

デザイナードラッグとして検出された合成カンナビノイドの異性体分析について

内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 正田卓司, 福原 潔, 合田幸広*

Isomeric Analysis of Synthetic Cannabinoids Detected as Designer Drugs

Nahoko UCHIYAMA, Ruri KIKURA-HANAJIRI, Takuji SHODA,
Kiyoshi FUKUHARA, and Yukihiro GODA*

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

(Received January 12, 2011; Accepted March 24, 2011; Published online March 31, 2011)

Recently, many psychotropic herbal products, named such as “Spice”, were distributed worldwide *via* the Internet. In our previous study, several synthetic cannabinoids were identified as adulterants in herbal products being available in Japan due to their expected narcotic effects. Among those, two derivatives of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), which is major psychotropic cannabinoid of marijuana, cannabicyclohexanol (CCH, 3-[2-hydroxy-4-(2-methylnonan-2-yl)phenyl]cyclohexan-1-ol) and CP-47,497 (3-[2-hydroxy-4-(2-methyloctan-2-yl)phenyl]cyclohexan-1-ol), have been controlled as designated substances (Shitei-Yakubutsu) under the Pharmaceutical Affairs Law since November 2009. CCH was detected together with its trans-form (1-epimer) in many herbal products, and CCH and CP-47,497 have two chiral centers in the structures. However, the pharmaceutical activities of the isomers of CCH have not been reported. This study presents chiral separations of CCH, its trans-form and CP-47,497 in the products using LC-circular dichroism (CD) and LC-MS analyses. The enantiomeric pairs of CCH, its trans-form and CP-47,497 were separated, respectively. Subsequently, the analyses of the herbal products showed that CCH and its trans-form existed as mixtures of enantiomers and the relative ratios of CCH and the trans-form enantiomers ranged from 42/58% to 53/47% and from 33/67% to 52/48%, respectively.

Key words—synthetic cannabinoids; chiral separation; cannabicyclohexanol; CP-47,497; designer drug; LC-MS

緒 言

近年、違法ドラッグ市場では、ハーブやお香と称し、植物系違法ドラッグ製品が多数販売される傾向がみられる。その中でも特に、カンナビノイド様の作用を標榜する植物系製品の流通が増加している。われわれはこれまでに、これら植物系違法ドラッグ製品の成分分析を行い、製品中から数種類の合成カンナビノイドを単離・同定しているが、¹⁻⁴⁾ これら化合物はすべてカンナビノイド様の薬理作用を有する化合物として合成されたものであった。そのうち、大麻の主活性成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) の誘導体である cannabicyclohexanol (CCH, 3-[2-hydroxy-4-(2-methylnonan-2-yl)phenyl]cyclohexan-1-ol), CP-47,497 (3-[2-hydroxy-4-(2-methyloctan-2-yl)phenyl]cyclohexan-1-ol) は、平成 21 年 11 月に 1RS, 3SR のラセミ体(1, 2), (5, 6)として、

指定薬物に指定された (Fig. 1). CCH (1 or 2) 及び CP-47,497 (5 or 6) は、それぞれ 1, 3 位に不斉炭素を有する化合物であるが、CCH の trans 体 (1-epimer, 3 or 4) が CCH とともに多くの製品から検出されている。^{3,5)} また、(-)-CP-47,497 (5) は、(+)-CP-47,497 (6) よりも若干強いカンナビノイド活性が報告されているが、^{6,7)} 製品中に含有されるこれら化合物の立体異性体分析は報告されていない。さらに、CP-47,497 の 4-hydroxypropyl 体であり、代表的なカンナビノイド受容体 (cannabinoid receptor: CB-R) アゴニストである CP-55,940 (Fig. 1) は、(-)-体が (+)-体よりも 88 倍強い CB₁-R 親和性を持つことが知られている。⁶⁾ また、現在日本での検出事例はないが、ヨーロッパやアメリカで流通が報告されている合成カンナビノイド HU-210 (アメリカでは麻薬に指定) は強力な CB-R アゴニストであるが、⁸⁾ その enantiomer である HU-211 はカンナビノイド様の向精神活性がないことが知られている (Fig. 1).^{9,10)} このように、これ

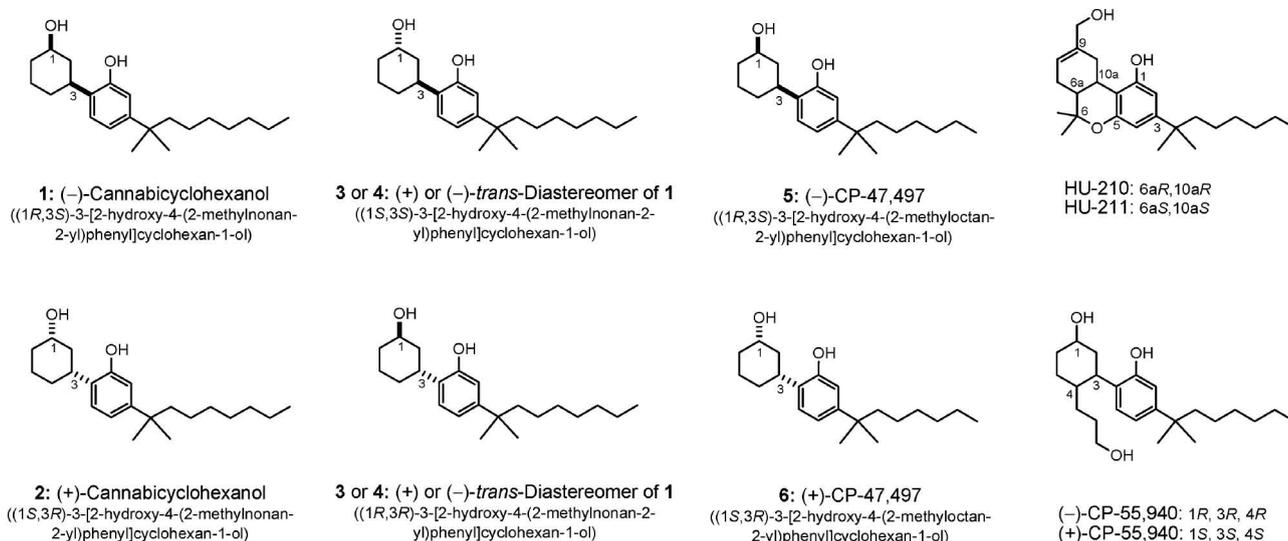


Fig. 1. Structures of Synthetic Cannabinoid Enantiomers

ら合成カンナビノイドの光学異性体別の活性確認は、薬理学的にみて興味深い課題であり、そのためにはまず、光学異性体分析法の確立が重要となる。また、レギュラトリーサイエンスの観点からみると、違法薬物中の合成カンナビノイドがどのような異性体組成を持つか実態を調査することは、今後の規制と取り締まりのあり方を考える面で重要である。そこで本研究では、LC-circular dichroism (CD) を用いて、CCH, *trans* 体及び CP-47,497 をキラル HPLC カラムにより光学分割を行うと同時に、各異性体の CD スペクトルを測定することにより、光学異性体分析を行った。さらに、違法ドラッグ製品についてはキラル HPLC カラムを用いた LC-MS 分析を行い、各化合物の enantiomer の相対比を調べたので報告する。

実験方法

1. 分析試料及び試薬 平成 20–21 年度にインターネットを介して購入したカンナビノイド様作用を標榜した植物系違法ドラッグ製品中で、あらかじめ GC-MS 及び LC-MS 分析により、CCH 及び *trans* 体、CP-47,497 のいずれかが検出された 37 製品を分析に用いた。³⁾ なお、既報³⁾で分析した 34 製品に加え、新たに合成カンナビノイドが検出された 3 製品についても、分析に用いた。CCH 及び *trans* 体は Melvin らの方法¹¹⁾に従って筆者らが合成し、精製したものをを用いた。CAY-10596 (CCH の製品

名)、(±)-CP-47,497、(-)-CP-47,497 及び (+)-CP-47,497 は Cayman Chemical 社より購入した。HPLC、LC-MS の移動相に用いたアセトニトリルは HPLC グレードを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。抽出溶液の膜ろ過には、Ultrafree-MC (0.45 μ m filter unit, MILLIPORE 社製)を用いた。

2. 測定用試料の調製法 植物細片は乳鉢で粉末化して 10 mg を使用し、MeOH 1 ml を加え、超音波下 10 分間抽出を行った。さらに膜ろ過を行い、不溶物を取り除いて測定試料とした。

3. LC-CD 分析条件 装置：[HPLC] JASCO Gulliver Series, カラム：Chiralpak-IA3 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3 μ m, Daicel) 又は Chiralpak-IA (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m, Daicel), 移動相：0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル (30/70), 測定波長：210–420 nm, 流速：0.2 ml/min 又は 1 ml/min, カラム温度：30°C, 注入量：1 μ l, 検出：UV 検出器 (UV-970) 及び円二色性 (CD) 検出器 (CD-2095)。

4. LC-MS キラル分析条件 装置：[LC] Waters ACQUITY UPLC/[MS] Waters Single Quadrupole Detector (SQD), カラム：Chiralpak-IA3 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3 μ m, Daicel), 移動相：0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル (35/65), 測定波長：190–500 nm, 流速：0.2 ml/min, カラム温度：30°C, 注入量：1–3 μ l, 検出：

フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) 及び質量検出器。

5. 質量分析条件 イオン化: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法, Positive and negative mode, Desolvation gas flow: N₂ 650 l/h, Desolvation gas temp.: 350°C, Cone voltage: 30 V, Capillary voltage: 3000 V, scan range: m/z 50–500.

各化合物の検出は, LC-MS のネガティブモードにおける各製品中の CCH (1 or 2) (Mw 332), trans 体 (3 or 4) (Mw 332) の脱プロトン化分子イオン ($[M-H]^-$ m/z 331) 及び CP-47,497 (5 or 6) (Mw 318) の脱プロトン化分子イオン ($[M-H]^-$ m/z 317) をモニタリングすることにより行った。また, 製品中の各化合物の enantiomer の相対比は, 脱プロトン化分子イオンピークの面積比から算出した。

結 果

1. 合成カンナビノイドの LC-CD 及び LC-MS による光学異性体分析 LC-CD 分析の結果, 合成品である CCH (1 and 2), trans 体 (3 and 4) 及び市販品 (±)-CP-47,497 (5 and 6) の各 enantiomer はそれぞれ良好に分離した [Figs. 2(A)–(C)]。また, 違法ドラッグ製品中から単離した CCH¹⁾ も合成品と同様に enantiomer として完全に分離した (Data not shown)。また, 市販品の (–)-CP-47,497 (5) 及び (+)-CP-47,497 (6) はそれぞれ 1 ピークとして検出され, CD においてもそれぞれ正と負に検出された [Figs. 2(D) and (E)]。さらに, LC 分析中に stop-flow mode として, CCH (1 and 2) 及び (±)-CP-47,497 (5 and 6) それぞれの CD スペクトルを測定したところ, 両化合物のスペクトルは酷似していた [Figs. 2(F) and (G)]。CCH と CP-47,497 の立体構造が類似していることから (Fig. 1), 各 enantiomer の絶対構造には相関があると考えられるため, (–)-CCH は化合物 1, (+)-CCH は化合物 2 と強く推定された。

さらに, LC-MS により標品及び違法ドラッグ製品の MeOH 抽出物について分析を行った (Figs. 3 and 4)。標品の結果は先述と同様であるが, Cayman Chemical 社において (1*R*,3*S*)-3-[2-hydroxy-4-(2-methylnonan-2-yl)phenyl]cyclohexan-1-ol (1) として販売されていた CAY-10596 についても分析したところ, 表記とは異なり enantiomer の混合物 (1

and 2) であることが明らかとなった [Fig. 4(D)]。また, 製品 No. 6 を分析した結果, CCH (1 and 2) 及び trans 体 (3 and 4) の enantiomer は良好に分離した [Fig. 4(E)]。また, 標品である CCH, trans 体及び (±)-CP-47,497 の各 enantiomer のピーク面積比は Table 1 に示した。

2. 違法ドラッグ製品中の各合成カンナビノイド enantiomer の相対比の傾向 次に, 違法ドラッグ 37 製品について光学異性体分析を行った (Table 1)。その結果, 全製品において, 含まれていた CCH 及び trans 体は enantiomer として完全分離した。CCH の enantiomer のピーク面積比 (1/2) は 42/58(%)–53/47(%) であり, trans 体のピーク面積比 (3/4) は 33/67(%)–52/48(%) であった (Table 1)。したがって, CCH 及び trans 体は各 enantiomer の混合物として製品中に混入されていることが明らかとなった。また, CP-47,497 は製品 No. 1 からのみ極少量検出され, enantiomer のピーク面積比 (5/6) は 52/48(%) であった (Table 1)。なお, 標品として用いた CCH, trans 体及び (±)-CP-47,497 もピーク面積上, 若干の enantio excess が観察されるが, これら化合物の光学が完全にラセミ体であるという証明はなく, その原因解明は行っていない。

考 察

今回分析を行った CCH, CP-47,497 は, 大麻の主活性成分 Δ⁹-THC の誘導体として 1980 年代に Pfizer により CB-R アゴニストとして合成された化合物であり, その構造に不斉炭素を有している。これまでに, 合成カンナビノイドの光学分割についてはいくつか報告があり, 前述の HU-210 及びその enantiomer である HU-211 の光学分割については, Abu-Lafi らが報告している。¹²⁾ また, (±)-CP-47,497 (5 and 6) については, trans 体と比較して, より強いカンナビノイド様の鎮痛作用を有すること, さらに, (–)-CP-47,497 (5) は, (+)-CP-47,497 (6) よりも 2 倍強い CB₁-R 親和性を持つことが報告されているが,^{6,11)} CCH については立体異性体の活性報告はない。今回分析を行った違法ドラッグ 37 製品については, Table 1 にも示したが, 製品中の CCH と trans 体の比率については, CCH (cis 体) の割合が 65–>90% とばらつきがあること

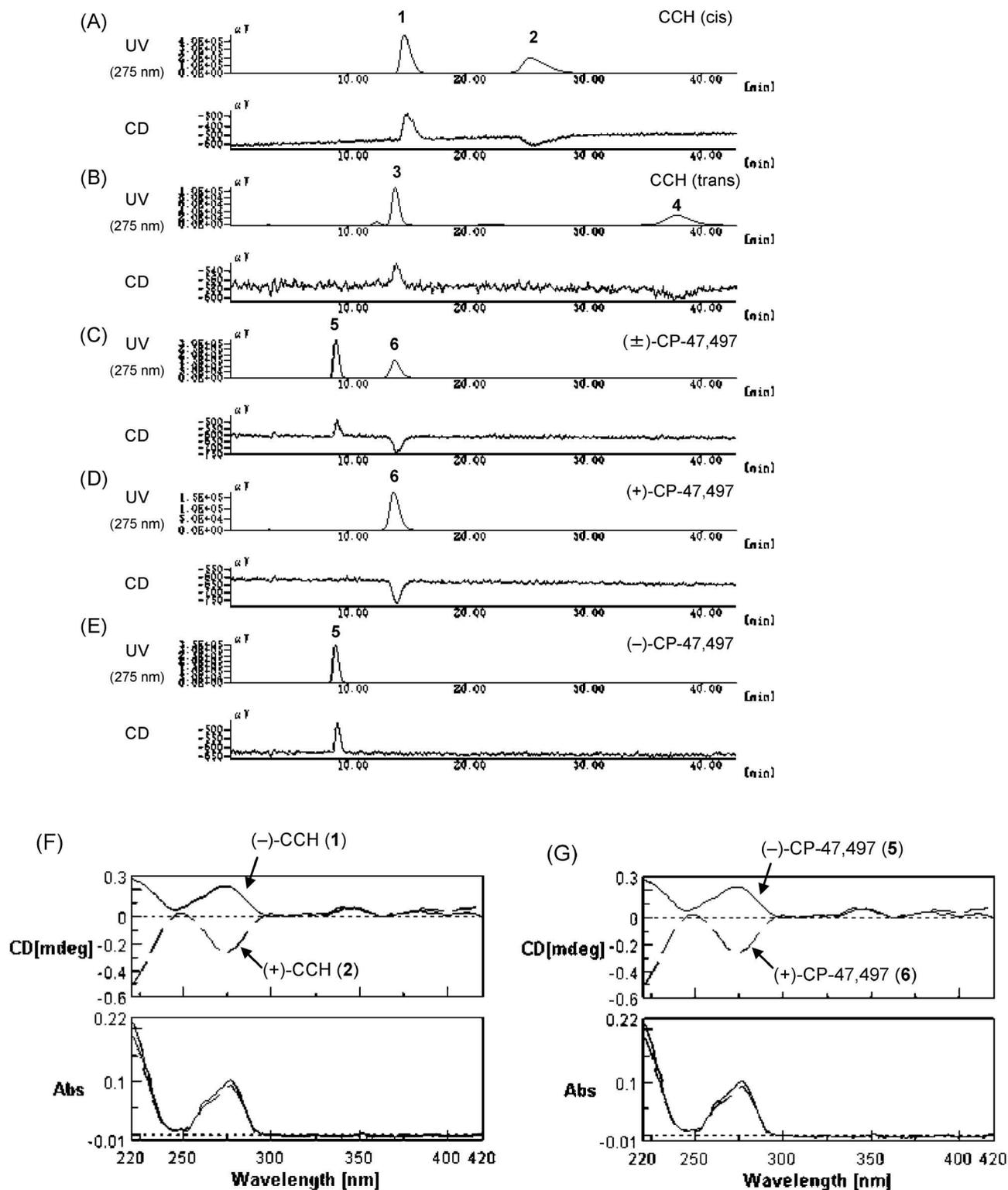


Fig. 2. LC-UV and CD Chromatograms of the Standard of Synthetic Cannabinoid Enantiomers

The compounds CCH (A), CCH trans-form (B), (±)-CP-47,497 (C), (+)-CP-47,497 (D) and (-)-CP-47,497 (E) were analyzed. Upper and lower traces: UV and CD signals at 275 nm. CD and UV spectra of the each peak of CCH (F) and (±)-CP-47,497 (G) at the stopped-flow mode.

を既に報告している.³⁾ この点については、以下のように考えると合理的に説明可能となる。すなわち、既報¹¹⁾の方法により CP-47,497 と同様に合成

されたと推測すると、合成ルートには次の2ルートが考えられる。(1) 前駆体であるケトン体のカルボニル基を sodium borohydride (NaBH₄) により還

Table 1. Relative Ratios (Peak Areas of MS Chromatograms) of Synthetic Cannabinoid Enantiomers (1-6) in the Herbal Products

No. Product form	CCH		CCH-trans		CP47,497		Ratio of the cis-form (1+2/1+2+3+4) ^{a)}
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	
Cannabicyclohexanol (CCH)	52	48	—	—	—	—	—
Cayman CAY10596	43	57	—	—	—	—	—
CCH-trans	—	—	46	54	—	—	—
(±)-CP-47,497	—	—	—	—	44	56	—
1 Dried leaf (cutting)	48	52	47	53	52	48	†
2 Dried leaf (cutting)	42	58	38	62	n.d. ^{b)}	n.d.	†
3 Dried leaf (cutting)	45	56	44	56	n.d.	n.d.	‡
4 Dried leaf (cigarette type of No. 2)	45	55	48	52	n.d.	n.d.	†
5 Dried leaf (cigarette type of No. 3)	45	55	44	56	n.d.	n.d.	+
6 Dried leaf (cutting)	46	54	49	51	n.d.	n.d.	†
7 Dried leaf (cutting)	45	55	48	52	n.d.	n.d.	†
8 Dried leaf (cutting)	49	51	52	48	n.d.	n.d.	†
9 Dried leaf (cutting)	46	54	48	52	n.d.	n.d.	†
10 Dried leaf (cutting)	47	53	49	51	n.d.	n.d.	†
11 Dried leaf (cutting)	47	53	48	52	n.d.	n.d.	‡
12 Dried leaf (cigarette type of No. 11)	47	53	48	52	n.d.	n.d.	†
13 Dried leaf (cutting)	47	53	51	49	n.d.	n.d.	‡
14 Dried leaf (cutting)	51	49	47	53	n.d.	n.d.	+
15 Dried leaf (cutting)	50	50	44	56	n.d.	n.d.	+
16 Dried leaf (cutting)	46	54	33	67	n.d.	n.d.	†
17 Dried leaf (cigarette type of No. 16)	44	56	39	61	n.d.	n.d.	†
18 Dried leaf (cigarette type)	51	49	50	50	n.d.	n.d.	†
19 Dried leaf (cutting)	47	53	50	50	n.d.	n.d.	†
20 Dried leaf (cutting)	45	55	45	55	n.d.	n.d.	‡
21 Dried leaf (cigarette type)	45	55	49	51	n.d.	n.d.	†
22 Dried leaf (cutting)	47	53	47	53	n.d.	n.d.	+
23 Dried leaf (cutting)	47	53	46	54	n.d.	n.d.	+
24 Dried leaf (cutting)	45	55	44	56	n.d.	n.d.	‡
25 Dried leaf (cutting)	46	55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	‡
26 Dried leaf (cutting)	47	53	42	58	n.d.	n.d.	‡
27 Dried leaf (cutting)	48	52	43	57	n.d.	n.d.	‡
28 Dried leaf (cutting)	43	57	43	57	n.d.	n.d.	+
29 Dried leaf (cutting)	47	53	45	55	n.d.	n.d.	+
30 Dried leaf (cutting)	45	55	42	58	n.d.	n.d.	+
31 Dried leaf (cutting)	43	57	42	58	n.d.	n.d.	+
32 Dried leaf (cutting)	53	47	52	48	n.d.	n.d.	‡
33 Dried leaf (cutting)	49	51	44	56	n.d.	n.d.	+
34 Dried leaf (cigarette type)	50	50	48	52	n.d.	n.d.	+
35 Dried leaf (cutting)	49	51	46	54	n.d.	n.d.	+
36 Dried leaf (cutting)	44	56	47	53	n.d.	n.d.	+
37 Dried leaf (cutting)	47	53	45	55	n.d.	n.d.	+

^{a)} The number of '+' indicates a ratio of the cis-form (1+2) as estimated from signal intensities in the corresponding GC-MS chromatograms. ‡ : >90%, † : <90%-80%, + : <80%-65%.³⁾ ^{b)} Not detected (S/N<3).

元し, cyclohexanol とした後, palladium on carbon (Pd-C) でフェノール基の保護基を外す方法, (2) 前駆体であるケトン体を先に Pd-C でフェノール基の保護基を外した後, NaBH₄ によりカルボニル基

を還元する方法である. どちらも蓋然性のある合成ルートであり, 標品を合成する際の予備的検討では, 両法とも合成可能なことを確認している. それぞれの製品が異なったルートで合成されたとする

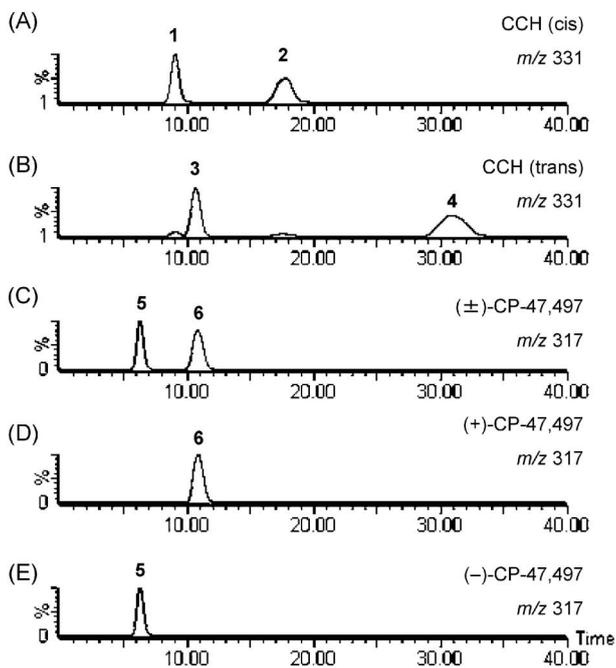


Fig. 3. LC-MS Chromatograms of the Standard of Synthetic Cannabinoid Enantiomers at m/z 331 (A, B) and m/z 317 (C-E).

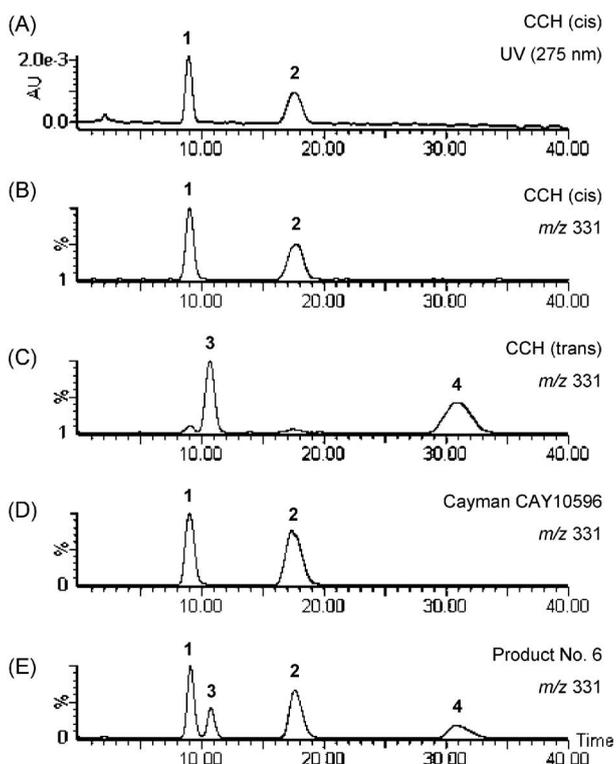


Fig. 4. LC-UV (A) and m/z 331 MS Chromatograms (B-E) of the Standard of Synthetic Cannabinoid Enantiomers and the Product No. 6

と、当然 CCH と trans 体の比率が異なる可能性が高く、ばらつきが大きくなる。さらに、本分析により、CCH 及び trans 体は enantiomer の混合物として製品中に混入されていることを示した (Table 1)。このように、製品毎に立体異性体の含量が異なっていることから、今後、合成カンナビノイドの製造地域や製造元等の情報が入手できた場合、情報を入手できた製品と各製品の diastereo excess (d.e.) 及び enantio excess (e.e.) 等を比較することにより、流通経路を推定できる可能性がある。また、本研究を基礎として、CCH と trans 体の各光学異性体の薬理活性が明らかとなれば、今後、より適切な規制を行うことが可能であるものと考えられる。

結 論

本研究では、LC-CD 及び LC-MS を用いて、指定薬物である cannabicyclohexanol (CCH)、CP-47,497、及び CCH の trans 体の光学分割を行ったところ、各 enantiomer はそれぞれ良好に分離した。さらに、違法ドラッグ 37 製品について分析を行った結果、製品中に含まれていた CCH, trans 体及び CP-47,497 は enantiomer としてそれぞれ完全分離した。したがって、CCH, trans 体及び CP-47,497 は enantiomer の混合物として製品中に混入されていることが明らかとなった。したがって、合成カンナビノイドを含め様々な違法ドラッグ成分の流通実態調査を行う場合、各成分の光学異性体分析及び同定も重要であるものと考えられた。

謝辞 本研究は、厚生労働科学研究費補助金並びに厚生労働省医薬品審査等業務庁費で行われたものであり、関係各位に深謝致します。

REFERENCES

- 1) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Haishima Y., Goda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439–441 (2009).
- 2) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Goda Y., *Forensic Toxicol.*, **27**, 61–66 (2009).
- 3) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Ogata J., Goda Y., *Forensic Sci. Int.*, **198**, 31–38 (2010).
- 4) Uchiyama N., Kawamura M., Kikura-Hana-

- jiri R., Goda Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25–37 (2011).
- 5) Auwärter V., Dresen S., Weinmann W., Müller M., Pütz M., Ferreirós N., *J. Mass Spectrom.*, **44**, 832–837 (2009).
 - 6) Melvin L. S., Milne G. M., Johnson M. R., Wilken G. H., Howlett A. C., *Drug Des. Discov.*, **13**, 155–166 (1995).
 - 7) Howlett A. C., Johnson M. R., Melvin L. S., Milne G. M., *Mol. Pharmacol.*, **33**, 297–302 (1988).
 - 8) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), “Understanding the ‘Spice’ Phenomenon.”: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_80086_EN_Spice%20Thematic%20paper%20-%20final%20version.pdf, cited 5 April, 2010.
 - 9) Mechoulam R., Feigenbaum J. J., Lander N., Segal M., Järbe T. U., Hiltunen A. J., Consoe P., *Experientia*, **44**, 762–764 (1988).
 - 10) Howlett A. C., Champion T. M., Wilken G. H., Mechoulam R., *Neuropharmacology*, **29**, 161–165 (1990).
 - 11) Melvin L. S., Johnson M. R., Harbert C. A., Milne G. M., Weissman A., *J. Med. Chem.*, **27**, 67–71 (1984).
 - 12) Abu-Lafi S., Sterin M., Levin S., *J. Chromatogr. A*, **679**, 47–58 (1994).