

る [Fig. 3(c)]. 樹脂試料からは noscapine が, 粉末試料からは papaverine が主ピークとして検出されたが, アルカロイド中最も含量が高い morphine のイオン強度は低かった. そこで, 同濃度に調整したあへんアルカロイド5化合物のメタノール溶液を, ガラス棒に付着させて DART-TOFMS で測定したところ, morphine のイオン強度が最も低く, 他化合物が検出された 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において検出ができなかった. したがって, あへん試料を DART で確認する際は, morphine より noscapine 等の成分を指標とするのが望ましいと考えられた.

結 論

DART-TOFMS を用いて, 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製品及び法規制植物について, 抽出操作等の前処理を行わずに測定を行った. その結果, 今回測定を行った植物に含有される代表的な幻覚成分や活性成分に相当するピークが検出でき, 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. LC/MS や GC/MS 等他の分析手法と比較すると, DART-TOFMS では前処理が不要で測定時間が短く簡便であり, キャリーオーバーが起き難い等の利点がある. したがって, 一次スクリーニングを DART-TOFMS で行ったのち, LC/MS や 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る.

謝辞 本研究は, 厚生労働科学研究費補助金で行われたものであり, 関係各位に深謝いたします.

REFERENCES

- 1) Cody R. B., Laramée J. A., Durst H. D., *Anal. Chem.*, **77**, 2297–2302 (2005).
- 2) Petucci C., Diffendal J., Kaufman D., Mekonnen B., Terefenko G., Musselman B., *Anal. Chem.*, **79**, 5064–5070 (2007).
- 3) Haefliger O. P., Jeckelmann N., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 1361–1366 (2007).
- 4) Vail T., Jones P. R., Sparkman O. D., *J. Anal. Toxicol.*, **31**, 304–312 (2007).
- 5) Bennett M. J., Steiner R. R., *J. Forensic Sci.*, **54**, 370–375 (2009).
- 6) Madhusudanan K. P., Banerjee S., Khanuja S. P., Chattopadhyay S. K., *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 596–600 (2008).
- 7) Banerjee S., Madhusudanan K. P., Khanuja S. P., Chattopadhyay S. K., *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 250–253 (2008).
- 8) Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., *Jpn. J. Food Chem.*, **15**, 73–78 (2008).
- 9) Ono M., Shimamine M., Takahashi K., *Eisei Shikenjo Hokoku*, **91**, 33–41 (1973).
- 10) Morlock G., Ueda Y., *J. Chromatogr. A.*, **1143**, 243–251 (2007).
- 11) Chao J. M., Der Marderosian A. H., *J. Pharm. Sci.*, **62**, 588–591 (1973).
- 12) Kikura-Hanajiri R., Kawamura M., Uchiyama N., Ogata J., Kamakura H., Saisho K., Goda Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 971–979 (2008).
- 13) Kikura-Hanajiri R., Hayashi M., Saisho K., Goda Y., *J. Chromatogr. B*, **825**, 29–37 (2005).