

厚生労働行政推進調査事業費補助金

厚生労働科学特別研究事業

大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の
試験法策定に資する研究

令和5年度 総括・分担研究報告書

(23CA2026)

研究代表者 花尻(木倉) 瑠理

令和6年3月

目次

I. 総括研究報告	
大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の試験法策定に資する研究 花尻(木倉)瑠理	1
II. 分担研究報告	
1. 分析法案の策定及び分析法の妥当性評価 花尻(木倉)瑠理 大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法案の検討及び策定 花尻(木倉)瑠理	13
2. 分析法案の策定及び定量 NMR による標準品の純度測定 田中 理恵 大麻草由来カンナビノイド試薬の NMR を用いた純度測定 田中 理恵 カンナビノイドをはじめとする大麻に特有な成分を含有する製品についての調査 田中 理恵	23 31
3. 分析法案の策定と分析法の妥当性評価(LC-MS/MS) 鈴木 俊也 LC-MS/MS による大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法妥当性評価と実試料の 測定 鈴木 俊也	39
4. 分析法案の策定と分析法の妥当性評価(LC-QTOF MS) 1 土井 崇広 LC-QTOF MS による大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法妥当性評価と実試料の 測定 1 土井 崇広	51
5. 分析法案の策定と分析法の妥当性評価(LC-QTOF MS) 2 浅田 安紀子 LC-QTOF MS による大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法妥当性評価と実試料の 測定 2 浅田 安紀子	63
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	71

大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の試験法策定に資する研究

研究代表者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部 部長

研究要旨:本研究では、大麻由来製品(CBD 含有製品)中に混在する微量の Δ^9 -THC (Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A)について、仮の残留限度値(本研究では、飲料 0.00001% [100 ng/g], その他の製品 0.001% [10 µg/g] を設定)が測定可能な試験法を検討した。その結果、今回分析対象とした薬物添加コントロール試料ならびに実試料においては、本研究で設定した分析条件を用いて、総 Δ^9 -THC 量の限度値として想定した 0.001 % (飲料 0.00001%)を超える含有の有無についての判定が可能であると考えられた。しかし、本検討に供した製品は、オイル・グミ・クッキー・飲料のコントロール試料とそれらの実試料がそれぞれ1製品ずつのみであり、その中でもクッキーの実試料で Δ^9 -THC の妨害となる未知ピークが確認された。様々な要素によって定量可能な範囲が影響されることを鑑みて、標準添加法で定量分析を行う、使用する分析機器で適宜分析条件の最適化を図る等の検討が必要である。また、今回検討を実施した製品と異なる性状の大麻由来製品にも対応可能な分析法とするには、引き続き慎重な検討が必要と考えられた。今後、実際に各試験機関において製品を分析する際には、「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(厚生食基発 0308 第1号, 令和 6 年 3 月 8 日厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長通知)等を参考に、それぞれの製品について、分析法の妥当性を確認する必要があると考えられる。なお、 Δ^9 -THC をはじめとして大麻関連化合物の標準品は、日本において現時点で入手が困難なものも多く存在している。 Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A, また内標準物質として用いることが想定されるそれら化合物の重水素標識体のみならず、異性体や類縁化合物等、十分な種類の標準品を整備しうる環境づくりが望まれる。最後に、本研究班で検討した結果を参考に、「大麻製品の標準的な分析法」を提示した。

研究分担者

花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所
医薬安全科学部 部長
田中 理恵 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部 主任研究官
鈴木 俊也 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部医薬品研究科科長
土井 崇広 大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部医薬品課 主幹研究員
浅田安紀子 大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部医薬品課 主任研究員

研究協力者

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
水谷佐久美 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
植村 望美 東京都健康安全研究センター
佐藤 美紀 東京都健康安全研究センター
西山 麗 東京都健康安全研究センター

A. 研究目的

大麻草には 120 種類以上のカンナビノイド成分が存在しており、主カンナビノイドとして、幻覚作用などの中枢作用を有する

Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), また幻覚作用を示さない cannabidiol (CBD) 等を含有する。現在, 日本において, 大麻(草)は大麻取締法で規制され, Δ^9 -THC 及び THC の 6 種類の異性体(化学合成物)が麻薬及び向精神薬取締法上の麻薬として規制されている。 Δ^9 -THC は生の植物体中ではフェノールカルボン酸体 Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A)の状態が存在し, 光や熱などによって脱炭酸がおこり活性体である Δ^9 -THCへと変化する。CBD は, 諸外国で難治性小児てんかん薬の主成分として活用されている一方で, CBD 成分を含む様々な製品群が合法的に販売され, 市場規模が急速に拡大している。厚生労働省は, 昨今の大麻をめぐる様々な状況の変化を鑑み, 2023 年 10 月に大麻取締法及び麻薬及び向精神薬取締法の一部を改正する法律案を国会に提出した。改正法案では, 医薬品の施用規制の見直しによる医療ニーズへの対応, 大麻使用罪の設定, 部位規制から成分規制へと原則を変更するとともに, 安全かつ適切な製品流通の確保のための麻薬成分 Δ^9 -THC の残留限度値の設定, そして大麻草の栽培及び管理の規制の見直しが示されている。改正後は, 大麻由来成分を含む医薬品の国内での使用が可能となり, また, 大麻取締法下での規制にあった大麻及び大麻成分由来 THC が麻薬として位置付けられ, 麻薬取締法下での規制となる。一方, 現行の大麻取締法には使用罪はないが, 改正後は THC を含有する大麻及びその製品の使用について麻薬取締法違反となる。なお, 大麻取締法は, 栽培に関する内容に特化し「大麻草の栽培の規制に関する法律」となる。本改正法案は 2023 年 12 月に国会で可決, 12 月 13 日に公布され, 1 年以内に施行予定となっている。

上述した通り, CBD含有食品等の大麻由来製品の安全かつ適切な流通の確保のため, 麻薬成分 Δ^9 -THCの残留限度値を設定し(製造販売者が限度値適合性を担保), 買い上げ調査等を含めた行政による監視指導を行う必要がある。大麻製

品中 Δ^9 -THCの分析法としては, 国連薬物犯罪事務所 (UNODC) の推奨法や, 分析法の標準化に取り組んでいる国際的な組織である AOAC Internationalが制定した公定分析法等が知られている。しかし, これらの分析法は, 相当量の Δ^9 -THCを含有する乾燥大麻や大麻濃縮物, また液体大麻を分析対象としているため, CBD含有食品等に混在する可能性があるごく微量の Δ^9 -THCの分析法としてそのまま適用することは難しい。そこで, 本研究では, 大麻由来製品 (CBD含有製品) 中に混在する微量の Δ^9 -THC (Δ^9 -THC及び Δ^9 -THCA-Aの総和)について, 仮の残留限度値(本研究では, 飲料0.00001% [100 ng/g], その他の製品0.001% [10 µg/g] を設定)を測定可能な試験法を検討した。

B. 研究方法

①分析法の文献調査及びインターネット等における大麻由来製品流通調査(国立衛研)

大麻由来製品 (CBD 含有製品) 中に混在する Δ^9 -THC の分析法に関する海外公定法, 論文等について文献調査を行い, 本研究において仮の限度値として定めた濃度付近の定量分析を実施している文献における抽出法, 測定法を精査した。一方, インターネット等において実際に流通が認められている大麻由来製品 (CBD 含有製品) の製品形態を調査し, 分析法作成において対象となりうる代表的な形態 3 製品を選択し, 入手した。

②分析法素案の作成(国立衛研)

①で調査した分析法について, Δ^9 -THC の仮の残留限度値付近の測定が可能な抽出法及び分離検出法となりうるか, 国立衛研で予備分析を行い, 問題点について検討を重ね, 分析法案を作成した。なお, 分析用標品として使用した薬物 Δ^9 -THC (1mg/mL メタノール溶液, Cerilliant Corporation 社製), Δ^9 -THCA-A (1 mg/mL アセトニトリル溶液, Cayman Chemicals 社製) については, 定量 NMR 法 ($^1\text{H-qNMR}$ 法) により純度

を別途測定した。定量の結果、 Δ^9 -THC は 93.04～94.75%、 Δ^9 -THCA-A は 95.51～96.82%であった。

③分析法素案における分析法妥当性評価の実施(東京都健康安全研究センター, 大阪健康安全基盤研究所)

②で作成した分析法素案に基づき、東京都健康安全研究センター及び大阪健康安全基盤研究所において、国立衛研から譲渡した薬物、及び薬物を含有しないことが確認されている市販の製品(オイル、グミ、クッキー)、飲料(ペットボトルの水)を使用して分析法妥当性評価を実施し、課題を整理した。分析法妥当性評価では、 Δ^9 -THC および Δ^9 -THCA-A を添加した各試料を用いて、特異性、検出下限値(S/N > 3)および定量下限値(S/N > 10)、検量線の直線性、回収率、真度および精度を調べた。

④分析法の評価(国立衛研, 東京都健康安全研究センター, 大阪健康安全基盤研究所)

分析法妥当性評価が行われた分析法に基づき、国立衛研がインターネットより購入し、各機関に配付した、CBD 含有を標榜する代表的な 3 製品(オイル、グミ、クッキー)及び飲料(CBD ウォーター)について、定量分析を実施した。また、結果をふまえて課題を整理すると共に、最終的な試験法を作成した。

C. 結果

①文献調査及びインターネット等における大麻由来製品流通調査(国立衛研)

大麻由来製品(CBD 含有製品)中に混在する Δ^9 -THC について、本研究において仮の限度値として定めた濃度付近の定量分析を実施している文献を調査した。その結果、多種多様なマトリックスの食品について、油が多い試料、糖分が多い試料、その他の試料の 3 群に分け、抽出手法として食品分野で広く利用されている QuEChERS

法を使用し、LC-MS/MS の MRM モードで測定を実施した論文(Ji Hyun Lee, *et al.*, *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2020; 37(9):1413-1424)を、主となる参考文献として選択した。本文献の記載では、3 タイプすべての試料で Δ^9 -THC の LOD が 0.1 ng/g, LOQ は 0.3 ng/g であった。一方、インターネットにおいて実際に流通が認められている大麻由来製品(CBD 含有製品)の製品を調査した結果、代表となる製品形態として、オイル、グミ、クッキー、飲料(CBD ウォーター)を選択し、実際にインターネットの販売サイトを通じて製品を購入した。また、上記製品と同様の形態で大麻由来化合物を含有しない製品を、一般店舗において購入し、コントロール試料とした。

②分析法素案の作成(国立衛研)

①で選定した主となる参考文献の分析法に従って、オイル、グミ、クッキーのコントロール試料に、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A を添加し分析を行い、分析中における化合物の安定性や、暫定的な回収率を検討した。また、飲料(市販ペットボトルの水)については、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A を添加した試料を、直接膜ろ過して、LC-MS/MS で測定を行った。さらに、参考文献が提示した LC-MS/MS 測定条件において、 Δ^9 -THC と同じ分子量の CBD, Δ^8 -THC, CBL, CBC を含む、計 16 種類の大麻成分の分離を検討した。その結果、下記の問題点が明らかとなった。これらの点を修正し、文献記載分析法に修正を加え、分析法案を設定した。

(1) 文献の分析法では、LC-MS/MS, LC-QTOFMS において、 Δ^9 -THC と同じ精密質量で同じプロダクトイオンを生じる Δ^8 -THC が分離識別できない。

解消法:LC のグラジエント条件を変更し、各大麻成分が分離識別可能な測定条件を設定した。

(2) 参考文献では分析対象とされていなかった Δ^9 -THCA-A のオイル、グミ、クッキーからの回収率が極めて悪い。

解消法: QuEChERS 法により抽出/精製する前に、試料にギ酸を 1%程度加え、pH3~4 とする。なお、抽出液は、24 時間室温で安定であった。

(3) Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A を添加した水試料を、直接膜ろ過して、LC-MS/MS で測定を行ったが、膜への吸着等により、回収率が低く、ピークが検出できなかった。また、色や味が付いている飲料の場合は、膜ろ過だけでは、糖分や着色料等の夾雑物の影響が無視できないと考えられた。

解消法: 飲料についても QuEChERS を用いた抽出/精製過程を検討し、分析法に加えた。

(4) 参考文献では、油分が多い試料、糖分が多い試料、その他の試料の 3 群に分け、それぞれ別の抽出法を設定していたが、油分も糖分も多い試料等、3 群に分けることが難しい試料が想定された。

解消法: 飲料以外の試料は全て、ジクロロメタン、水を加え、よく振り混ぜた後、アセトニトリルを加えて超音波抽出を行うことで対応した。

③分析法素案における分析法妥当性評価の実施(東京都健康安全研究センター、大阪健康安全基盤研究所)

(1) LC-MS/MS による検討(東京都健康安全研究センター)

Δ^9 -THC と Δ^9 -THCA-A の分析には、ウォーターズ社製のタンデム四重極型 LC/MS/MS を用いて、MRM モードで測定した。特異性では、 Δ^9 -THCA-A と同じところに非常に弱いピークが認められたが、仮の製品限度値の 1/1000 未満であり、定量に際して問題ないと判断した。定量下限値は、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A で、それぞれ 0.05 $\mu\text{g/g}$ および 0.01 $\mu\text{g/g}$ (飲料はそれぞれで 1 ng/mL および 0.5 ng/mL) であった。検量線は、1 ~ 50 $\mu\text{g/g}$ (飲料は 10 ~ 500 ng/mL) の範囲で良好な直線性 ($R^2 = 0.997 \sim 0.999$) が得られた。 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A の添加回収率は、それぞれ 104.4 ~ 118.3% および 116.9 ~ 156.4% であった。検討した 3 濃度(低濃度 1 $\mu\text{g/g}$, 中濃度 10

$\mu\text{g/g}$, 高濃度 50 $\mu\text{g/g}$, 飲料はそれぞれ 10, 100, 500 ng/mL) において、真度は Δ^9 -THC および Δ^9 -THCA-A 共に概ね 100% 前後であり、精度は RSD10% 未満であった。これら分析法妥当性評価におけるパラメーターは、比較的良好な結果が得られた。

(2) LC-QTOFMS による検討(大阪健康安全基盤研究所)

分析した 4 種類のコントロール試料を分析法に従って抽出・測定し、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A の保持時間、モニタリングイオンにおいて、すべての試料で試料由来成分の妨害がないことを確認した。

Δ^9 -THC および Δ^9 -THCA-A の定量限界は全ての場合で仮の限度値を下回り、飲料はそれぞれ 2.5 ng/mL および 5 ng/mL , その他の製品では Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A 共に 0.25 $\mu\text{g/g}$ であったが、オイルの Δ^9 -THCA-A については、1 $\mu\text{g/g}$ であった。また検出限界は定量限界の 0.25 ~ 0.5 倍の濃度であり、飲料では Δ^9 -THC および Δ^9 -THCA-A はそれぞれ 1 ng/mL , 2.5 ng/mL であり、その他の製品では両化合物共に 0.1 $\mu\text{g/g}$ (オイルにおける Δ^9 -THCA-A のみ 0.25 $\mu\text{g/g}$) であった。回収率はすべての試料で Δ^9 -THC 95.8 ~ 109.5%, Δ^9 -THCA-A 101.6 ~ 118.8% (分析者 1), Δ^9 -THC 94.8 ~ 106.3%, Δ^9 -THCA-A 103.8% ~ 115.5% (分析者 2) と、概ね良好な結果であった。

検量線(1 ~ 50 $\mu\text{g/g}$, 飲料は 10 ~ 500 ng/mL) の直線性については R^2 値で評価した。 Δ^9 -THC の R^2 値は 0.9933 ~ 0.9984 (分析者 1), 0.9978 ~ 0.9984 (分析者 2) であり 0.999 を下回った。一方、 Δ^9 -THCA-A の R^2 値は、0.9960 ~ 0.9998 (分析者 1), 0.9992 ~ 0.9999 (分析者 2) であり良好な結果であった。直線性の検討では、 Δ^9 -THC において高濃度領域でピークが飽和し、やや検量点が直線から外れているものが確認された。その傾向は R^2 値が 0.9933 と最も低かったオイル試料において顕著であった。オイル試料の検量点のうち、高

濃度領域 2 点 (50, 100 $\mu\text{g/g}$) を LOQ, LOD の確認に用いた低濃度試料 2 点 (0.1, 0.25 $\mu\text{g/g}$) に置き換えたところ R^2 値は 0.9999 となり、直線性は大きく改善された。同じように検量点を置き換えた検量線で R^2 値を確認したところ、グミ試料では 0.9998、クッキー試料では 0.9999 と共に直線性は大きく改善された。飲料では最も高い添加濃度 (500 ng/mL) の試料を (5 ng/mL) に置き換えたところ、0.9969 であった R^2 値は 0.9990 となり、直線性は改善された。

精度 (RSD, %) については、検討した 3 濃度 (低濃度 1 $\mu\text{g/g}$, 中濃度 10 $\mu\text{g/g}$, 高濃度 50 $\mu\text{g/g}$, 飲料はそれぞれ 10, 100, 500 ng/mL) のうち、 Δ^9 -THC および Δ^9 -THCA-A の低濃度試料で数値が大きくなる傾向にあったが、最大でも 6.66% (分析者 1), 6.79% (分析者 2) でと良好な結果であった。真度については Δ^9 -THC の低濃度添加試料で、134.5% (分析者 1), 136.2% (分析者 2) と、120% を超えるものが見られたが、 Δ^9 -THC の中・高濃度および Δ^9 -THCA-A の場合は 93.9% ~ 120.0% (分析者 1), 98.0% ~ 118.6% (分析者 2) と、概ね良好な結果であった。高濃度領域の検量点を低濃度領域に置換した検量線を用いて真度を算出したところ、その直線性範囲に含まれる低濃度 ~ 中濃度領域ではすべての試料で 96.4% ~ 113.4% の範囲であり、良好な結果となった。

なお、QuEChERS キットで処理を行う際、吸水による発熱が認められた。すなわち、ほぼ水分で構成されている飲料を処理する場合、キットに含まれる脱水剤の影響が大きくなる。飲料への添加回収実験 (添加量 100 ng) の際、QuEChERS キットを使用してなるべく速やかに調製した試料溶液と QuEChERS キット処理を省略した試料溶液の分析結果を比較したところ、 Δ^9 -THC の回収率は平均値で 10% 程度低下した。これはキットを用いた場合に溶液中の測定対象成分が濃縮されているためと考えられ、定量値が設定限度値付近となる場合は特に注意が必要である。

④分析法の評価 (国立衛研, 東京都健康安全研究センター, 大阪健康安全基盤研究所)

(1) LC-MS/MS による検討 (東京都健康安全研究センター)

検討した分析法について、国立衛研が配付した市販の実試料 (大麻由来製品, CBD 含有製品) の定量に適用したところ、オイル製品では、 Δ^9 -THC 総量が仮の製品限度値を超える濃度 0.014% であった。グミやクッキー製品においても Δ^9 -THC 総量がそれぞれ 0.0004% 及び 0.0006% で検出されたが、飲料については、 Δ^9 -THC 総量は検出限界未満であった。いずれの製品においても、精度は RSD 10% 未満であった。以上のことから、本分析法は大麻由来製品 (CBD 含有製品) の分析に適用可能であると考えられた。

(2) LC-QTOFMS による検討 (大阪健康安全基盤研究所)

検討した分析法について、国立衛研が配付した市販の実試料 (大麻由来製品, CBD 含有製品) の定量に適用したところ、オイル製品から、 Δ^9 -THC および Δ^9 -THCA-A が検出され、THC 総量としての含有は 0.0141% (分析者 1), 0.0140% (分析者 2) となり、仮の限度値 0.001% を超過していた。グミおよびクッキーからは Δ^9 -THCA-A は検出されず、 Δ^9 -THC のみが検出され、グミは THC 総量として、0.0003% (分析者 1), 0.0003% (分析者 2) であった。クッキーからは、 Δ^9 -THC のピークが確認されたが、同一精密質量 (m/z 315.2319 \pm 10 mDa) の抽出イオンクロマトグラム上に保持時間が近接し、完全分離できないピークが認められたため、正確な定量を実施することができなかった。ただし夾雑ピークを考慮しても限度値 0.001% を超える含有量ではないと考えられた。限度値付近の測定を実施するには、感度面で優れた LC-MS/MS を用いることが好ましいと考えられた。また、飲料試料からは Δ^9 -THC および Δ^9 -THCA-A に該当するピークは検出されなかった。すべての実試料から CBD と思われるピークが

検出されたが、標準品がないため同定はできなかった。以上より、提示した分析法は、今回検討を実施した CBD 含有製品に含まれる恐れのある微量 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A について、総含有量として食品 0.001%、飲料 0.00001%の定量が可能であった。

D. 考察

分析法妥当性評価が行われた分析法を使用し、国立衛研がインターネットより購入し、各機関に配付した代表的な形態の CBD 含有 3 製品(オイル、グミ、クッキー)及び飲料(CBD ウォーター)製品について、2 機関(LC-MS/MS 及び LC-QTOFMS 使用)、3 試験者で、定量分析を実施した。その結果、オイルについては、3 試験者共に THC 総量は同一で 0.014%を示し、グミについても、0.0003~0.0004%程度とほぼ同程度の値を示した。また、飲料については、いずれも、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A は検出限界以下であった。一方、クッキーにおいては、LC-MS/MS 測定では、 Δ^9 -THC 総量として 0.0006%程度検出された。しかし、LC-QTOFMS においては、夾雑ピークを考慮しても限度値 0.001%を超える含有量ではないと考えられたが、 Δ^9 -THC と同一精密質量の抽出イオンクロマトグラム上に保持時間が近接し、完全分離できないピークが認められたため、正確な定量を実施することができなかった。

国内外で流通する大麻由来製品(CBD 含有製品)は、様々な形態が存在し、マトリックスも多種多様である。抽出効率や、質量分析におけるイオン化のマトリックス効果を考慮すると、正確な定量分析を行うためには、分析対象である Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A の重水素標識体を内標準物質として用いる内標準法が望ましいと考えられる。しかし、今回はこれら重水素標識体の輸入購入が研究期間内には不可であったため、本研究においては、絶対検量線法を用いて検討を行った。 Δ^9 -THC は麻薬として規制されており、また、 Δ^9 -THCA-A についても法改正後は麻薬として規

制されることになる。これら標準物質や重水素標識体等は輸入購入が必要であり、費用・手間・時間がかかる。必要な試薬を必要なときに、正規分析機関が入手することが可能となるようにすることが課題のひとつと考える。また、定量にあたり、標準品の純度、保存方法や使用期限等についても考慮する必要があると考える。

E. 結論

本研究では、大麻由来製品(CBD 含有製品)中に混在する微量の Δ^9 -THC (Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A の総和)について、仮の残留限度値(本研究では、飲料 0.00001% [100 ng/g]、その他の製品 0.001% [10 µg/g] を設定)が測定可能な試験法を検討した。その結果、今回分析対象とした薬物添加コントロール試料ならびに実試料(大麻由来製品、CBD 含有製品)においては、本検討で用いた分析条件を用いて、総 Δ^9 -THC 量の限度値として想定した 0.001% (飲料は 0.00001%)を超える含有の有無について判定が可能であると考えられた。

しかし、本検討に供した製品はオイル・グミ・クッキー・飲料のコントロール試料・実試料それぞれ1製品ずつのみであった。その中でも、クッキーの実試料で Δ^9 -THC の妨害となる未知ピークが確認されている。グミ製品ひとつをとっても、ハードグミ、ソフトグミ、糖でコーティングされたグミ等、多種多様なマトリックスを有する製品が存在する。様々な要素によって定量可能な範囲が影響されることを鑑みて、標準添加法で定量分析を行う、使用する分析機器で適宜分析条件の最適化を図る等が必要である。また、今回検討を実施した製品と異なる性状の大麻由来製品にも対応可能な分析法とするには、引き続き慎重な検討が必要と考えられる。今後、実際に各試験機関において製品を分析する際には、令和 6 年 3 月 8 日に厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長通知として発出された「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(健生食基発 0308 第 1 号)等

を参考に、それぞれの製品について、分析法の妥当性を確認する必要があると考えられた。

なお、 Δ^9 -THC をはじめとして大麻関連化合物の標準品は、日本において現時点で入手が困難なものも多く存在している。 Δ^9 -THC、 Δ^9 -THCA-A、また内標準物質として用いることが想定されるそれら化合物の重水素標識体のみならず、異性体や類縁化合物等、十分な種類の標準品を整備しうる環境づくりが望まれる。

本研究で設定した分析法案をもとに、「大麻由来製品に含まれる Δ^9 -THCの標準的な分析法」として別紙に記載した。なお、本研究では、飲料(コントロール試料:水、製品:CBD ウォーター)について、妥当性評価結果、採取量等を mL 単位で記載したが、水試料を用いていたため、標準的な分析法においては、重量単位 g で記載している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

なし

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

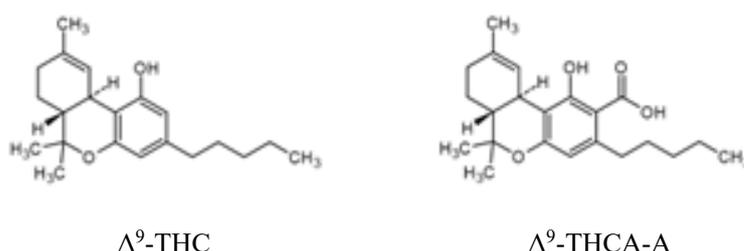
3. その他

なし

大麻由来製品に含まれる Δ^9 -THCの標準的な分析法

大麻草には120種類以上のカンナビノイド成分が報告されており、主カンナビノイドとして、幻覚作用などの中枢作用を有する Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)、また幻覚作用を示さないcannabidiol (CBD)等を含む。 Δ^9 -THCは生の植物体中ではフェノールカルボン酸体 Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A)の状態が存在し、光や熱などによって脱炭酸が起こり活性体である Δ^9 -THCへと変化する。通常、大麻由来製品中の Δ^9 -THCの含有量は、 Δ^9 -THCと Δ^9 -THCA-Aの総和で表す。

【分析対象化合物】



令和5年12月13日に公布された「大麻取締法及び麻薬及び向精神薬取締法の一部を改正する法律」では、これら、CBD含有製品等の安全かつ適切な流通の確保のため、麻薬成分 Δ^9 -THCの残留限度値を設定することとなっており、この限度値に対する適合性を担保しうる大麻由来製品の分析法が必要とされている。

ここでは、大麻由来製品(CBD含有製品)中に混在する微量の Δ^9 -THC(Δ^9 -THC及び Δ^9 -THCA-Aの総和)について、政令で示された残留限度値(飲料0.000010%(0.10 mg/kg)、オイル製品0.0010%(10 mg/kg)、その他の製品0.0001%(1 mg/kg))が測定可能な¹⁾液体クロマトグラフ-三連四重極質量分析計(LC-MS/MS)又は液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計(LC-QTOF MS)を用いた標準的な大麻製品中の Δ^9 -THC分析法を示す^{2),3)}。

1. 試料等

①試料

実際に流通が認められている大麻由来製品の代表的な製品形態として、オイル、グミ、クッキー及び飲料等が挙げられる。オイル及び飲料はそのまま試料とし、固形の食品などは粉砕機⁴⁾を用いて細かく粉砕し、又は細断して試料とする。

②試薬

標準化合物として、 Δ^9 -THC(1 mg/mLメタノール溶液)及び Δ^9 -THCA-A(1 mg/mLアセトニトリル溶液)を使用し、アセトニトリルで適宜希釈する。アセトニトリル及びギ酸は液体クロマトグラフィ用質量分析用、水は超純水、その他の試薬及び溶媒は、いずれも試薬特級品を用いる。

2. 測定試料の調製

各試料 200 mg を 15 mL ポリプロピレン製遠沈管⁵⁾に精密に量り取り、ジクロロメタン 1 mL、水 1 mL を加え、よく振り混ぜた後、アセトニトリル 5 mL 程度を加える。その後、超音波抽出を 30 分間行い、室温に戻した後、ギ酸 100 μ L とアセトニトリルを加えて 10 mL にメスアップする^{6),7)}。その際、pH 試験紙で pH 3 ~4 程度であることを確認する⁸⁾。内容物を新しい 15 mL ポリプロピレン製遠沈管に移し、油分の多い試料は冷凍(-20 $^{\circ}$ C)で 30 分間静置する。5 分間遠心分離(4000 rpm, 5 $^{\circ}$ C)し、上清 5 mL を QuEChERS dSPE チューブ⁹⁾へ入れ、1 分間よく振り混ぜた後、5 分間遠心分離(4000 rpm, 5 $^{\circ}$ C)し、上清を 0.2 μ m フィルター¹⁰⁾で遠心ろ過し、測定試料とする。

なお、飲料の場合には、試料 1 g を 5 mL メスフラスコに精密に量り取り、アセトニトリル約 3 mL 及びギ酸 50 μ L を加え、アセトニトリルで 5 mL にメスアップする。全量を QuEChERS dSPE チューブ へ移し、1 分間よく振り混ぜた後、5 分間遠心分離(4000 rpm, 5 $^{\circ}$ C)し、上清を 0.2 μ m フィルターでろ過し、測定試料とする。

3. 測定^{11), 12)}

測定は LC-MS/MS の多重反応モニタリング Multiple Reaction Monitoring (MRM) 測定、又は LC-QTOF MS を用いた精密質量測定により絶対検量線法で行い¹²⁾、 Δ^9 -THC の含有量は、 Δ^9 -THC と Δ^9 -THCA-A の総量として換算する。

$$\Delta^9\text{-THC 総量(mg/kg)} = \Delta^9\text{-THC 量(mg/kg)} + 0.877 \times \Delta^9\text{-THCA-A 量(mg/kg)}$$

LC 分離条件

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II Column (3 μ m, 2.0 \times 100 mm, 大阪ソーダ)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、サンプルクーラー温度: 25 $^{\circ}$ C

流速: 0.3 mL/min、注入量: 1 μ L (飲料については 5 μ L)

移動相: 0.1%ギ酸(A)、0.1%ギ酸アセトニトリル(B)

95/5-35/65(3 min, 17 min hold)-0/100(25 min, 5 min hold)

MS 測定条件

LC-MS/MS MRM 測定、若しくは LC-QTOFMS 精密質量測定

① LC-MS/MS MRM 測定条件

分析装置: ACQUITY Premier/Xevo TQ Absolute (Waters 社製)

Capillary voltage: 1.0 kV、Source temp.: 150 $^{\circ}$ C、Desolvation temp.: 500 $^{\circ}$ C

N₂ cone gas flow: 150 L/hr、Desolvation gas flow: 1000 L/hr

Collision gas flow: Ar 0.15 mL/min

MRM 測定条件

	測定モード	プレカーサーイオン	プロダクトイオン(定量用)	Cone voltage(V)	Collision voltage (eV)	プロダクトイオン(確認用)	Cone voltage(V)	Collision voltage(eV)
Δ^9 -THC	Positive	m/z 315.1	m/z 193.0	22	24	m/z 259.1	22	18
Δ^9 -THCA-A	Negative	m/z 357.1	m/z 313.2	8	22	m/z 245.1	8	30

② LC-QTOF MS の測定条件

分析装置: 6546 LC/Q-TOF MS system (Agilent Technologies 社製)

Ion source: Dual-AJS ion source、
Ionization: ESI positive mode、
Gas temperature: 325 °C、 Gas: N₂、 Drying Gas: 10 L/min、
Nebulizer: 20 psi、 Sheath Gas Temperature: 400 °C、 Sheath Gas Flow: 12 L/min、
Capillary voltage: 3000 V、 Nozzle Voltage: 600 V、 Fragmentor: 120 V、 Skimmer: 45 V、
Oct 1 RF V_{pp}: 750 V
Δ⁹-THC の定量には m/z 315.2319 ± 10 mDa、Δ⁹-THCA-A の定量には m/z 359.2217 ± 10 mDa
の抽出イオンクロマトグラムを用いた。

【注解】

- 1) 残留限度値の表記はその有効数字を考慮したものとなっている。それぞれ記載された残留限度値の一桁下までの定量性を担保すること。
- 2) 本分析条件において、オイル、グミ、クッキー及び飲料のコントロール試料に標準薬物溶液を添加し、Δ⁹-THC 及び Δ⁹-THCA-A の定量下限値 (S/N > 10) を検討した結果、LC-MS/MS による測定では、飲料は各 0.001 mg/kg 及び 0.0005 mg/kg、その他の製品では各 0.05 mg/kg 及び 0.01 mg/kg であった。また、LC-QTOF MS による測定では、飲料は各 0.0025 mg/kg 及び 0.005 mg/kg、その他の製品では Δ⁹-THC 及び Δ⁹-THCA-A 共に 0.25 mg/kg であったが、オイルの Δ⁹-THCA-A については、1 mg/kg であった。限度値付近の測定を実施するには、感度面で優れた LC-MS/MS を用いることが好ましい。
- 3) 本分析法を用いて、オイル、グミ、クッキー及び飲料の実試料各 1 製品 (CBD 含有を表示してインターネット上で流通していた製品の試買品) を分析した結果、総 Δ⁹-THC 量の限度値を超える含有の有無についての判定は可能であると考えられた。しかし、試料の種類および装置構成によってはマトリックスと定量成分のピークが重なる事例が確認されており、判定が困難な場合にはピークが完全分離する LC 測定条件を検討するなど定量に際して細心の注意が求められる。
- 4) IKA ジャパン社製 Tube Mill 100 control 等
- 5) Labcon 社製 型番 3131-345 又は WATSON 社製 型番 1332-0158 等
- 6) ギ酸は全体試料の 1% 程度の濃度を加える。ギ酸を加えない、又はギ酸を 0.1% 程度しか加えないと Δ⁹-THCA-A の回収率は極端に低下する。
- 7) チューブをアセトニトリルで洗いながら、内容物をメスフラスコに移してメスアップする。クッキー及びグミの場合には、本分析法の抽出溶媒に溶解しないものが一部残存するが、定容時に抽出溶媒に溶解しない残留物のメスフラスコへの移行量は、定量値にほとんど影響しないことが示されている。
- 8) ギ酸添加時に、局所的に pH3 以下にならないように攪拌しながら少しずつ添加する。pH3 以下となると目的成分の分解が認められる。なお、測定試料について、24 時間室温にて保管し、安定性を確認した結果、CBD から THC への変換、また Δ⁹-THCA-A から Δ⁹-THC への分解は認められなかった。
- 9) Thermo Fisher Scientific 社製 型番 S2-15-GFV-EN-KIT 等
(QuEChERS EN 15662 Method Clean-up Kit; 900 mg MgSO₄, 150 mg PSA pre-filled in 15 mL Tube)
- 10) ナカライテスク社コスモスピンフィルター G, PTFE, 0.2 μm, 型番 06549-44、又はメルク社 Ultrafree-MC, PTFE, 0.2 μm, 型番 UFC30LG25) 等
- 11) 本分離条件における Δ⁹-THC、Δ⁹-THCA-A 及び Δ⁹-THC と同じ分子量を有する代表的な大麻由来成分 Δ⁸-THC、CBD、Cannabicyclol (CBL)、Cannabichromene (CBC)、Δ⁹-THCA-A と同じ分子量を有

する Cannabidiolic acid (CBDA) の各保持時間は下記の通りである。

(測定機器: TripleTOF 6600 LC/MS/MS system (AB SCIEX 社製) / Nexera X2 system (Shimadzu 社製))

	CBDA	CBD	Δ^9 -THC	Δ^8 -THC	CBL	CBC	Δ^9 -THCA-A
保持時間(分)	8.6	9.4	15.5	16.3	18.1	20.1	21.2

- 12) 大麻製品は多種多様な形態で販売されており、今回分析に用いたオイル、グミ、クッキー並びに飲料の他、チョコレート及び飴など、さまざまなマトリックスを有する製品が存在する。製品によって、今回提示した製品の調製法において回収率が異なったり、クロマトグラム上、目的成分のピークを妨害するピークが検出されたりするおそれがある。また、質量分析においてマトリックス効果が強く現れる製品も存在することが予想される。様々な要素によって分析結果が影響されることを鑑み、標準添加法で定量分析を行う、使用する分析機器で適宜分析条件の最適化を図る等の検討が必要である。また、測定において、限度値付近の Δ^9 -THC が検出された場合には、例えば「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(令和 6 年 3 月 8 日付け厚生食基発 0308 第1号厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査管理課長通知)等を参考に、それぞれの製品について、分析法の妥当性を確認する必要があると考えられる。
- 13) 本分析法は絶対検量線法で定量を行っているが、標品が入手可能である場合、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A の重水素標識体を内標準物質として使用する内標準法で行うことにより、より精度が高い定量分析が可能となる。

なお、ここに示した方法と同等以上の検出感度及び精度を有する場合は、代替法の適用も可能である。

分析法案の策定及び分析法の妥当性評価

研究分担者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長

大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法案の検討及び策定

研究要旨:大麻由来製品(CBD含有製品)中に混在する微量の Δ^9 -THC(Δ^9 -THC及び植物体中に存在する Δ^9 -THCのフェノールカルボン酸体tetrahydrocannabinolic acid, Δ^9 -THCA-Aの総和)について、仮に設定した Δ^9 -THC残留限度値(飲料中0.00001% (100 ng/g), その他の製品0.001%(10 µg/g))が測定可能な分析法の検討を行った。はじめに、文献調査により各国・機関の分析法を調査し、文献調査結果を基に分析法素案を作成した。作成した素案に基づき、分析対象以外の大麻成分との分離の確認及び添加回収試験等を行い、修正案(分析法案)を作成した。研究分担者に標準試料・標準溶液を作成・交付し、分析法案に対して分析法妥当性評価を実施した。また、インターネットで流通している大麻由来製品を試買し研究分担者に送付し、分析法案を用いて定量試験を実施した。その結果、今回分析対象とした薬物添加コントロール試料ならびに実試料においては、本研究で設定した分析法案を用いて、総 Δ^9 -THC量の限度値として想定した0.001 % (飲料0.00001%)を超える含有の有無についての判定が可能であると考えられた。

研究協力者

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
水谷佐久美 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

A. 研究目的

現在、世界で最も多くの人に乱用されている薬物は大麻やその製品であり、その乱用は世界的規模で広がりを見せている。日本においても、大麻事犯の検挙人員は2017年以降2023年まで6年間連続で過去最高を記録しており、2023年には覚醒剤を上回り薬物事犯で最多となった。一方、大麻をめぐるのは、近年、産業用途、医療用途、そして嗜好用途の使用について、諸外国で様々な議論がおきている。2023年時点では、日本では医薬品として的大麻草及び大麻抽出物の使用は認められていないが、大麻抽出物が医薬品として使用されている国も多く存在する。特に、主要なカンナビノイド成分のひとつであるCannabidiol

(CBD)は、諸外国で難治性小児てんかん薬など、医薬品としての活用が進んでいる。また、CBDを含む様々な製品群が合法的に販売され、市場規模が世界的に拡大している。厚生労働省は、大麻をめぐる状況の変化を鑑みて、2023年10月に、大麻取締法及び麻薬及び向精神薬取締法の一部を改正する法案を国会に提出した。改正法案では、医薬品の施用規制の見直しによる医療ニーズへの対応、大麻使用罪の設定、部位規制から成分規制へと原則を変更するとともに、安全かつ適切な製品流通の確保のための麻薬成分 Δ^9 -THCの残留限度値の設定、そして大麻草の栽培及び管理の規制の見直しが見直しが示された。改正後は、大麻由来成分を含む医薬品の国内での使用が可能となり、大麻取締法下での規制にあった大麻由来成分 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)が麻薬として位置付けられ、麻薬取締法下での規制となる。一方、現行の大麻取締法には使用罪は

ないが、改正後は Δ^9 -THCを含有する大麻及びその製品の使用について麻薬取締法違反となる。また、大麻取締法は、栽培に関する内容に特化し「大麻草の栽培の規制に関する法律」となる。本改正法案は2023年12月に国会で可決、12月13日に公布され、1年以内に施行予定となっている。

法改正の方向性のひとつとして、CBD含有食品等の大麻由来製品の安全かつ適切な流通の確保のため、麻薬成分 Δ^9 -THCの残留限度値を設定(製造販売者が限度値適合性を担保)し、買い上げ調査等を含めた行政による監視指導を行う必要があることが示されている。大麻製品中の主活性成分 Δ^9 -THCの分析法としては、国連薬物犯罪事務所(UNODC)の推奨法や、分析法の標準化に取り組んでいる国際的な組織であるAOAC Internationalが制定した公定分析法等が知られている。しかし、これらの分析法は、相当量の Δ^9 -THCを含有する乾燥大麻や大麻濃縮物、また液体大麻を分析対象としているため、CBD含有食品等に混在する可能性があるごく微量の Δ^9 -THCの分析法としてそのまま適用することは難しい。そこで、本研究では、大麻由来製品(CBD含有製品)中に混在する微量の Δ^9 -THC(Δ^9 -THC及び植物体中に存在する Δ^9 -THCのフェノールカルボン酸体tetrahydrocannabinolic acid, Δ^9 -THCA-Aの総和)について、将来的に設定されうる残留限度値が測定可能な試験法を策定することを目的とした。仮の Δ^9 -THC残留限度値として、本研究では、飲料中0.00001% (100 ng/g)、その他の製品0.001%(10 μ g/g)と設定して検討を行った。

研究内容としては、①文献調査による各国・機関の分析法の調査、②文献調査結果を基に分析法素案の作成し、作成した素案に基づき添加回収試験等を行い、修正案を作成、修正案に対して研究分担者において分分析法妥当性評価を実施するための標準試料・標準溶液を作成し交付、③インターネットで流通している大麻由来製品を試買し、研究分担者(東京都健康安全研究センター及び大阪健康安全基盤研究所)に送付、④最

終試験法の策定を行うこととした。

B. 研究方法

1. 試薬

標準化合物として、 Δ^9 -THC(1 mg/mL メタノール溶液, Cerilliant Corporation 社製)および Δ^9 -THCA-A(1 mg/mL アセトニトリル溶液, Cayman Chemicals 社製)を使用し、アセトニトリルで適宜希釈して実験に用いた。アセトニトリルおよびギ酸はLC-MS用、水は超純水、その他の試薬および溶媒は、いずれも試薬特級品を用いた。なお、 Δ^9 -THC及 Δ^9 -THCA-Aは、定量NMR法(1 H-qNMR法)により純度を別途測定したものを使用した(Δ^9 -THC 93.04~94.75%、 Δ^9 -THCA-A 95.51~96.82%)¹⁾。

また、 Δ^9 -THCと Δ^9 -THCA-Aとともに、その他大麻成分との分離を検討するために下記の14化合物を使用した。Cannabidivarin (CBDV), Cannabigerolic acid (CBGA), Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD), Cannabicyclol (CBL), Cannabinol (CBN)はCerilliant Corporation社より、Cannabidibutol (CBDB), Cannabidiolic acid (CBDA), Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV), Δ^9 -Tetrahydrocannabibutol (Δ^9 -THCB), Cannabidiphorol (CBDP), Cannabichromene (CBC), Δ^9 -Tetrahydrocannabiphorol (Δ^9 -THCP)。これら化合物はCayman Chemicals社より入手した。また Δ^8 -THCは過去に国立衛研で合成したものを使用した。16成分の構造を図1に記載した。

試料を量り取るポリプロピレン製遠沈管はLabcon社製(型番3131-345)を、試料の抽出/精製に用いたQuEChERS dSPEチューブはThermo Fisher Scientific社製(型番S2-15-GFV-EN-KIT, QuEChERS EN 15662 Method Clean-up Kit; 900 mg MgSO₄, 150 mg PSA pre-filled in 15 mL Tube)を、測定試料調製に用いたフィルターはメルク社製Ultrafree-MC, PTFE, 0.2 μ m(型番UFC30LG25)を使用した。

2. 測定試料の調製(最終案)

オイルはそのまま、もしくはカプセル状のものはカプセルから内容物を取り出し、クッキーは粉碎機を用いて細かく粉碎し、グミはハサミで細断して試料とした。

各試料 200 mg を 15 mL ポリプロピレン製遠沈管に精密に量り取り、ジクロロメタン 1 mL、水 1 mL を加え、よく振り混ぜた後、アセトニトリル 5 mL 程度を加えた。その後、超音波抽出を 30 分間行い、室温に戻した後、ギ酸 100 μ L とアセトニトリルを加えて 10 mL にメスアップした。その際、pH 試験紙で pH 3~4 程度であることを確認した。内容物を新しい 15 mL ポリプロピレン製遠沈管に移し、油分の多い試料は冷凍 (-20°C) で 30 分間静置した。5 分間遠心分離 (4000 rpm, 5°C) し、上清 5 mL を QuEChERS dSPE チューブへ入れ、1 分間よく振り混ぜた後、5 分間遠心分離 (4000 rpm, 5°C) し、上清を 0.2 μ m フィルターで遠心ろ過し、測定試料とした。

飲料の場合には、試料 1 mL を 5 mL メスフラスコに精密に量り取り、アセトニトリル約 3 mL およびギ酸 50 μ L を加え、アセトニトリルで 5 mL にメスアップした。全量を QuEChERS dSPE チューブへ移し、1 分間よく振り混ぜた後、5 分間遠心分離 (4000 rpm, 5°C) し、上清を 0.2 μ m フィルターでろ過し、測定試料とした。

3. 測定条件(最終案)

1) LC-MS/MS

装置:UPLC/Xevo-TQSmicro (Waters 社製)

LC 条件

カラム:CAPCELL PAK C18 MG II Column (3 μ m, 2.0 \times 100 mm, 大阪ソーダ)

カラム温度:40°C, サンプルクーラー温度:25°C

流速:0.3mL/min, 注入量:1 μ L

(飲料については 5 μ L)

移動相:0.1%ギ酸(A), 0.1%ギ酸アセトニトリル(B)

(A)/(B) 95/5-35/65(3 min,17 min hold)-0/100

(25 min, 5 min hold)

質量分析条件

Capillary voltage: 2.5 kV, Source temp.: 150°C,
Desolvation temp.: 400°C,

N₂ Cone gas flow: 50 L/hr, Desolvation gas flow:
800 L/hr, Collision gas flow: Ar 0.15 mL/min,
MRM 条件, MRM1 :6-20 min, ESI⁺, THC, CBD
検出用,

MRM2:20-25 min, ESI, THCA 検出用

Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-A 及び Δ^9 -THC と同一の組成式(分子量)を有する Δ^8 -THC, CBD, CBC, CBL について, MRM 測定条件を表 1 に記載した。

2) LC-QTOF MS

装置:TripleTOF® 6600 LC/MS/MS system (AB SCIEX, MA, USA)/ [UPLC] Nexera X2 system (Shimadzu, Kyoto, Japan)

LC 条件

LC-MS/MS に同じ

質量分析条件

イオン化:エレクトロスプレーイオン化 (ESI),
positive mode

Source temperature: 550°C, Gas: N₂

Ion source gas 1 :50 psi; Ion source gas 2 :50 psi

Curtain gas :25 psi

Ion spray voltage: 5500 V

Declustering potential: 80 V

Collision Energy: 10V

Mass spectral range: m/z 100–650

LC-QTOF MS における Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A 及び関連大麻成分 16 化合物の測定条件を表 2 に示した。

3. 検討方法

①分析法の文献調査

大麻由来製品 (CBD 含有製品) 中に混在する Δ^9 -THC の分析法に関する海外公定法, 論文等について文献調査を行い, 本研究において仮の限度値として定めた濃度付近の定量分析を実施している文献における抽出法, 測定法を精査した。文献調査は, 化合物情報の検索ツールとして

SciFinder を用い、PubMed および Google Scholar も併用して検索を行なった。

②分析法案の作成

①で調査した分析法について、 Δ^9 -THC の仮の残留限度値付近が測定可能な抽出法及び分離検出法となりうるか、国立衛研で、LC-MS/MS もしくは LC-QTOFMS 測定時における分析対象成分と他の大麻成分との分離識別(特に Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A と同じ分子量を有する化合物)、製品試料調製時における分析対象化合物の回収率と安定性について検討を重ね、分析法案を作成した。また、作成した分析法案に基づき、研究分担者所属機関である東京都健康安全研究センター及び大阪健康安全基盤研究所において、国立衛研から Δ^9 -THC (1 mg/mL メタノール溶液, Cerilliant Corporation 社製), Δ^9 -THCA-A (1 mg/mL アセトニトリル溶液, Cayman Chemicals 社製)を正式に譲渡するとともに、薬物を含有しないことが確認されている市販の製品(オイル, グミ, クッキー), 飲料(ペットボトルの水)について分析法バリデーションを実施するための標準試料として配付した。配付した製品は下記の通りである。

1. オイル:食用オリーブオイル 100%
(J-オイルミルズ)
2. グミ:水グミ みかん味(味覚糖)3.2g/個
3. クッキー:ソルティーバタークッキー 3.3g/個
(ブルボン)
4. 飲料:超純水・蒸留水

③分析法の評価と標準的な分析法の策定

分析法妥当性評価が行われた分析法に基づき、実試料において定量分析を実施するために、インターネットより購入した、CBD 含有を表示する代表的な 3 製品(オイル, グミ, クッキー)及び飲料(CBD ウォーター)を研究分担者所属機関である東京都健康安全研究センター及び大阪健康安全基盤研究所に配付した。配付した製品は下記の

通りである。また、定量結果をふまえて課題を整理すると共に、最終的な分析法を策定した。

1. オイル:Retreat capsule Hemp oil CBD
(カプセル入黄褐色オイル)
250mg/1 カプセル, 60 入
2. グミ: CBD GUMMIES mixed berry flavor
(表面が固い赤色グミ), 4.4g/個, 8 入
3. クッキー:It's me CBD cookie
(茶褐色, 不均一な粒あり)
9.7g/個, 7 入
4. 飲料:CANOVY WATER(無色透明)
CBD ウォーター
500 mL 入りペットボトル

C. 結果

①分析法の文献調査

大麻由来製品(CBD 含有製品)中に混在する Δ^9 -THC について、本研究において仮の限度値として定めた濃度付近の定量分析を実施している文献を調査した。その結果、候補として 5 論文が抽出された²⁾⁶⁾。その中でも、多種多様なマトリックスの食品について、油分が多い試料、糖分が多い試料、その他の試料の 3 群に分け、抽出手法として食品分野で広く利用されている QuEChERS 法を使用し、LC-MS/MS の MRM モードで測定を実施した論文²⁾を、主となる参考文献として選択した。本文献に記載されている分析法を下記に示した。文献の測定では、3 タイプすべての試料で Δ^9 -THC の LOD が 0.1 ng/g, LOQ は 0.3 ng/g であった。ただし、本文献では、分析対象は CBD と Δ^9 -THC のみであり、 Δ^9 -THCA-A の測定は検討していなかった。

<文献²⁾記載の分析法>

試料

Type I:脂質が多い製品(チョコレート, エナジーバー, オイル等)

Type II:糖分が多い製品(キャンディ, ゼリー, グミ等)

Type III:その他の製品(スナック菓子, シリアル等)

試料調製法

オイルと粉末を除くすべてのサンプルを-20°Cで凍結し、25,000 rpm で粉砕してホモジナイズ (IKA Tube-mill, ドイツ)した。

A) Type I の試料の調製法

試料 1 g にジクロロメタン 5 mL を加え、さらにアセトニトリルを加える。その後、超音波抽出を 30 分間行い、アセトニトリルを加えて 50 mL にメスアップし、冷凍 (-20°C) で 30 分間静置する。試料を 5 分間遠心分離 (4000 rpm, 4°C) し、上清 5 mL を 15 mL QuEChERS チューブへ入れよく振り混ぜた後、5 分間遠心分離 (4000 rpm, 4°C) し、上清を 0.2 μm PTFE フィルターで遠心ろ過し、測定試料とする。

B) Type II 及び Type III の試料の調製法

試料 1 g に蒸留水 5 mL を加え、さらにアセトニトリルを加える。その後、超音波抽出を 30 分間行い、アセトニトリルを加えて 50 mL にメスアップする。試料を 5 分間遠心分離 (4000 rpm, 4°C) し、上清 5 mL を 15 mL QuEChERS チューブへ入れよく振り混ぜた後、5 分間遠心分離 (4000 rpm, 4°C) し、上清を 0.2 μm PTFE フィルターで遠心ろ過し、測定試料とする。

測定条件

LC-MS/MS

装置: NASCA2 LC システム (Osaka Soda, Tokyo, Japan) / API 4500 QTRAP 四重極 MS システム (AB Sciex, Framingham, MA, USA)

LC 条件

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II Column
(3 μm, 2.0 × 100 mm)

カラム温度: 30°C, サンプルクーラー温度: 25°C

流速: 0.2 mL/min, 注入量: 1 μL

移動相: 0.1% ギ酸 (A), アセトニトリル (B)

(A)/(B) 95/5 (2 min hold)-5/100 (5 min, 9 min hold)-95/5 (15 min, 3 min hold)

質量分析条件

ESI, positive mode, MRM 測定

Curtain gas 及び collision gas: N₂

Curtain gas pressure: 30 psi

Collision gas pressure: 9 psi

Ion voltage: 5500 V

Source temperature: 500°C

Pressures of the gas sources 1: 55 psi 2: 60 psi

② 分析法素案の作成

文献²⁾が提示している LC-MS/MS 測定条件について、 Δ^9 -THC と同じ分子量の CBD, Δ^8 -THC, CBL, CBC を含む、計 16 種類の大麻成分の分離を検討した。また、参考文献の分析法に従って、オイル、グミ、クッキーのコントロール試料に、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A を添加し分析を行い、分析中における化合物の安定性や、暫定的な回収率を検討した。さらに、飲料のコントロール試料 (超純水) において、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A を添加した試料を、直接膜ろ過して、LC-MS/MS で測定を行った。その結果、下記の問題点が明らかとなった。

(1) 選択した文献の分析法では、LC-MS/MS, LC-QTOF MS において、 Δ^9 -THC と同じ精密質量で同じプロダクトイオンを生じる Δ^8 -THC が分離識別できなかった。そこで、LC のグラジエント条件を変更し、代表的な大麻 16 成分が分離識別可能な測定条件を設定した。16 成分の LC-QTOFMS の抽出イオンクロマトグラムを図 2 に示した。16 成分のうち、 Δ^9 -THC と Δ^8 -THC, CBD, CBL, CBC は同じ分子量 314.46 を有する。また、 Δ^9 -THCA-A と CBDA も同じ分子量 358.47 を有する。これら異性体についても、設定した測定条件で十分な分離識別が可能であった。

(2) 選択した参考文献の分析法では、分析対象とされていなかった Δ^9 -THCA-A のオイル、グミ、クッキーからの回収率が数%程度と、極めて低い結果となった。そこで、QuEChERS 法により抽出/精製する前に、試料にギ酸を 1% 程度加え、pH3~4 としたところ、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A の両化合物共に回収率はほぼ 100% となった。なお、ギ酸 0.1% の添加では、回収率の改善は認められなかった。1% となるようにギ酸を加えても、測定試料に

については、24 時間室温で安定であり、CBD から THC の生成、また Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A の分解は認められなかった。

(3) Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A を添加した水試料を、直接膜ろ過して、LC-MS/MS で測定を行ったが、膜への吸着等により、回収率が極めて低く、ピークが検出できなかった。また、色や味が付いている飲料の場合は、膜ろ過だけでは、糖分や着色料等の夾雑物の影響が無視できないと考えられた。そこで、飲料についても QuEChERS を用いた抽出/精製過程を入れ、最終的に 100% 付近の回収率を得ることが可能であった。

(4) 参考文献では、油分が多い試料、糖分が多い試料、その他の試料の 3 群に分け、それぞれ別の抽出法を設定していたが、油分も糖分も多いチョコレートやクッキー等 3 群に分けることが難しい試料が想定された。そこで、過去の文献⁷⁾を参考に、飲料以外のすべての試料に適用可能な抽出/精製法を検討した結果、ジクロロメタン、水を加え、よく振り混ぜた後、アセトニトリルを加えて超音波抽出を行うことで対応可能であった。

これらの結果をもとに、2. 研究方法の項に記載の、測定試料の調製(最終案)及び測定条件(最終案)を設定し、分析法案とした。

③分析法の評価と大麻製品の標準的な分析法の策定

作成した分析法案に基づき、研究分担者の所属機関である東京都健康安全研究センター及び大阪健康安全基盤研究所において、分析対象化合物及び薬物を含有しないことが確認されている市販の製品(オイル、グミ、クッキー)、飲料(蒸留水)を用いて分析法妥当性評価を実施した⁸⁾⁻¹⁰⁾。

東京都健康安全研究センターにおいては、タンドム四重極型 LC/MS/MS の MRM モードで検討した。その結果、特異性、定量下限値(Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A で、それぞれ 0.05 $\mu\text{g/g}$ および 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、飲料はそれぞれで 1 ng/mL および 0.5 ng/mL)、直線性、添加回収率、検討した 3 濃度

(低濃度 1 $\mu\text{g/g}$ 、中濃度 10 $\mu\text{g/g}$ 、高濃度 50 $\mu\text{g/g}$ 、飲料はそれぞれ 10, 100, 500 ng/mL)における真度及び精度について、比較的良好な結果が得られた。また、大阪健康安全基盤研究所において、LC-QTOFMS を用いた測定で評価した結果においても、特異性、定量下限値(Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A 共に 0.25 $\mu\text{g/g}$ 、オイルの Δ^9 -THCA-A については 1 $\mu\text{g/g}$ 、飲料ではそれぞれ 2.5 ng/mL および 5 ng/mL)、直線性、添加回収率、検討した 3 濃度における真度及び精度について、特に高濃度領域の検量点を低濃度領域に置換した検量線を用いて評価を行った場合、良好な結果が得られた。

そこで、次に、分析法妥当性評価が行われた分析法を使用して、国立衛研がインターネットより購入し、各機関に配付した代表的な形態の CBD 含有 3 製品(オイル、グミ、クッキー)及び飲料(CBD ウォーター)製品について、2 機関(LC-MS/MS 及び LC-QTOF MS 使用)、3 試験者で、定量分析を実施した。その結果、オイルについては、3 試験者共に THC 総量は同一で 0.014% を示し、グミについても、0.0003~0.0004% 程度とほぼ同程度の値を示した。また、飲料については、いずれも、 Δ^9 -THC 及び Δ^9 -THCA-A は検出限界以下であった。一方、クッキーにおいては、LC-MS/MS 測定では、 Δ^9 -THC 総量として 0.0006% 程度検出された。しかし、LC-QTOFMS による測定では、クッキーから、 Δ^9 -THC のピークが確認されたが、同一精密質量(m/z 315.2319 \pm 10 mDa)の抽出イオンクロマトグラム上に保持時間が近接し、完全分離できないピークが認められたため、正確な定量を実施することができなかった。ただし夾雑ピークを考慮しても限度値 0.001% を超える含有量ではないと考えられた。

以上の結果より、今回分析対象とした薬物添加コントロール試料ならびに実試料(大麻由来製品、CBD 含有製品)においては、本検討で設定した分析法案を用いて、総 Δ^9 -THC 量の限度値として想定した 0.001% (飲料は 0.00001%) を超える含

有の有無について判定が可能であると考えられた。

D. 考察

国内外で流通する大麻由来製品(CBD含有製品等)は、様々な形態が存在し、マトリックスも多種多様である。抽出効率や、質量分析におけるイオン化のマトリックス効果を考慮すると、正確な定量分析を行うためには、分析対象である Δ^9 -THC及び Δ^9 -THCA-Aの重水素標識体を内標準物質として用いる内標準法が望ましいと考えられる。しかし、今回はこれら重水素標識体の輸入購入が研究期間内に不可であったため、本研究班においては、絶対検量線法を用いて検討を行った。 Δ^9 -THCは麻薬として規制されており、また、 Δ^9 -THCA-Aについても法改正後は麻薬として規制されることになる。これら標準物質や重水素標識体等は輸入購入が必要であり、費用・手間・時間がかかる。必要な試薬を必要なときに、正規分析機関が入手することが可能となるようにすることが課題のひとつと考える。また、定量にあたり、標準品の純度、保存方法や使用期限等についても考慮する必要があると考える。

本検討に供した製品はオイル・グミ・クッキー・飲料のコントロール試料・実試料それぞれ1製品ずつのみであった。その中でも、クッキーの実試料で Δ^9 -THCの妨害となる未知ピークが確認されている。グミ製品ひとつをとっても、ハードグミ、ソフトグミ、糖でコーティングされたグミ等、多種多様なマトリックスを有する製品が存在する。様々な要素によって定量可能な範囲が影響されることを鑑みて、標準添加法で定量分析を行う、使用する分析機器で適宜分析条件の最適化を図る等の検討が必要である。また、今回検討を実施した製品と異なる性状のCBD含有製品にも対応可能な分析法とするには、引き続き慎重な検討が必要と考えられる。また、測定において、限度地付近の Δ^9 -THCが検出された場合には、「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(厚生

労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長通知、健生食基発 0308 第1号)等を参考に、それぞれの製品について、分析法の妥当性を確認する必要もあると考えられた。

E. 結論

本研究では、大麻由来製品(CBD含有製品等)中に混在する微量の Δ^9 -THC(Δ^9 -THC及び Δ^9 -THCA-Aの総和)について、仮の残留限度値(本研究では、飲料0.00001% [100 ng/g]、その他の製品0.001% [10 µg/g]を設定)が測定可能な試験法を検討した。その結果、今回分析対象とした薬物添加コントロール試料ならびに実試料(大麻由来製品、CBD含有製品)においては、本検討で設定した分析法案を用いて、総 Δ^9 -THC量の限度値として想定した0.001% (飲料は0.00001%)を超える含有の有無について判定が可能であると考えられた。

F. 参考文献

1. 厚生労働行政推進調査事業費(厚生労働科学特別研究事業)「大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THCの試験法策定に資する研究」令和5年度研究分担報告「大麻草由来カンナビノイド試薬のNMRを用いた純度測定」(田中理恵)
2. Ji Hyun Lee, *et al.*, Development and validation of LC-MS/MS method with QuEChERS clean-up for detecting cannabinoids in foods and dietary supplements *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2020; 37(9):1413-1424.
3. Nicolas Christinat, *et al.*, Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. *Food Chemistry*, 318, 126469 (2020).
4. Ilaria Di Marco Pisciotano, *et al.*, A survey of Δ^9 -THC and relevant cannabinoids in products from the Italian market: A study by LC-MS/MS of food, beverages and feed. *Food*

Chemistry, 346, 128898 (2021).

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 5. Qingfang Meng, <i>et al.</i> , A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products. <i>PLoS ONE</i> , 13(5), e0196396 (2018). | H. 研究発表
学会発表
なし
論文発表
なし |
| 6. 城克巳 他, QuEChERS 法及び水素炎イオン化検出ガスクロマトグラフィーを用いる食品中 Δ^9 -THC の定量試験法の検討. <i>法科学技術</i> , 27(1), 15-16 (2022). | I. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし |
| 7. Guozhu Liu, <i>et al.</i> , Development of an improved method to extract pesticide residues in foods using acetonitrile with magnesium sulfate and chloroform. <i>J. Chromatogr. A</i> , 1218, 1429–1436 (2011). | 2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし |
| 8. 厚生労働行政推進調査事業費(厚生労働科学特別研究事業)「大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の試験法策定に資する研究」令和 5 年度研究分担報告「LC-MS/MS による大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法妥当性評価と実試料の測定」(鈴木俊也) | |
| 9. 厚生労働行政推進調査事業費(厚生労働科学特別研究事業)「大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の試験法策定に資する研究」令和 5 年度研究分担報告「LC-QTOF MS による大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法妥当性評価と実試料の測定 1」(土井崇広) | |
| 10. 厚生労働行政推進調査事業費(厚生労働科学特別研究事業)「大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の試験法策定に資する研究」令和 5 年度研究分担報告「LC-QTOF MS による大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の分析法妥当性評価と実試料の測定 2」(浅田安紀子) | |
| G. 健康危険情報
なし | |

表1 LC-MS/MS における Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A 及び Δ^9 -THC と同一の組成式(分子量)を有する Δ^8 -THC, CBD, CBC, CBL の MRM 測定条件

		Rt (min)	定量用				確認用		
			Q1	Q3	Cone voltage(V)	Collision voltage(eV)	Q3	Cone voltage(V)	Collision voltage(eV)
Δ^9 -THC	pos	15.7	315.2	193.0	30	30	259.0	30	30
Δ^9 -THCA-A	neg	21.8	357.2	313.2	12	30	245.1	12	22
Δ^8 -THC	pos	16.5	315.2	193.0	30	30	259.0	30	30
CBD	pos	9.50	315.2	193.0	30	30	259.0	30	15
CBL	pos	18.4	315.2	81.1	30	30	235.1	30	15
CBC	pos	20.4	315.2	81.1	30	30	193.1	30	30

表2 LC-QTOF MS における Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A 及び関連大麻成分 16 化合物の測定条件

	[M+H] ⁺	組成式	Rt.	モニターイオン±10mDa	
				TOFMS-1st	TOFMS-2nd
CBDV	287.2006	C19H26O2	6.75	287.2006	
THCV	287.2006	C19H26O2	9.49	287.2006	
CBDB	301.2162	C20H28O2	7.93	301.2162	
Δ^9 -THCB	301.2162	C20H28O2	12.13	301.2162	
CBN	311.2006	C21H26O2	13.17	311.2006	
CBD	315.2319	C21H30O2	9.68	315.2319	
Δ^9 -THC	315.2319	C21H30O2	16.01	315.2319	
Δ^8 -THC	315.2319	C21H30O2	16.79	315.2319	
CBL	315.2319	C21H30O2	18.75	315.2319	
CBC	315.2319	C21H30O2	20.81	315.2319	
CBG	317.2475	C21H32O2	9.53	317.2475	193.1222
CBDP	343.2632	C23H34O2	16.24	343.2632	
Δ^9 -THCP	343.2632	C23H34O2	24.22	343.2632	
CBDA	359.2217	C22H30O4	8.83	341.2110	359.2217
Δ^9 -THCA-A	359.2217	C22H30O4	21.90	341.2112	359.2217
CBGA	361.2373	C22H32O4	9.56	343.2268	361.2373

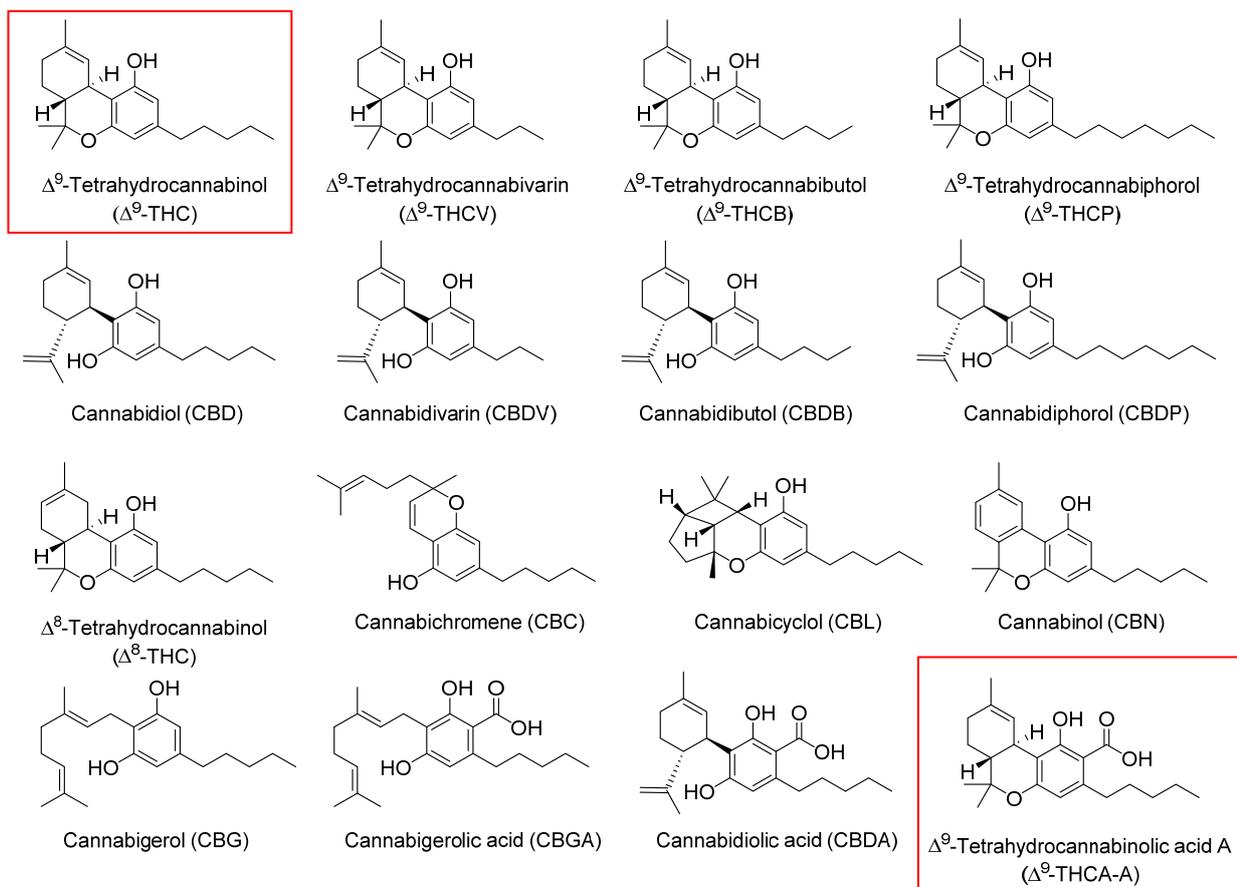


図1 分離識別を検討した Δ⁹-THC, Δ⁹-THCA-A 及び関連大麻成分 16 化合物の構造

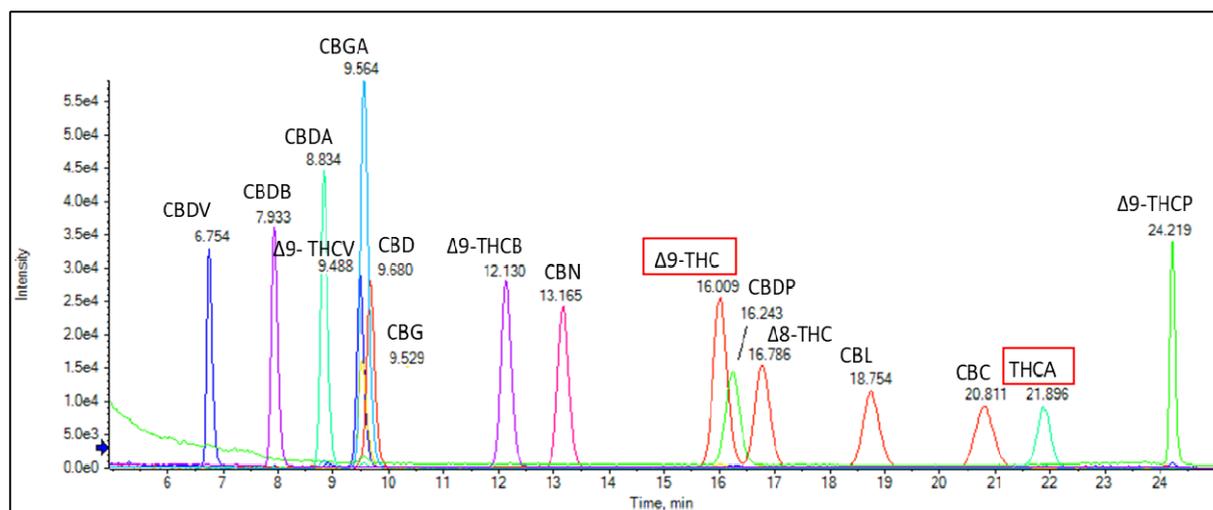


図2 分離識別を検討した Δ⁹-THC, Δ⁹-THCA-A 及び関連大麻成分 16 化合物の LC-QTOF MS イオンクロマトグラム (各化合物のモニターイオン ±10 mDa でのマスクロマトグラムの重ね書き)

分担研究課題:分析法案の策定及び定量 NMR による標準品の純度測定
研究分担者:田中理恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

大麻草由来カンナビノイド試薬の NMR を用いた純度測定

研究要旨: ^1H 核を用いる定量 NMR (^1H -qNMR)法は、濃度が既知の物質と濃度未知の試料の ^1H -NMR を同時に測定することによってそのシグナル強度比から未知試料の定量が可能な定量法である。今回、大麻草由来カンナビノイド試薬について、 ^1H -qNMR 法を用いて純度の測定を検討した。今回測定に用いた大麻草由来カンナビノイド試薬は Δ^9 -THC 及び THCA (THCA-A)であり、溶液としてアンプルに入れて販売されていたものを遮光下-20°Cで保存していたものであった。 ^1H -qNMR 法による定量の結果、 Δ^9 -THC は 93.04~94.75%、THCA は 95.51~96.82%の純度値であった。

これら試薬はクロマト法による純度値が表示されているが、分析用標品として用いる際に、標準品なしで正確な定量が可能である ^1H -qNMR 法で純度を確認しておくことも必要ではないかと考えられる。

A. 研究目的

大麻は世界で最も乱用されている薬物であり、日本においても記録が残る 1858 年以降、覚せい剤に次いで二番目に大麻で検挙される人数が多かった。しかし 2023 年は 6,482 人と過去最多となるとともに、初めて大麻事犯の検挙人員が覚醒剤事犯の検挙人員を上回った。この要因の一つとして若年層の増加があげられる。大麻の乱用による健康被害はもちろん、いわゆる“ゲートウェイドラッグ”としてコカインや覚せい剤などのハードドラッグの乱用につながる事が危惧される。

大麻は大麻草(*Cannabis sativa* L.)及びその製品のことをいう。大麻草はアサ科(*Cannabaceae*)の雌雄異株の一年生草本であり、西アジア~エジプト原産と言われている。紀元前より人類に利用されており、大麻草の茎よりとれる繊維は衣服などに、種子は麻の実、ヘンプシードオイルとして食用に、また生薬の麻子仁としても利用される。また大麻草は繁殖力が非常に強いという特徴もある。

大麻草にはカンナビノイドと総称される炭素、水素、酸素のみからなる化合物群が含まれている。

カンナビノイドの中には幻覚作用などの中枢作用を持つ化合物があり、そのため大麻草は古くから乱用されてきた。カンナビノイドのうち Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) が最も中枢作用が強く大麻草の活性本体である。 Δ^9 -THC は生の植物体中ではフェノールカルボン酸体である Tetrahydrocannabinolic acid (THCA)の状態が存在する。THCA 自体は活性を持たないが、収穫後に乾燥したり、保存中に光や熱によって脱炭酸がおこり Δ^9 -THC へと変化する。

ところで近年、NMR スペクトルを利用した定量法、qNMR (quantitative NMR)法が注目されている。特に ^1H 核を用いる場合 ^1H -qNMR 法と称している¹⁾⁷⁾。日本薬局方では、第 16 改正第一追補参考情報に記載されて以降、第 16 改正第二追補から一般試験法の中に記載されている⁸⁾。 ^1H -NMR では、シグナル強度比は分子中の個々のプロトン数に比例するとともに、一プロトン当たりのシグナル強度は、同じモル濃度であれば化合物の種類によらず一定であることが知られている。従って濃度が既知の物質と濃度未知の試料の ^1H -

NMR を同時に測定することによってそのシグナル強度比から未知試料の定量が可能になる。我々は、標準品の入手が困難、あるいは純度検定に疑問の余地のある危険ドラッグ成分の定量にこの方法が非常に適しているのではないかと考えた。これまでの研究において、我々は危険ドラッグ製品について ^1H -qNMR 法を適用して、含有される成分の定量を検討した⁹⁾⁻¹¹⁾。今回、大麻草由来カンナビノイドについて、 ^1H -qNMR 法で含有される成分の定量を検討することにした。市販の試薬として入手し当所で保管していたカンナビノイド試薬の Δ^9 -THC 及び THCA (THCA-A) (Fig. 1) の実際の純度の測定を ^1H -qNMR 法で検討した。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

NMR 測定溶媒として Methanol- d_4 (99.8 at. % D) (Isotec 社 (Miamisburg, OH, USA)) 製を用いた。分析用試薬として、 Δ^9 -THC 1mg/mL メタノール溶液は Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA), THCA-A 1mg/mL アセトニトリル溶液は Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) より購入した試薬を用いた。また ^1H -qNMR の認証標準物質として和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) より購入した 1,4-(bistrimethylsilyl)benzene- d_4 (1,4-BTMSB- d_4) (99.9 \pm 0.6%) を用いた (Fig. 2)。

2. ^1H -qNMR 用標準液の調製

1,4-BTMSB- d_4 1.83 mg を methanol- d_4 に溶解して 10.0 mL としたものを ^1H -qNMR 用標準液 (0.183 mg/mL) とした。 ^1H -qNMR 用標準液の中の 1,4-BTMSB- d_4 濃度は、1,4-BTMSB- d_4 の正確な重量および SI トレーサビリティ (100.0 \pm 0.5%) で証明された純度から計算した。

3. ^1H -qNMR 測定用試料の調製

Δ^9 -THC 及び THCA はそれぞれ 200 μL を濃縮乾固した。これに 1.00 mL の ^1H -qNMR 用標準液を加えて溶かし、この溶液のうち 0.60 mL を NMR 試料管に移して ^1H -qNMR の測定に供した。

4. ^1H -qNMR スペクトルの測定

最初に Δ^9 -THC 及び THCA の ^1H -NMR を測定し、化合物の水素シグナルの化学シフト値を確認した。Fig.3, Fig.4 にスペクトルを示した。 ^1H -qNMR は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は、64 回とした。測定によって得られたスペクトルから、THC の水素シグナルと δ 0.04 ppm の 1,4-BTMSB- d_4 のシグナルの面積を比較して、式 1 に従って化合物の濃度を算出した。

$$C_{\text{Sample}} = \frac{I_{\text{Sample}}}{I_{\text{BTMSB}}} \times C_{\text{BTMSB}} \quad (1)$$

ただし、 C_{BTMSB} , C_{Sample} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び各化合物のモル濃度 (mol/mL), I_{BTMSB} , I_{Sample} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 の 6 個のメチル基及び各化合物の水素 1 個あたりのシグナル面積。

試料は 3 回測定を行った。

C. 研究結果・考察

Table 2 と Table 3 に ^1H -qNMR 法による Δ^9 -THC 及び THCA の純度の測定結果を示した。また Fig. 3-4 に Δ^9 -THC 及び THCA の ^1H -NMR のチャートを示した。

今回、 ^1H -qNMR 法で検討した大麻草由来カンナビノイド試薬の Δ^9 -THC 及び THCA (Fig. 1) はそれぞれアンプルに入った溶液の状態では遮光下 20 $^{\circ}\text{C}$ で保存されていたものである。同じ 1 本のアンプルから一部を純度の確認に使い、その残りを各種の分析に使うと想定して、なるべく少ないサンプル量、200 μg /200 μL で純度の測定を検討した。

調製した Δ^9 -THC 及び THCA の ^1H -qNMR 測定用試料の ^1H -NMR を測定し、各シグナルの化学シフト値を確認した。その結果、 Δ^9 -THC については ^1H -NMR のチャート上の低磁場領域において 6.44 ppm に 9 位, 6.17 ppm に 2 位, 6.08 ppm に 4 位の芳香族プロトンのシグナルがみられた (Fig. 3)。THCA については 6.40 ppm に 9 位, 6.11 ppm に 4 位の芳香族プロトンのシグナルが

みられた (Fig. 4). これらのシグナルについて、他のシグナルの重なりはみられなかったため、 ^1H -qNMR 法による純度の測定に用いることにした。すなわち、 Δ^9 -THC 及び THCA のそれぞれの各シグナルと、認証標準物質である 1,4-BTMSB- d_4 のシグナルの面積を比較して濃度を算出した。その結果、 Δ^9 -THC についてはそれぞれのシグナルにおける純度値が 6.44 ppm のシグナルで 93.04 \pm 0.68%、6.17 ppm のシグナルで 94.39 \pm 0.48%、6.08 ppm のシグナルで 94.75 \pm 0.50%となった。THCA については 6.40 ppm のシグナルで 95.51 \pm 0.59%、6.11 ppm のシグナルで 96.82 \pm 0.68%となった。これら試薬についてはメーカーによる HPLC などのクロマト法による純度値がそれぞれ 98.5%、96.9%と表示されており、今回測定した ^1H -qNMR 法による純度値とは異なっていた。

今回用いた試薬はそれぞれアンプルに入った溶液の状態では遮光下 -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存されていたものである。安定な状態で保存されていたと考えられるが、経年による分解や、また THCA については光や熱の影響での脱炭酸により Δ^9 -THC となる可能性もある。しかしながら、今回測定した Δ^9 -THC の ^1H -NMR のチャート上において不純物のピークはみられなかった。また、THCA についても不純物及び Δ^9 -THC 由来のシグナルはみられなかった。

D. 結論

大麻草由来カンナビノイド試薬について、 ^1H -qNMR 法を用いて純度の測定を検討した。その結果、 Δ^9 -THC については 93.04~94.75%、THCA については 95.51~96.82%の純度値であることがわかった。

以上、これらの試薬を分析用標品として用いる際に、標準品なしで正確な定量が可能である ^1H -qNMR 法で純度を確認しておくことも必要ではないかと考えられる。

E. 参考文献

- 1) Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara T, Yoshida Y, Tada A, Kubota R, Shimizu K, Yamazaki T, Tanamoto K, Nakazawa H, Nishimura T. *Jpn. J. Food. Chem. Safety* 2009;16:28-33.
- 2) Saito T, Ihara T, Koike M, Kinugasa S, Fujimine Y, Nose K, Hirai T. *Accred. Qual. Assur.* 2009;14:79-86.
- 3) Tanaka R, Yamazaki M, Hasada K, Nagatsu A, *J. Nat. Med.* 2013;67:657-661.
- 4) Tanaka R, Nitta A, Nagatsu A, *J. Nat. Med.* 2014;68:225-230.
- 5) Tanaka R, Hasebe Y, Nagatsu A, *J. Nat. Med.* 2014;68:630-635.
- 6) Tanaka R, Shibata H, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A, *J. Nat. Med.* 2016;70:797-802.
- 7) Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A, *J. Nat. Med.* 2017;71:315-320.
- 8) 厚生労働省, 第十七改正日本薬局方 (2016)
- 9) 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政策研究事業) 「危険ドラッグ等の乱用薬物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 28 年度研究分担報告「危険ドラッグ製品の NMR を用いた定量分析法の検討」(田中理恵)
- 10) 田中理恵, 花尻 (木倉) 瑠理, 袴塚高志: 定量 NMR 法を用いた危険ドラッグの純度決定, 日本薬学会 137 年会 (2017.3.27, 仙台)
- 11) 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政策研究事業) 「危険ドラッグ等の乱用薬物に関する分析情報の収集及び危害影響予測のための研究」平成 30 年度研究分担報告「危険ドラッグ製品の NMR を用いた定量分析法の検討(2)」(田中理恵)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

なし

論文発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

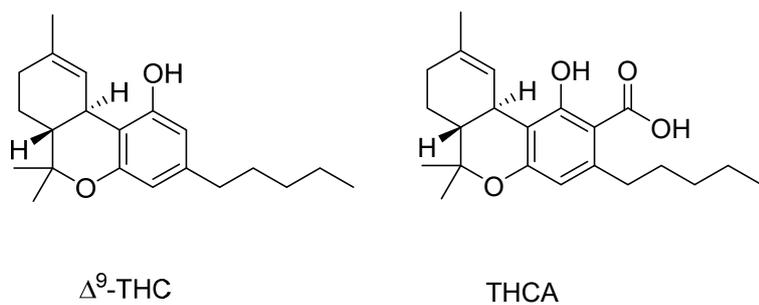


Fig. 1 Chemical structures of Δ^9 -THC and THCA

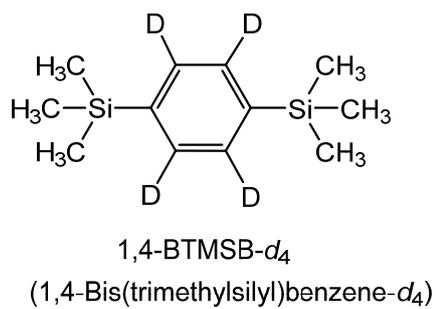


Fig. 2 Chemical structure of 1,4-BTMSB-*d*₄

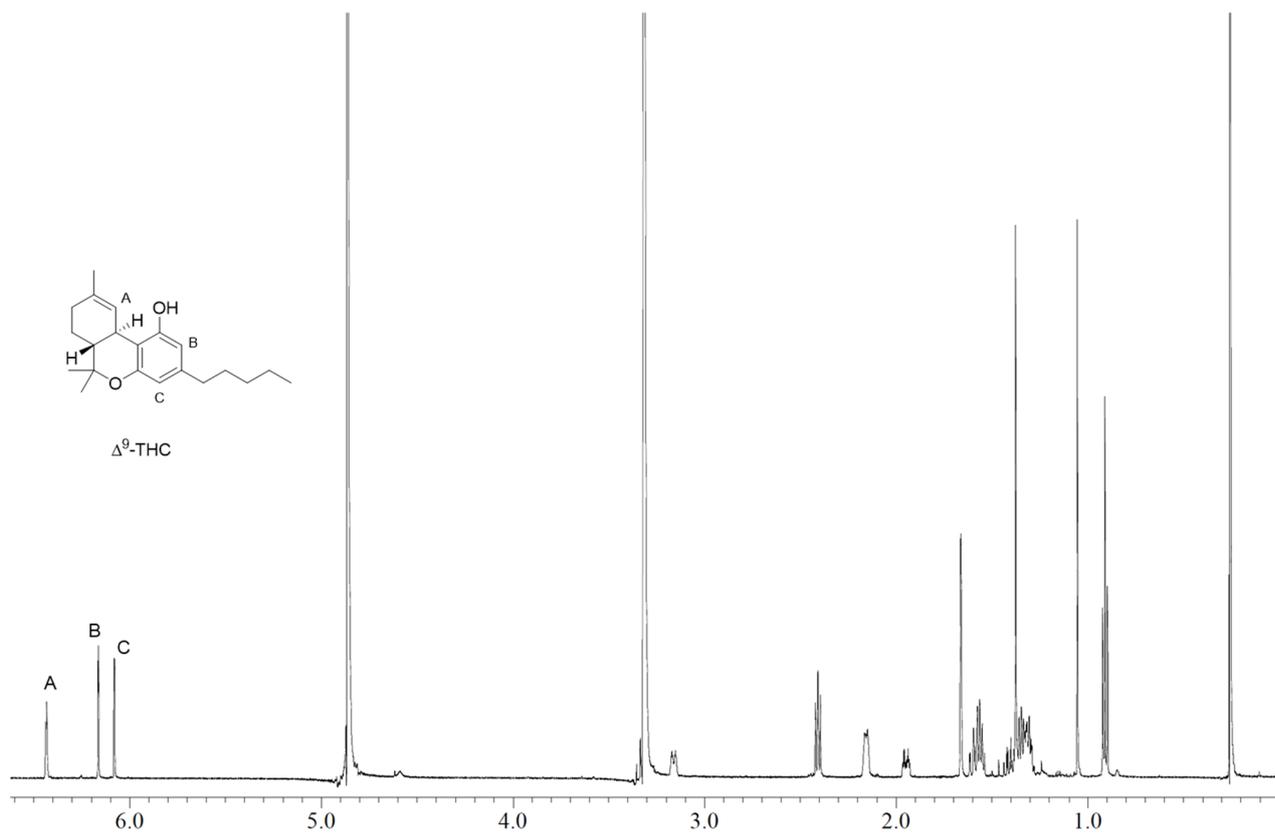


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectra of Δ^9 -THC

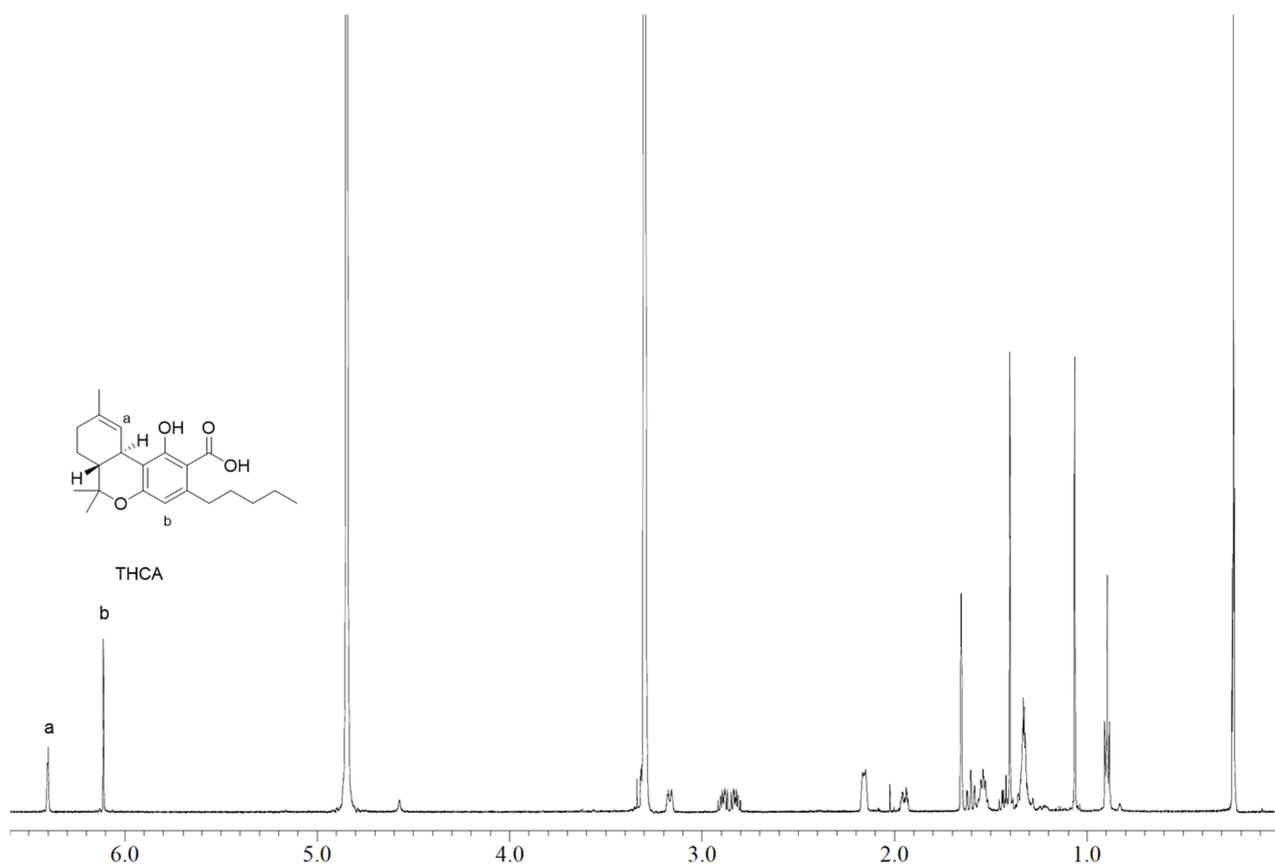


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ spectra of THCA

Table 1 ^1H -qNMR 法における装置と測定条件

機器	ECZ600 (JEOL)	待ち時間	60 s
測定範囲	-5~15ppm	積算回数	64
データポイント	60000	スピン	no spin
フリップアングル	90度	温度	25°C

Table 2 ^1H -qNMR 法による Δ^9 -THC の定量結果

	chemical shift (ppm)	content (%)
H-9	6.44	93.04±0.68
H-2	6.17	94.39±0.48
H-4	6.08	94.75±0.50

Table 3 ^1H -qNMR 法による THCA の定量結果

	chemical shift (ppm)	content (%)
H-9	6.40	95.51±0.59
H-4	6.11	96.82±0.68

分担研究課題:分析法案の策定及び定量 NMR による標準品の純度測定
研究分担者: 田中 理恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

カンナビノイドをはじめとする大麻に特有な成分を含有する製品についての調査

研究要旨:日本国内に流通する,大麻草(*Cannabis sativa* L.)由来のカンナビノイド, cannabidiol (CBD)の成分含有を標榜する製品について調査した.どのような形態の製品が市場に流通しているか,表示されている含有成分と含量,その他特徴等について調べ考察した.その結果,インターネットの販売サイト上で製品形態は粉末,オイル,リキッド,ハーブ,グミ,チョコレート,ガム,飴,ハチミツ,カプセル,タブレット,コーヒー豆,飲料であった.その他に飲食物以外として,軟膏,石鹸,ボディソープ,バスソルト,外用シート等も確認された.

CBD 製品のうち,粉末は表示されている含量値が 99%または 99.9%と高いこと,オイルはガラス製のスポイト瓶に入ったものも多く,表示されている CBD 含量は 4~20%であること,グミは 1 個当たりの CBD 含量は 6.8~25mg であること等の知見が得られた.

今後も新規の CBD 含有を標榜する製品の流通が懸念される.引き続きこれら化合物の流通実態などについて調査していく必要があると考えられる.

A. 研究目的

大麻は大麻草(*Cannabis sativa* L.)及びその製品のことをいう.大麻草にはカンナビノイドと総称される炭素,水素,酸素のみからなる固有の化合物群が含まれている(Fig.1).カンナビノイドは炭素 21 個からなるテルペノフェニリック骨格を持ち,酢酸—マロン酸経路由来のオリベトール酸 olivetolic acid とメバロン酸経路由来のゲラニル二リン酸 geranyl pyrophosphate から生合成される.2016年にElsohlyらは565種の化合物が含まれ,そのうち120種がカンナビノイドと報告している.大麻草に含まれるカンナビノイドについて様々な研究がされており,最近でも新規化合物が単離・構造決定されている.

カンナビノイドの中には幻覚作用などの中枢作用を持つ化合物があり,このうち Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)が最も中枢作用が

強く大麻草の活性本体である. Δ^9 -THCは生の植物体中ではフェノールカルボン酸体である tetrahydrocannabinolic acid (THCA)の状態で存在する. THCA 自体は活性を持たないが,収穫後や保存中の乾燥や,光や熱にさらされることによって脱炭酸がおこり活性体である Δ^9 -THCへと変化する(Fig.1)[1].一方,cannabidiol (CBD)は植物体内で cannabidiolic acid (CBDA)として生合成され,これが脱炭酸することで生成する. CBDA はカンナビノイドのフェノールカルボン酸体の中で初めて1955年に単離された. CBDA は fiber type の大麻草に最も多く含まれるカンナビノイドである. また, cannabigerolic acid (CBGA)は Δ^9 -THCA と CBDA の生合成前駆体で脱炭酸がおこると cannabigerol (CBG)となる. これら CBD および CBG は Δ^9 -THC のような幻覚作用は持たないが,

CBDは抗けいれん作用など、CBGは抗酸化作用と抗炎症作用などの生理活性が報告されている。

近年 CBD の持つ生理活性作用やその他の治療効果などが着目されるようになった。CBD は抗てんかん薬 Epidiolex として医療に用いている国もある。大麻草の成熟した茎や種子のみから抽出・製造された CBD を含有する製品については、大麻取締法上の「大麻」に該当しないとされているため、成熟した茎と種子から製造され違法でないとして標榜する CBD 製品も国内で市販されている。CBD オイル以外にアイソレートパウダーと称された高純度な粉末製品、チョコレートやグミなどの菓子類、コーヒー等の飲料、錠剤やカプセル等のサプリメント製品または石鹸やバスソルトなどの食品以外の製品も出てきている。

我々はこれまでに大麻の本質を明確にするために、大麻の天然物化学的及び分子生物学的な最新の知見について調査を行ってきた。今年度は日本国内に流通する天然由来カンナビノイドのうち CBD の含有を標榜する製品(CBD 製品)について調査した。どのような形態の製品が市場に流通しているか、表示されている含有成分と含量、その他特徴等について調べ考察した。

B. 研究方法

大麻草(*Cannabis sativa* L.)の成分 CBD の含有を標榜する製品について調査を行なった。大手オンラインショッピングモールを中心に検索を行なった。検索語として、CBD, cannabidiol, カンナビジオール, カンナビノイド, 等を用いた。

C. 研究結果及び考察

CBD 製品についてインターネットの販売サイト上で調査し、一部の製品については入手した。CBD 製品の製品形態、内容量、表示されている CBD の含量等について Table 1-3 にまとめた。

現在も CBD の含有を標榜する製品は複数の大手オンラインショッピングモールで販売されている。

製品形態は粉末、オイル、リキッド、ハーブ、グミ、チョコレート、ガム、飴、ハチミツ、カプセル、タブレット、コーヒー豆、飲料であった。その他に飲食物以外として、軟膏、石鹸、ボディソープ、バスソルト、バスボム、バススクラブ、外用シートが確認された。

1. 粉末

ほとんどが小型のプラ容器に入ったもので内容量は 1g のものが多い。容量は少ないもので 500mg, 多いもので 3g であった。原産国は表示されていない製品もあった。製品中の CBD 含量は 99%または 99.9%と表示されているものが多い。見た目はきれいな状態で、結晶状のものもあった。また成分分析表が添付されているものもあった。

2. オイル

ガラス製のスポイト瓶に入ったものが多い。ガラスの色は褐色のものが多いが、青や緑色のものもある。製品の容量は 10~50mL で、10mL のものが多い。CBD 含量はひと瓶あたりの重量で示されていることが多いがパーセント表示されているものもある。今回調べたオイル製品の CBD 含量は 4~20%であった。容器のスポイト一回分の CBD 量が表示されているものもあった。

3. グミ

プラスチックやアルミの袋入りのものやプラスチックのボトル入りのものがあった。グミの形状はキューブ型のもの、クマやアルファベット型のものがあり、色は単色のものと赤、黄、オレンジ色等のものがミックスされているものがあった。今回調べた製品のグミ 1 個当たりの CBD 含量は 6.8~25mg であった。

4. チョコレート

形状は市販の板チョコレートと同じで溝が入っている。表示されている製品中の CBD 含量は 50~200mg であった。溝で割ったときの 1 片当たりの CBD 量が表示されているものもあり、多いもので 30mg/1 片であった。

5. クッキー

形状は市販のお菓子と同じような平たい円形のもの、チョコチップが入っているものもあった。表示されているクッキー 1 個あたりの CBD 量は 10mg または 25mg であった。

6. ハチミツ

ガラス製のジャム瓶またはプラスチック容器に入ったものがあつた。表示されている製品中の CBD 含量は 100~500mg であり、これを換算すると CBD 含量は 0.2~0.3% であつた。

以上、CBD 製品についてインターネットの販売サイトで購入できるものを調査した。実際の製品の CBD 含量は表示されている含量と同じであるかは不明である。また食品のうち、特にお菓子類は通常のものに比べて価格が高いが、中身だけ見ると市販されている普通のお菓子と区別がつかないので過剰摂取などについて注意が必要であると考えられる。

D. 結論

日本国内に流通する大麻草由来のカンナビノイド CBD の含有を標榜する製品について調査を行った。その結果、CBD 製品のうち、粉末は表示されている含量値が 99% または 99.9% と高いこと、オイルはガラス製のスポイト瓶に入ったものが多く、表示されている CBD 含量は 4~20% であること、グミは 1 個当たりの CBD 含量は 6.8~25mg であること等の知見が得られた。

現在インターネット上の販売サイト上では様々な CBD 製品が出現しているのが確認されている。今後も新規の製品の流通が懸念される。引き続きこれら化合物の流通実態などについて調査していく必要があると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 山本郁男, 大麻の文化と科学 —この乱用薬物を考える—, 廣川書店, 東京(2001)
- 2) 厚生省 依存性薬物情報研究班編, 依存性薬物情報シリーズ No.1 大麻, (1987)
- 3) 厚生労働省, 「大麻取扱者免許申請に関するパンフレット」, 東京(2016)
- 4) Handbook of Cannabis, Pertwee, R. ed., Oxford(2014)
- 5) 厚生労働省, 大麻・けしの見分け方, 東京(2016)
- 6) 船山信次, ファルマシア, 52(9), 827-831(2016)
- 7) 森元聡, ファルマシア, 52(9), 832-836(2016)
- 8) United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. (2009)
- 9) Turner, C. E., ElSohly, M. A., Boeren, E. G., J. Nat. Prod, 43, 169-234 (1980)
- 10) ElSohly, M. A., Slade D., Life Sciences, 78, 539-548 (2005)
- 11) ElSohly, M., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., Galal A., Progress in the chemistry of organic natural products Series, Phytocannabinoids. pp.1-36 (2017)
- 12) Ahmed, S. A., Phytochemistry, 117, 194-199 (2015)
- 13) Radwan, M. M. et al. J. Nat. Prod, 78, 1271-1276 (2015)

14) Citti, C., Linciano, P., Russo, F. et al.,
Scientific Reports volume 9, 20335 (2019)

F. 健康危険情報

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

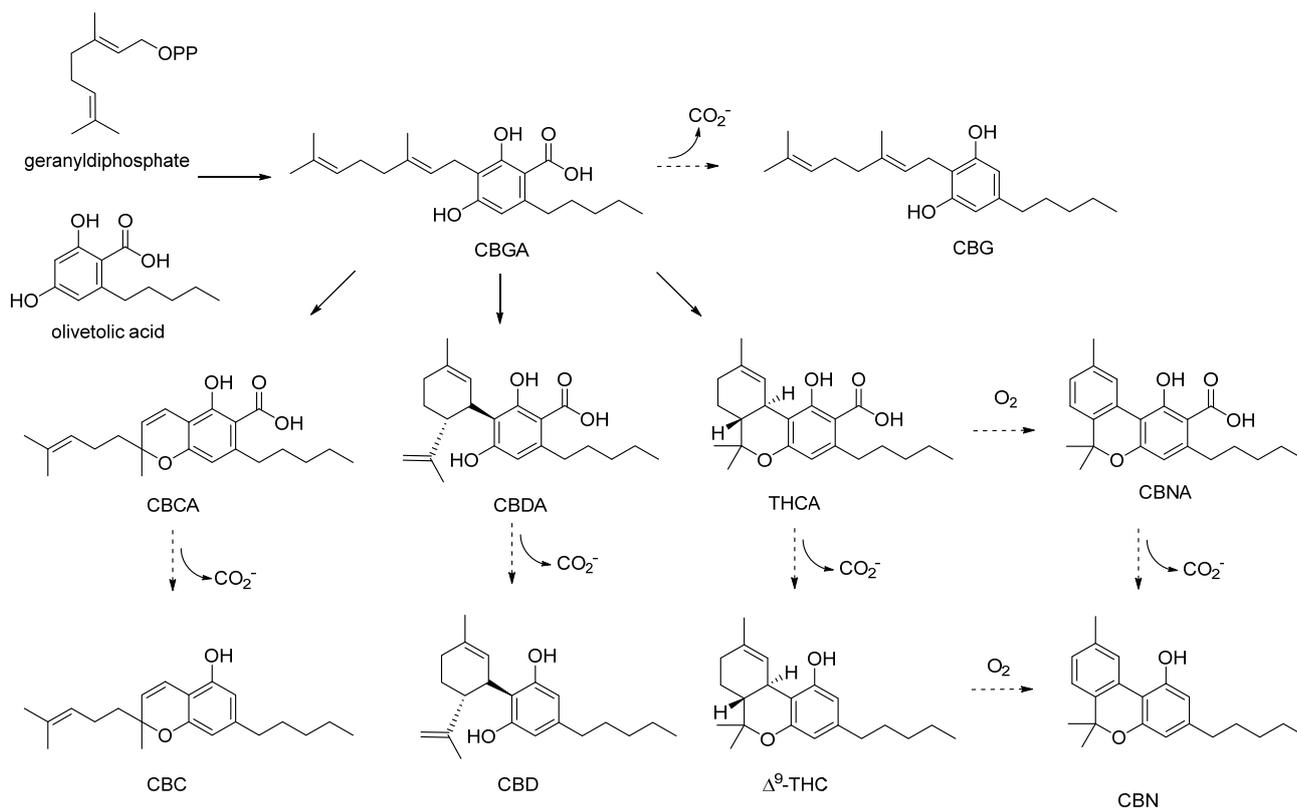
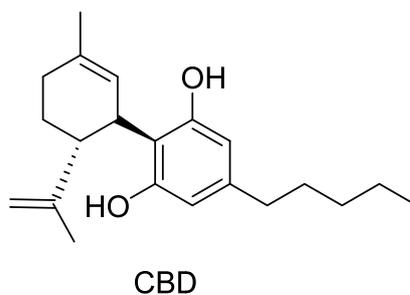


Fig. 1 Biosynthesis of cannabinoids



Formal Name: 2-[1R-3-methyl-6R-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentyl-1,3-benzenediol
 CAS Number: 13956-29-1
 Molecular Formula: C₂₁H₃₀O₂
 Formula Weight: 314.5
 Synonyms: (-)-CBD, cannabidiol

Fig. 2 Chemical structure of CBD

Table 1 CBD 製品の例－粉末－

No.	種類	容器	色	内容量	原産国	成分表示
1	粉	プラ容器	白色	0.5g	—	CBD98% (ラベル99%)Terpenes THC FREE
2	粉	プラ容器	象牙色	1g	アメリカ	CBD99.9% (ラベル99.94%)
3	粉	プラ容器	象牙色	1g	アメリカ	CBD99.6%
4	粉	プラ容器	白色	1g	—	CBD99%
5	粉	プラ容器	象牙色	1g	イギリス	CBD99%
6	粉	プラ容器	象牙色	1g	日本	CBD99%
7	粉	プラ容器	白色	0.99g	—	CBD99%
8	粉	プラ容器	白色	3g	中国	CBD99%
9	粉	プラ容器	象牙色	1g	アメリカ	CBD96.79%
10	粉	プラ容器	白色	1g	スイス	CBD99.5%
11	粉	プラ容器	白色	0.5g	—	CBD99%
12	粉	プラ容器	薄黄色	0.5g	スイス	CBD99.91% CBDV0.09%
13	粉	プラ容器	象牙色	1g	スロベニア	CBD99%
14	粉	プラ容器	薄黄色	1g	—	CBD99%
15	粉	プラ容器	象牙色	1g	—	CBD99.5%
16	粉	プラ容器	象牙色	0.5g	—	CBD99.9%
17	粉	プラ容器	象牙色	1.0g	—	CBD99.75%
18	粉	プラ容器	白色	0.5g	日本	CBD98.6%
19	粉	プラ容器	薄オレンジ	1g	日本	CBD99.7%
20	粉	プラ容器	象牙色	1g	アメリカ	CBD99%

Table 2 CBD 製品の例ーオイルー

No.	種類	容器	内容量	原産国	成分表示	
1	オイル	ガラス製スポイト瓶	10mL	日本	CBD5%	CBD以外のカンナビノイド 0.28%, 天然テルペン0.41%, MCTオイル
2	オイル	ガラス製スポイト瓶	1g	スロベニア	CBD68.2%	CBN84.3% カンナビノイド84.3%
3	オイル	ガラス製スポイト瓶	27g	日本(CBDはアメリカ)	CBD500mg	ヘンプシードオイル
4	オイル	ガラス製スポイト瓶	10mL	日本	CBD500mg	
5	オイル	ガラス製スポイト瓶	10mL	日本	CBD1200mg	
6	オイル	プラスチック製スプレー瓶	50mL	日本	CBD300mg	CBG4mg, CBN5m CBDA、CBG、CBN含有
7	オイル	プラスチック製スプレー瓶	50mL	日本	CBD300mg	CBDA、CBG、CBN含有
8	オイル	ガラス製スポイト瓶	50mL	日本	CBD200mg	
9	オイル	ガラス製スポイト瓶	10mL	アメリカ	CBD2000mg	CBD99mg/serving
10	オイル	ガラス製スポイト瓶	10mL	オランダ	CBD420mg	
11	オイル	ガラス製スポイト瓶	10mL	スロベニア	CBD6.6% (660mg)	
12	オイル	ガラス製スポイト瓶	10mL	イギリス	CBD500mg	9.5mlHempseed oil 0.5mlcannabidiol

Table 3 CBD 製品の例－食品－

No.	種類	容器	形状	内容量	原産国	成分表示	
1	グミ	アルミ袋	キューブ	62.4g、22粒	アメリカ	CBD150mg	CBD6.8mg(1粒)
2	グミ	アルミ袋	クマさん	10粒	アメリカ	CBD100mg	CBD10mg(1粒)
3	グミ	ボトル	クマさん	50粒	アメリカ	CBD1250mg	CBD25mg(1粒)
4	グミ	プラスチック袋	アルファベット	32g、8粒	日本	CBD200mg	CBD25mg(1粒)
5	チョコ	紙/プラスチック袋	板状	26g	アメリカ	CBD200mg	CBD25mg(1片)
6	チョコ	アルミ袋	板状	35g	日本	CBD270mg	CBD30mg(1片)
7	チョコ	アルミ袋	板状	25g	日本	CBD50mg	
8	クッキー	プラスチック袋	円形	1個	日本(アメリカ)	CBD10mg	
9	クッキー	紙箱 プラスチック袋	円形	720g、12個	日本		CBD25mg(1個)
10	クッキー	プラスチック袋	円形	7個	日本	CBD70mg	CBD10mg(1個)
11	ビスケット	プラスチック袋	ホネ	25g、8個	アメリカ	CBD80mg	CBD10mg(1個) *犬用
12	ハチミツ	ガラスジャム瓶	黄色オイル状	140g	スペイン	CBD300mg	
13	ハチミツ	クマさんブラ容器	黄色オイル状	60mL	アメリカ	CBD100mg	
14	ハチミツ	ガラスジャム瓶	山吹色オイル状	235g	アメリカ	CBD500mg	MCT オイル

分担研究課題:分析法の策定と分析法の妥当性評価(LC-MS/MS)
研究分担者:鈴木俊也 東京都健康安全研究センター 医薬品研究科長

LC-MS/MSによる大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THCの
分析法妥当性評価と実試料の測定

研究要旨:令和5年12月に改正された大麻取締法に伴い、これまでの部位規制から成分規制に変更されることとなり、大麻由来製品中の Δ^9 -THCの限度値が設定される予定であることから、十分な測定感度を有し、かつ精度の高い分析法が求められている。本研究では、既報のLC/MS/MSによる食品中の Δ^9 -THCの分析法を改良した方法について、複数の検査機関で分析法バリデーションと大麻由来製品(実試料)の分析を実施し、妥当性を評価することとなった。試料溶液の調製には、食品分野で広く利用されているQuEChERS法を採用した。試料溶液の分析は、タンデム四重極型LC/MS/MSを用いMRM法により定性定量を行った。分析法バリデーションでは、ブランク試料に市販のオイル、グミ、クッキーおよび飲料を用い、 Δ^9 -THC総量(Δ^9 -THC量とTHCA-Aを Δ^9 -THCに換算した量を加えたもの)の仮の製品限度値をオイル、クッキー、グミが0.001%、飲料が0.00001%とした。 Δ^9 -THCおよびTHCA-Aについて、特異性、検出下限値および定量下限値、検量線の直線性、回収率、真度および精度を調べた。特異性では、THCA-Aと同じところに非常に弱いピークが認められたが、仮の製品限度値の1/1000未満であり、定量に際して問題ないと判断した。定量下限値は、 Δ^9 -THCおよびTHCA-Aで、それぞれ0.05 $\mu\text{g/g}$ および0.01 $\mu\text{g/g}$ (飲料はそれぞれで1 ng/mLおよび0.5 ng/mL)であった。検量線の直線性は、1~50 $\mu\text{g/g}$ (飲料は10~500 ng/mL)の範囲で良好な直線性(決定係数 $\gamma^2=0.997\sim0.999$)が得られた。 Δ^9 -THCおよびTHCA-Aの回収率は、それぞれ104.4~118.3%および116.9~156.4%であった。真度は Δ^9 -THCおよびTHCA-A共に概ね100%前後であり、精度はRSD10%未満であった。これら分析法バリデーションの分析能パラメーターは、比較的良好な結果が得られた。本分析法を市販の大麻由来製品(実試料)に適用したところ、大麻オイルでは、 Δ^9 -THC総量が仮の製品限度値を超える濃度0.014%で検出された。大麻グミやクッキーにおいても Δ^9 -THC総量がそれぞれ0.000351%および0.000569%で検出されたが、大麻飲料については、 Δ^9 -THC総量は定量下限値未満であった。いずれの製品についても精度はRSD10%未満であった。以上のことから、本分析法は大麻由来製品の分析に適用可能であると考えられる。なお、本法の適用に際し、MRMクロマトグラム上の Δ^9 -THCのピークの前後にピークが認められたことから、これらを測り込まないようなLC条件を設定すること、また、 Δ^9 -THCおよびTHCA-A共にマトリックス効果(感度増加)が認められる時があったことから、定量に際し、標準添加法やサロゲート法を用いて確認する必要があると考えられる。

研究協力者

植村望美 東京都健康安全研究センター

佐藤美紀 東京都健康安全研究センター

西山 麗 東京都健康安全研究センター

A. 研究目的

令和5年12月13日に大麻取締法が改正された(令和5年法律第84号)。この改正で、大麻の適切な使用の促進が盛り込まれ、大麻については部位規制から成分規制へと原則変更されることに伴い、大麻由来製品に含まれる $\Delta 9$ -THCの限度値が設定されることとなった。これにより、大麻由来製品中の $\Delta 9$ -THCを精度良く測定する方法が求められている。そこで、本研究では、既報のLC/MS/MSによる食品中の $\Delta 9$ -THCの分析法(文献1)を改良した分析法について、性状の異なる食品試料を用いた分析法のバリデーションと実試料への適用について検討することとした。なお、分析法のバリデーションの実施に際し、 $\Delta 9$ -THCの仮の製品限度値をオイル、グミ、クッキーは0.001%(10 $\mu\text{g/g}$)、飲料が0.00001%(100 ng/mL)に設定した。

B. 研究方法

既に多くの大麻由来製品が市場に出回っており、製品に含まれるマトリックスは多種多様である。そこで、これらの製品に対応するため、本研究では、油分が多い試料、糖分が多い試料、粉末試料および水分が多い試料の4群に分け、それぞれオイル、グミ、クッキーおよび飲料を対象とした。また、試料溶液の調製には、食品分野で広く利用されているQuEChERS法を採用した。

1. 食品試料

オイル、グミ、クッキーおよび飲料については、分析法バリデーション用のブランク試料($\Delta 9$ -THCおよびTHCA-Aを含まない)と実試料測定用(市販の大麻由来製品)を用いた。これらの試料(分析法バリデーションで使用した水を除く)は、いずれも研究代表者から配布された共通のものを使用した。

2. 試薬

$\Delta 9$ -THC(メタノール溶液)およびTHCA-A(アセトニトリル溶液)の標準品(濃度各1 mg/mL)は、研究代表者から配布されたものを使用し、アセト

ニトリルで適宜希釈して実験に用いた。アセトニトリルおよびギ酸はLC/MS用、水は超純水、その他の試薬および溶媒は、いずれも試薬特級品を用いた。

3. 測定試料の調製

大麻オイルはカプセルから内容物を取り出し、クッキーは粉砕機(Tube Mill 100 control, IKA ジャパン)を用いて細かく粉砕し、グミはハサミで細断して試料とした。

各試料200 mg を15 mL ポリプロピレン製遠沈管(型番3131-345, Labcon社製)に精密に量り取り、ジクロロメタン1 mL 、水1 mL を加え、よく振り混ぜた後、アセトニトリル5 mL 程度を加えた。その後、超音波抽出を30分間行い、室温に戻した後、ギ酸100 μL とアセトニトリルを加えて10 mL にメスアップした。その際、pH試験紙でpH 3~4程度であることを確認した。内容物を新しい15 mL ポリプロピレン製遠沈管に移し、油分の多い試料は冷凍(-20 $^{\circ}\text{C}$)で30分間静置した。5分間遠心分離(4000 rpm, 5 $^{\circ}\text{C}$)し、上清5 mL をQuEChERS dSPE チューブ(型番S2-15-GFV-EN-KIT, Thermo Fisher Scientific社製)へ入れ、1分間よく振り混ぜた後、5分間遠心分離(4000 rpm, 5 $^{\circ}\text{C}$)し、上清を0.2 μm フィルター(コスモスピンフィルターG, 06549-44, メルク社製)で遠心ろ過し、測定試料とした。

なお、飲料の場合には、試料1 mL を5 mL メスフラスコに採り、アセトニトリル約3 mL およびギ酸50 μL を加え、アセトニトリルで5 mL にメスアップした。全量をQuEChERS dSPE チューブへ移し、1分間よく振り混ぜた後、5分間遠心分離(4000 rpm, 5 $^{\circ}\text{C}$)し、上清を0.2 μm フィルターでろ過し、測定試料とした。

1-4. LC/MS/MS 条件

$\Delta 9$ -THCとTHCA-Aの分析には、ウォーターズ社製のタンデム四重極型LC/MS/MSを用いた(表1)。カラムには逆相系ODSカラム、移動相にはギ酸-アセトニトリル系を用い、 $\Delta 9$ -THCと $\Delta 8$ -THCを完全に分離できるグラジエント条件を設

定した。

なお、LC/MS/MS への測定試料の注入量は1 μL (ただし、飲料は 5 μL) として分析を行った。

C. 結果

1. 分析法バリデーション

1-1. 特異性

分析法バリデーション用の各ブランク試料を用い、研究方法3に従い測定試料を調製し、LC/MS/MS で分析した(図1)。クッキーの場合には、 $\Delta 9$ -THC および THCA-A 共にそれぞれの保持時間にピークは検出されなかった。一方、オイル、グミおよび飲料の場合には、 $\Delta 9$ -THC の保持時間にピークは検出されなかったが、THCA-A の保持時間にピークが極わずかに認められた。各ブランク試料において THCA-A の保持時間に認められたピークの強度(高さ)は、仮の製品限度値の 1/1000 未満であった。

1-2. 検出限界

$\Delta 9$ -THC および THCA-A の検出下限値(LOD)は、それぞれオイル、グミ、クッキーが 0.025 および 0.005 $\mu\text{g/g}$ 、飲料が 0.5 および 0.1 ng/mL であった(表2)。

1-3. 定量限界

$\Delta 9$ -THC および THCA-A の定量下限値(LOQ)は、それぞれオイル、グミ、クッキーが 0.05 および 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、飲料が 1 および 0.5 ng/mL であった(表2)。

1-4. 検量線の直線性

ブランク試料に標準溶液を超音波抽出前に添加し、以下、研究方法3に従い測定試料を調製し、LC/MS/MS で分析した。 $\Delta 9$ -THC および THCA-A の添加濃度範囲は、オイル、グミおよびクッキーが 0.2, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g}/200\text{mg}$ 、飲料が 10, 50, 100, 250, 500 ng/mL とした。また、検量線の作成に際し、原点を含み、重みづけは 1/X とした。ただし、 $\Delta 9$ -THC のオイル、グミ、クッキーは重みづけをしなかった(図2および3)。

$\Delta 9$ -THC の検量線の決定係数(r^2)は、オイル、

グミ、クッキーおよび飲料で、それぞれ 0.9998, 0.9984, 0.9993 および 0.9996 と比較的良好な結果であった(表2)。

THCA-A の検量線の決定係数は、オイル、グミ、クッキーおよび飲料で、それぞれ 0.9974, 0.9971, 0.9973 および 0.9993 と比較的良好な結果であった(表2)。

1-5. 回収率

回収率を求めるための $\Delta 9$ -THC および THCA-A の添加濃度は、仮の製品限度値の 1/10, 1 倍, 5 倍に相当する濃度に設定した。即ち、オイル、グミおよびクッキーが 1, 10, 50 $\mu\text{g/g}$ 、飲料が 10, 100, 500 ng/mL とした。なお、回収率は、対応する濃度の標準溶液中の $\Delta 9$ -THC および THCA-A のそれぞれのピーク面積から求めた。

$\Delta 9$ -THC の回収率について、オイル、グミ、クッキーおよび飲料で、それぞれ 108.6 – 117.4, 104.4 – 108.3, 111.6 – 113.5 および 110.1 – 118.3%であった。

THCA-A の回収率について、オイル、グミ、クッキーおよび飲料で、それぞれ 116.9 – 137.5, 121.0 – 132.9, 119.1 – 153.8 および 133.1 – 156.4%であった。

1-6. 真度および精度

$\Delta 9$ -THC および THCA-A の添加濃度は、上述の回収率の実験と同じ濃度で実施した。なお、真度は、各ブランク試料に $\Delta 9$ -THC および THCA-A の標準溶液を添加し、研究方法3に従い測定試料を調製して作成した検量線から濃度を求め、理論濃度に対する割合を求めた。

$\Delta 9$ -THC の真度について、オイル、グミ、クッキーおよび飲料で、それぞれ 102.0 – 108.0, 100.4 – 116.0, 101.5 – 105.2 および 99.7 – 104.3%であった(表3)。また、精度(RSD%)は、いずれの試料においても 10%未満であった(表3)。

THCA-A の真度について、オイル、グミ、クッキーおよび飲料で、それぞれ 97.7 – 111.1, 94.8 – 107.8, 100.5 – 111.8 および 99.7 – 102.2%であった(表3)。また、精度(RSD%)は、いずれの試料

においても 10%未満であった(表3).

2. 分析法の大麻由来製品(実試料)への適用

上述の分析法を実試料に適用し, $\Delta 9$ -THC および THCA-A について, それぞれ定量分析を行い, 次式により, $\Delta 9$ -THC 総量として換算した(表4).

飲料以外 $\Delta 9$ -THC 総量($\mu\text{g/g}$) = $\Delta 9$ -THC 量($\mu\text{g/g}$) + $0.877 \times \text{THCA-A 量}(\mu\text{g/g})$

飲料 $\Delta 9$ -THC 総量(ng/mL) = $\Delta 9$ -THC 量(ng/mL) + $0.877 \times \text{THCA-A 量}(\text{ng/mL})$

* $\Delta 9$ -THC 分子量 314/THCA-A 分子量 358 = 0.877

飲料以外 $\Delta 9$ -THC の含量(%) = $\Delta 9$ -THC 総量($\mu\text{g/g}$)/ $10^6 \times 100$

飲料 $\Delta 9$ -THC の含量(%) = $\Delta 9$ -THC 総量(ng/mL)/ $10^9 \times 100$

QC サンプルについては, 各大麻由来製品中の $\Delta 9$ -THC 量に対して当量になるように標準溶液を添加して調製したものを分析した.

検量線は, 分析法バリデーション時に調製した測定試料を用いて作成した.

2-1. 大麻オイル

予備実験の結果, 検量線の範囲を超えることが判明したため, 最終溶液をアセトニトリルで 10 倍希釈したものを測定した. 大麻オイルの MRM クロマトグラムを図4に示す. 大麻オイルからは, $\Delta 9$ -THC および THCA-A が検出され, $\Delta 9$ -THC としての総量は $143 \pm 3.84 \mu\text{g/g}$ で, 含量は 0.0143% であった. その他に, CBD, CBN, CBDA と思われるピークが検出された. QC サンプルの分析結果は, ほぼ同じ値であった.

2-2. 大麻グミ

大麻グミの MRM クロマトグラムを図4に示す. 大麻グミからは, $\Delta 9$ -THC が検出され, $\Delta 9$ -THC としての総量は $3.51 \pm 0.135 \mu\text{g/g}$ で, 含量は 0.000351% であった. その他に, CBD, CBN, CBDA と思われるピークが検出された. QC サンプルの分析結果は, ほぼ同じ値であった.

2-3. 大麻クッキー

大麻クッキーの MRM クロマトグラムを図5に示す. クッキーからは, $\Delta 9$ -THC が検出され, $\Delta 9$ -THC としての総量は $5.69 \pm 0.024 \mu\text{g/g}$ で, 含量は 0.000569% であった. その他に, CBD, CBN, CBDA と思われるピークが検出された. QC サンプルの分析結果は, ほぼ同じ値であった.

2-4. 大麻飲料

大麻飲料の MRM クロマトグラムを図5に示す. 大麻飲料からは, $\Delta 9$ -THC および THCA-A は共に検出されなかったが, CBD と思われるピークが検出された. QC サンプルの分析結果でも, $\Delta 9$ -THC および THCA-A は検出されなかった.

2-5. $\Delta 9$ -THC と未知ピークの分離

分析法バリデーション時に設定した LC/MS/MS 条件で実試料を分析した場合, 大麻飲料を除き, $\Delta 9$ -THC の前後にピークが認められた(図6). 特に, 大麻クッキーでは, $\Delta 9$ -THC と直前のピークの分離が不十分であった. THCA-A については, そのピーク前後に定量に影響を及ぼすピークは認められなかった.

D. 考察

1. 分析法バリデーション

特異性について, ブランク試料に THCA-A の保持時間にピークが認められたことから, 比較的高濃度の標準溶液を注入後, アセトニトリルを注入したが, クロマトグラム上にピークは認められず, キャリーオーバーは観察されず, 検出原因は不明である.

本分析法における $\Delta 9$ -THC および THCA-A の定量下限値は, 仮の製品限度値のそれぞれ 1/100 および 1/200 以下であり, 十分な感度を有していると考えられる.

検量線の直線性については, いずれの試料を用いた場合にも, 仮の製品限度値の 1/10 から 5 倍の範囲で $\Delta 9$ -THC および THCA-A 共に, ほぼ良好な直線性が得られ, 本分析法はおおよそ 2 オーダーの濃度範囲をカバーできることが示唆された. $\Delta 9$ -THC および THCA-A の定量に際して

は、試料中の $\Delta 9$ -THC および THCA-A の濃度に合わせて、検量線の濃度範囲を決める必要があると考えられる。

回収率、真度および精度について、 $\Delta 9$ -THC では回収率 104.4~118.3%，真度 99.7~116.0，精度 RSD10%未満とほぼ良好な結果であった。一方、THCA-A については、回収率は 116.9~156.4%と高い結果となったが、真度 94.8~111.8%，精度 RSD10%未満と比較的良好であった。これらのことから、本研究で使用した LC/MS/MS 条件下では、 $\Delta 9$ -THC および THCA-A 共にマトリックスの影響を受け、特に THCA-A の方が $\Delta 9$ -THC よりもマトリックス効果により感度が増加することがわかった。マトリックス効果による感度の増加が、タンデム四重極型 LC/MS/MS に共通してみられることなのか、或いは測定モード(ポジティブまたはネガティブ)に起因するのかは、今後の検討が必要と考えられる。いずれにせよ、本分析法を採用する場合には、事前にバリデーションを実施し、マトリックスの影響の有無を調べ、影響が認められる場合には、 $\Delta 9$ -THC および THCA-A の正確な定量に際して、標準添加法やサロゲート法を用いる必要があることが示唆された。

2. 分析法の大麻由来製品(実試料)への適用

実試料の測定と同時に標準溶液を添加した QC サンプルを調製して分析したところ、両者の測定結果は同様な結果であった。

大麻オイル、大麻グミ、大麻クッキーの分析時に、MRMクロマトグラムでの $\Delta 9$ -THC の前後にピークが認められた。分析法バリデーション時には、これらのピークは認められなかったことから、もともと原材料に存在していたか、或いは大麻由来製品を製造する際に生じたものと思われる。LC/MS/MS の分析条件を設定する際には、 $\Delta 9$ -THC のピークとこれらのピークとを分離できる条件に設定する必要があると考えられる。

3. 分析上の注意点

クッキーおよびグミの場合には、本分析法の抽

出溶媒に溶解しないものが残存し、最初の 15 mL の遠沈管からメスフラスコに全量移すことができず、試料毎にバラツキがあった。しかし、分析結果を見ると、精度は RSD10%未満であったことから、定容時に抽出溶媒に溶解しないもののメスフラスコへの移行量は、定量値にほとんど影響しないことが示唆された。また、サロゲートを使用すれば、最初の遠沈管でおおよそ 10 mL にすることにより、メスフラスコを使用した定容操作を省略できるものと思われる。

$\Delta 9$ -THC は酸性条件下で分解することが知られている。また、CBD も酸性下で分解され、 $\Delta 9$ -THC および $\Delta 8$ -THC が生成されることが報告されている(文献 2, 3, 4)。予備実験で抽出溶媒にギ酸を加え、pH 約 2.5 で $\Delta 9$ -THC の濃度の経時変化を調べたが、分単位での減少が認められた。本分析法でも THCA-A を抽出の回収率を向上させるために、ギ酸を添加時に、局所的に pH3 以下にならないように攪拌しながら少しずつ添加するなどの注意が必要と思われる。

E. 結論

本研究では、既に食品分野で広く使用されている試料溶液の調製法である QuEChERS 法とタンデム四重極型 LC/MS/MS による MRM 測定法を組み合わせた方法により、ブランク試料を用いた分析法バリデーションと大麻由来製品(実試料)への適用について検討した。いずれも比較的良好な結果が得られたことから、本法は、大麻由来製品の分析法として有用であると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Lee J H, Min A Y, Han J H, Yang Y J, Kim H, Shin D: Development and validation of LC-MS/MS method with QuEChERS clean-up for detecting cannabinoids in foods and dietary supplements. *Food Add. Cont.: Part A*. 2020; 37(9):1413-1424.
- 2) Merrick J, Lane B, Sebree T, Yaksh T, O'Neill C,

Banks S: Identification of psychoactive degradants of cannabidiol in stimulated gastric and physiological fluid. *Cnnabis cannabinoid Res.* 2016; 1.1: 102-112.

- 3) Jeong M, Lee S, Seo C, Kwon E, Rho S, Cho M, Yeon Kim M, Lee W, Lee Y S, Hong J: Chemical transformation of cannabidiol into psychotropic cannabinoids under acidic reaction conditions: Identification of transformed products by GC-MS. *J. Food, Drug Anal.* 2023; 31(1):165-176.
- 4) Jaidee W, Siridechakorn I, Nessopa S, Wisultiprot, V, Chaiwangrach N, Ingkaninan k, Waruch N: Kinetics of CBD, Δ 9-THC degradation and cannabinol formation in cannabis resin at various temperature and pH conditions. *Cnnabis cannabinoid Res.* 2022; 7(4): 537-547.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

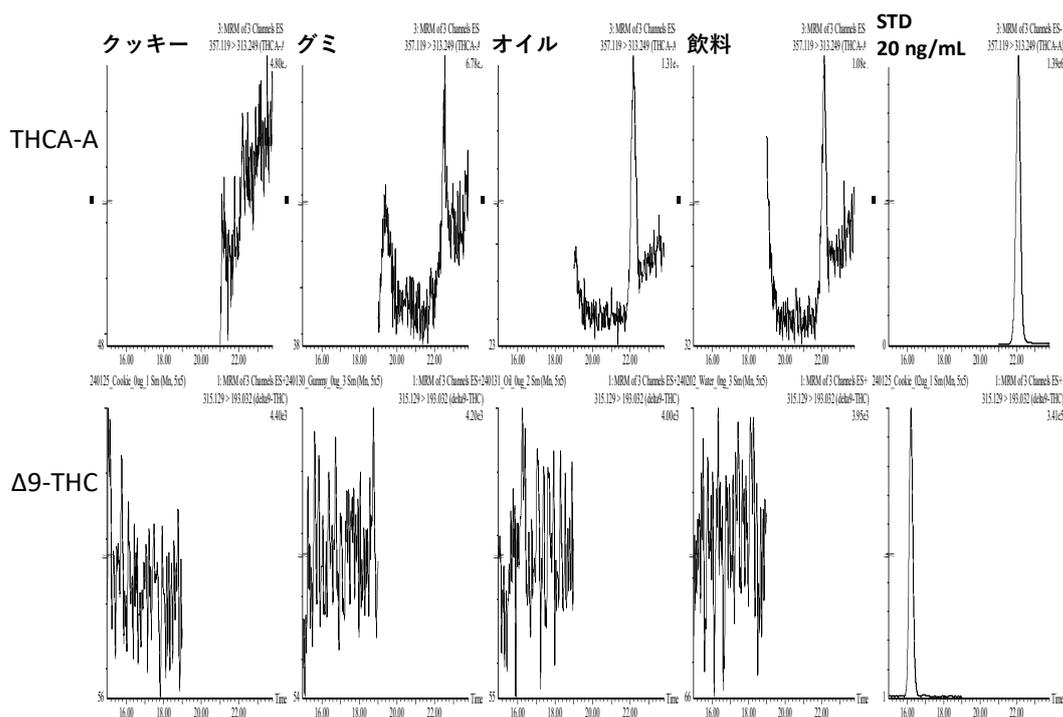


図 1. ブランク試料の試料溶液の MRM クロマトグラム

表 1. LC/MS/MS の分析条件

装置

ACQUITY Premier/Xevo TQ Absolute (Waters)

LC条件

カラム：CAPCELL PAK C18 MG II Column (3 μm, 2.0 × 100 mm, 大阪ソーダ)

カラム温度：40°C, サンプルクーラー温度：25°C

流速：0.3 mL/min, 注入量：1 μL, 5 μL (飲料)

移動相：0.1%ギ酸 (A), 0.1%ギ酸アセトニトリル (B)

A/B=95/5-35/65 (3 min, 17 min hold) -0/100 (25 min, 5 min hold) -95/5 (31 min, 5 min hold)

MS条件

Capillary voltage：1.0 kV, Source Temp.：150°C, Desolvation temp.：500°C

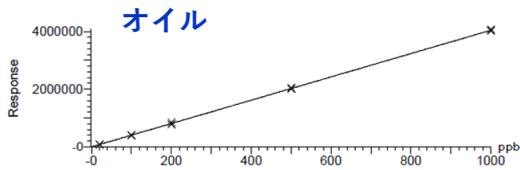
N₂ Cone gas flow：150 L/hr, Desolvation gas flow：1000 L/hr

Collision gas flow：Ar 0.15 mL/min

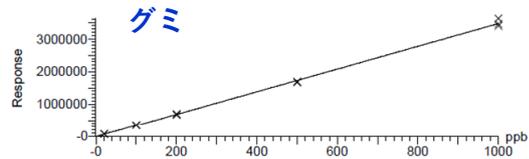
MRM条件 (下表参照)

MRM1：13-19 min, ESI⁺, THC検出用, MRM2：19-25 min, ESI⁻, THCA-A検出用

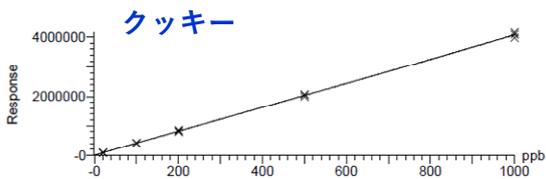
Cannabinoid	mode	tR (min)	Prnt	Dau 定量	Cone (V)	Coll (eV)	Dau 確認	Cone (V)	Coll (eV)
Δ9-THC	pos	16.4	315.1	193.0	22	24	259.1	22	18
THCA-A	neg	22.0	357.1	313.2	8	22	245.1	8	30



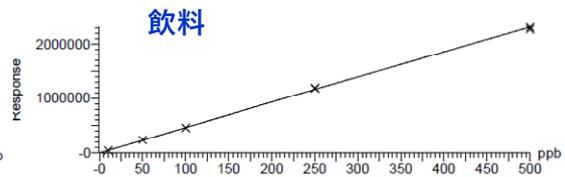
Compound name: delta9-THC
Correlation coefficient: $r = 0.999916$,
 $r^2 = 0.999831$
Calibration curve: $4045.54 * x + 1689.4$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: delta9-THC
Correlation coefficient: $r = 0.999214$,
 $r^2 = 0.998429$
Calibration curve: $3481.99 * x + -12147$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: Null, Axis trans: None

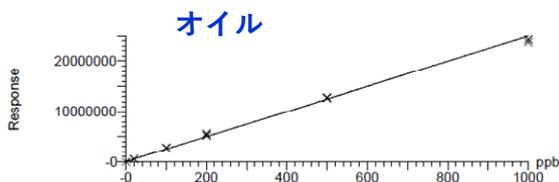


Compound name: delta9-THC
Correlation coefficient: $r = 0.999668$,
 $r^2 = 0.999335$
Calibration curve: $4063.45 * x + 7566.85$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: Null, Axis trans: None

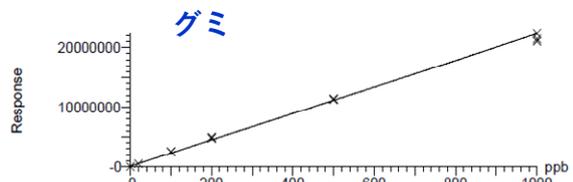


Compound name: delta9-THC
Correlation coefficient: $r = 0.999805$,
 $r^2 = 0.999610$
Calibration curve: $4646.84 * x + 123.939$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: $1/x$, Axis trans: None

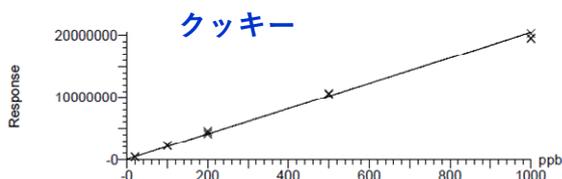
図 2. Δ9-THC の検量線の直線性 (n=3)



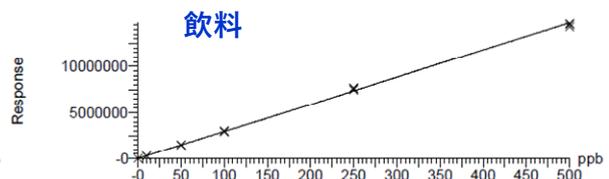
Compound name: THCA-A
Correlation coefficient: $r = 0.998736$,
 $r^2 = 0.997474$
Calibration curve: $24948.3 * x + 55236.5$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Compound name: THCA-A
Correlation coefficient: $r = 0.998588$,
 $r^2 = 0.997177$
Calibration curve: $22221.6 * x + 67423.7$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Compound name: THCA-A
Correlation coefficient: $r = 0.998664$,
 $r^2 = 0.997331$
Calibration curve: $20373.4 * x + 59453.7$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Compound name: THCA-A
Correlation coefficient: $r = 0.999682$,
 $r^2 = 0.999365$
Calibration curve: $29490.9 * x + -4682.9$
Response type: External Std, AreaCurve type: Linear, Origin: Include,
Weighting: $1/x$, Axis trans: None

図 3. THCA-A の検量線の直線性 (n=3)

表 2. Δ9-THC および THCA-A の検量線, 検出限界および定量限界

	Δ9-THC				THCA-A			
	Range (μg/g)	R ²	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)	Range (μg/g)	R ²	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
オイル	1 - 50	0.9998	0.025	0.05	1 - 50	0.9974	0.005	0.01
グミ	1 - 50	0.9984	0.025	0.05	1 - 50	0.9971	0.005	0.01
クッキー	1 - 50	0.9993	0.025	0.05	1 - 50	0.9973	0.005	0.01

	Δ9-THC				THCA-A			
	Range (ng/mL)	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Range (ng/mL)	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
飲料	10 - 500	0.9996	0.5	1	10 - 500	0.9993	0.1	0.5

表 3. Δ9-THC および THCA-A の回収率, 精度および真度 (n=3)

	Δ9-THC				THCA-A			
	Conc. (μg/g)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)	Conc. (μg/g)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)
オイル	1	117.4	4.90	108.0	1	137.5	6.76	110.5
	10	108.6	0.62	103.0	10	124.1	0.69	111.1
	50	110.0	3.05	102.0	50	116.9	3.54	97.7
グミ	1	105.9	1.55	116.0	1	132.9	2.13	94.8
	10	104.4	0.60	100.4	10	127.0	0.98	107.8
	50	108.3	8.77	111.8	50	121.0	8.15	104.7
クッキー	1	113.5	3.23	101.5	1	153.8	4.75	100.5
	10	112.2	6.59	105.2	10	134.0	5.74	111.8
	50	111.6	1.84	103.6	50	119.1	1.28	101.7

	Δ9-THC				THCA-A			
	Conc. (ng/mL)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)	Conc. (ng/mL)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)
飲料	10	118.3	2.00	104.3	10	156.4	2.09	99.7
	100	110.1	0.35	99.7	100	138.8	1.74	102.2
	500	114.3	2.57	102.1	500	133.1	1.82	100.9

表4. 大麻由来製品（実試料）中の Δ 9-THCおよびTHCA-A

	限度値	Δ 9-THC ($\mu\text{g/g}$)	THCA-A ($\mu\text{g/g}$)	THCとしての総量 ($\mu\text{g/g}$)	THCとしての含有%
オイル*	0.001%	143 \pm 3.73	0.25 \pm 0.130	143 \pm 3.84	0.0143%
グミ	0.001%	3.51 \pm 0.135	N.D.	3.51 \pm 0.135	0.000351%
クッキー	0.001%	5.69 \pm 0.024	N.D.	5.69 \pm 0.024	0.000569%
飲料	0.00001%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*試験溶液を10倍希釈した液で定量を行った。また定量値は内容物中の含有量である。

表5. QC サンプルの分析結果

	限度値	Δ 9-THC ($\mu\text{g/g}$)	THCA-A ($\mu\text{g/g}$)	THCとしての総量 ($\mu\text{g/g}$)	THCとしての含有%
オイル	0.001%	132 \pm 1.86	15.2 \pm 1.47	145 \pm 3.07	0.0145%
グミ	0.001%	3.90 \pm 0.206	0.20 \pm 0.058	4.08 \pm 0.243	0.000408%
クッキー	0.001%	5.74 \pm 0.112	0.97 \pm 0.004	6.59 \pm 0.115	0.000659%
飲料	0.00001%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

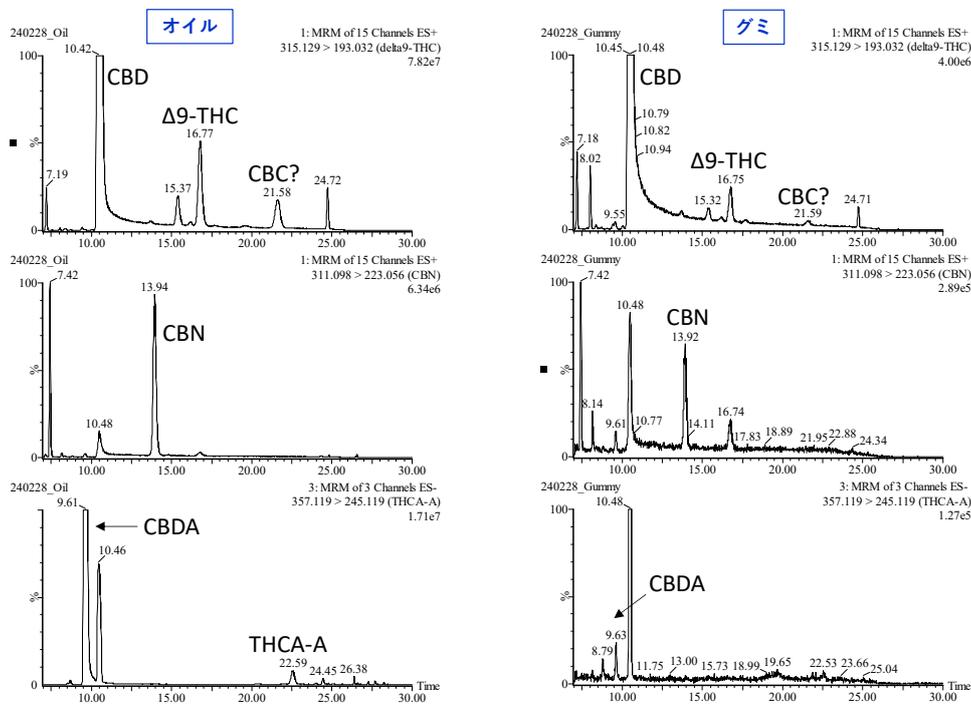


図4. 大麻由来製品（実試料）中に検出されたカンナビノイド（推定含む）

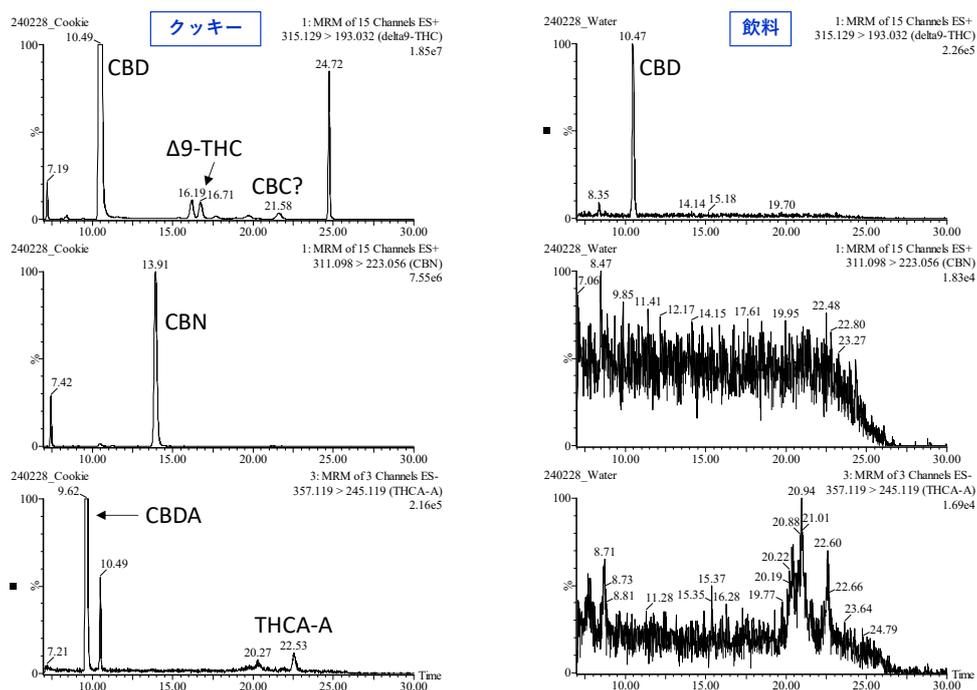


図 5. 大麻由来製品（実試料）中に検出されたカンナビノイド

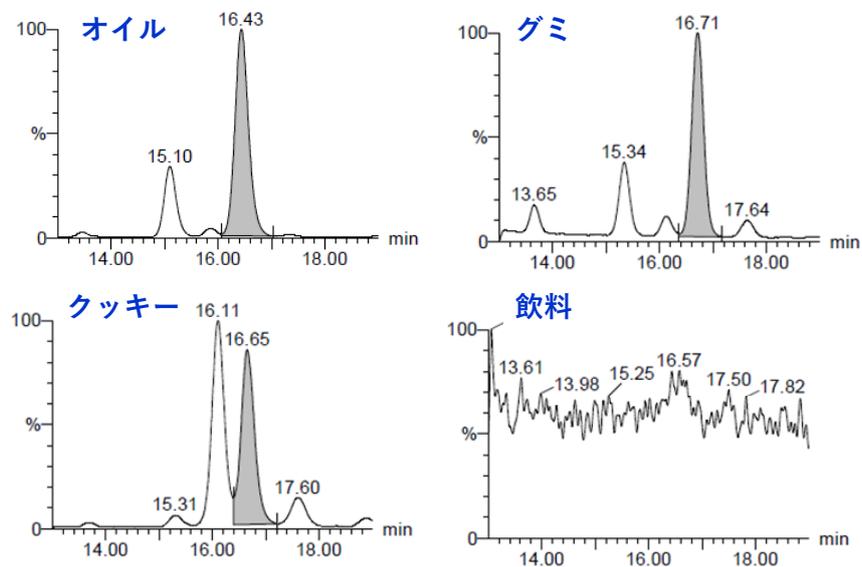


図 6. 大麻由来製品（実試料）の Δ^9 -THC の MRM クロマトグラム (m/z 315.1>193.0)

分担研究課題:分析法案の策定と分析法の妥当性評価(LC-QTOF MS)1
研究分担者:土井 崇広 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 主幹研究員

LC-QTOF MS による大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THC の
分析法妥当性評価と実試料の測定 1

研究要旨:大麻取締法及び麻薬及び向精神薬取締法の一部改正により,大麻草の濫用による保健衛生上の危害の発生を防止するため,大麻草由来製品に微量に残留する Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)の残留限度値が設けられることとなった.また,大麻草由来の成分のうち,化学的変化により容易に麻薬を生じ得る一部の成分について麻薬とみなすこととなり,tetrahydrocannabinolic acid (THCA-A)についても併せてその対象となっている.設定された残留限度値のモニタリングには,適切な定量分析法の設定が必要となるが,これまで当該目的達成のために Δ^9 -THC および THCA-A を同時定量した報告は見当たらない.

本研究ではオイル・クッキー・グミおよび飲料の 4 製品群を対象として,分析法開発に必要な分析法バリデーションを行うとともに,各製品実試料を用いて Δ^9 -THC 含有量の測定を実施した.

A. 研究目的

本研究では,大麻由来製品中に含まれる微量 Δ^9 -THC および THCA-A の定量分析法の構築を目的として,液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS)を用いた検討を行った.

B. 研究方法

1) 試薬および試料

①試薬

Δ^9 -THC は Cerliant 社から, THCA-A は Cayman 社より入手したものを用いた. QuEChERS dSPE チューブは EN Method QuEChERS Clean-up Kit, General Fruits and Vegetables, 15 mL Tube (Thermo Scientific 製)または DisQuE 900 mg MgSO₄ & 150 mg PSA, 15 mL Tube (Waters 製)を用いた.その他試薬は富士フィルム和光純薬株式会社から購入したものを用いた.

②試料

分析法バリデーションのブランク試料には CBD が添加されていない市販品のオリーブオイル・グミ・クッキーおよびミネラルウォーターを用いた.

CBD 含有製品は代表研究者より送付されたオイル,グミ,クッキー,飲料を用いた.

2) 機器および分析条件

①使用機器

質量分析装置: 6546 LC/Q-TOF MS system (Agilent Technologies, CA, USA)

UPLC 部分: 1290 Infinity II UHPLC system (Agilent Technologies, CA, USA)

②LC 分離条件

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II Column (3 μ m, 2.0 \times 100 mm) (大阪ソーダ製)

カラム温度: 40°C, サンプルクーラー温度: 25°C

流速: 0.3 mL/min, 注入量: 1 μ L (飲料は 5 μ L)

移動相 A: 0.1% ギ酸水溶液,

移動相 B:0.1% ギ酸アセトニトリル溶液,
グラジエント条件:A/B = 95/5-35/65(3 min,17 min
hold)-0/100(25 min, 5 min hold) [-95/5(31 min, 5
min hold)]

③MS 測定条件

質量分析装置の条件は既報を参考にした^{1),2)}.

Ion source: Dual-AJS ion source, Ionization: ESI
positive mode, Gas temperature: 325 °C, Gas: N₂,
Drying Gas: 10 L/min, Nebulizer: 20 psi, Sheath
Gas Temperature: 400 °C, Sheath Gas Flow: 12
L/min, Capillary voltage: 3000 V, Nozzle
Voltage: 600 V, Fragmentor: 120 V, Skimmer: 45 V,
Oct 1 RF Vpp: 750 V, Mass spectral range: m/z
100–1000, MS reference mass ions: 121.0509 and
922.0098

④解析条件

取得データの解析には Agilent MassHunter
Qualitative Analysis 10.0 (Agilent 製)を用いた。
 Δ^9 -THC の定量には m/z 315.2319 ± 10 mDa,
THCA-A の定量には m/z 359.2217 ± 10 mDa の
抽出イオンクロマトグラムを用いた。

3) 試料溶液の調製

試料溶液の調製は、既報³⁾を参考に一部変更
して実施した。

①オイル・クッキーの試料溶液調製法

1. 試料(クッキーは事前に粉砕)約 200 mg を 15 mL チューブ(深江化成社製)に精密に量り取った。
2. ジクロロメタン 1 mL, 水 1 mL を加え、よく振り混ぜた後、アセトニトリル(QToFMS 用)5 mL 程度を加えた。
3. 超音波抽出を 30 分間行い、室温に戻った後、ギ酸(LC/MS 用)100 μ L とアセトニトリルを加えて 10 mL にメスアップした。
4. 内容物を新しい 15 mL 遠心チューブにうつし、冷凍(-20°C)で 30 分間静置した。
5. 5°C で 5 分間, 4000 rpm で遠心分離した。
6. 上清 5 mL を QuEChERS dSPE チューブへ入

れ、よく振り混ぜた。

7. 5°C で 5 分間, 4000 rpm で遠心分離した。

8. 上清を 0.2 μ m フィルター(コスモスピンフィルタ-G, ナカライテスク(株)製)で遠心ろ過し、試料溶液とした。

②グミの試料溶液調製法

1. 試料はハサミで細切し、冷凍(-20°C)で一晩静置した。

2. 試料約 200 mg を 15 mL チューブ(深江化成社製)に精密に量り取り、4. の冷凍処理を除き、①2~8. の操作を実施して試料溶液を調製した。

③飲料の試料溶液調製法

1. 試料 1 mL にアセトニトリル及びギ酸 50 μ L を加え、アセトニトリルで 5 mL にメスアップした。

2. 全量を QuEChERS dSPE チューブへ移した。

3. よく振り混ぜた後、5°C で 5 分間, 4000 rpm で遠心分離した。

4. 上清を 0.2 μ m フィルターでろ過し、試料溶液とした。

4) 混合標準溶液の調製

①THC, THCA-A 100 μ g/mL アセトニトリル溶液

Δ^9 -THC 1 mg/mL メタノール溶液(Cerliant 製)および THCA-A 1 mg/mL アセトニトリル溶液(Cayman 製)を各 900 μ L とり、アセトニトリル(QToFMS 用)7.2 mL を加え、THC, THCA-A 100 μ g/mL アセトニトリル溶液 を調製した。

②THC, THCA-A 50 μ g/mL アセトニトリル溶液

①を 3 mL とり、アセトニトリル 3 mL を加えて調整した。

③THC, THCA-A 20 μ g/mL アセトニトリル溶液

②を 4 mL とり、アセトニトリル 6 mL を加えて調製した。

④THC, THCA-A 10 μ g/mL アセトニトリル溶液

③を 4 mL とり、アセトニトリル 4 mL を加えて調製した。

⑤THC, THCA-A 5 μ g/mL アセトニトリル溶液

④を 6 mL とり、アセトニトリル 6 mL 加えて調製した。

⑥THC, THCA-A 2.5 ug/mL アセトニトリル溶液

⑤を 1.0 mL とり, アセトニトリル 1.0 mL 加えて調製した。

⑦THC, THCA-A 2 ug/mL アセトニトリル溶液

⑤を 4 mL とり, アセトニトリル 6 mL を加えて調製した。

⑧THC, THCA-A 1 ug/mL アセトニトリル溶液

⑦を 4 mL とり, アセトニトリル 4 mL を加えて調製した。

⑨THC, THCA-A 0.5 ug/mL アセトニトリル溶液

⑧を 2 mL とり, アセトニトリル 2 mL を加えて調製した。

⑩THC, THCA-A 0.1 ug/mL アセトニトリル溶液

⑨を 2 mL とり, アセトニトリル 8 mL を加えて調製した。

5) 分析法バリデーション

オイル・クッキー・グミ・飲料の試料ごとに, 特異性・検出限界 (LOD), 定量限界 (LOQ), 回収率, 直線性, 精度, および真度を算出した。

①特異性

各ブランクサンプルを 3) 試料溶液の調製, に従って抽出・測定し, Δ^9 -THC 及び THCA-A の保持時間, モニタリングイオンにおける, 試料由来成分の妨害の有無を確認した。

②検出限界 (LOD), および定量限界 (LOQ)

標準溶液を添加したブランク試料において, それぞれ LOD はシグナル対ノイズ比 (S/N) 3 以上, LOQ は 10 以上で評価した。

1. 飲料以外の試料

ブランク試料 200 mg に対して, それぞれ添加量が 20 ng, 50 ng, 200 ng になるように混合標準溶液を添加し, 3) に従って試料調製を行った。試料溶液を 2) の条件で分析・解析し, 得られたピークの S/N 比からそれぞれ LOD・LOQ を求めた。各濃度 3 試料ずつ添加試料の調製および分析・解析を行い, S/N 比の平均値を各濃度の値とした。

2. 飲料

ブランク試料 1 mL に対して, それぞれ添加量が 1 ng, 2.5 ng, 5 ng になるように混合標準溶液を添加し, 3) に従って試料調製を行った。試料溶液を 2) の条件で分析・解析し, 得られたピークの S/N 比からそれぞれ LOD・LOQ を求めた。各濃度 3 試料ずつ添加試料の調製および分析・解析を行い, S/N 比の平均値を各濃度の値とした。

③直線性

1. オイル, グミ, クッキー

各ブランク 3 試料に対し, ブランク試料 200 mg あたり 0.2, 1, 2, 5, 10 μg となるように Δ^9 -THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μL ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し, 得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出し, その平均値を求めた。原点および測定した 5 点の添加量とピーク面積値から検量線を作成し, 各試料それぞれの化合物について R^2 値を求めた。

2. 飲料

ブランク 3 試料に対し, ブランク試料 1 mL あたり 10, 100, 1000 ng となるように Δ^9 -THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μL ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し, 得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出し, その平均値を求めた。原点および測定した 5 点の添加量とピーク面積値から検量線を作成し, それぞれの化合物について R^2 値を求めた。

④回収率

対応する濃度の標準溶液のピーク面積と, 標準溶液をブランク試料に添加して抽出を行った時のピーク面積のパーセンテージ (%) を比較することにより, 3 つの濃度 (低濃度, 中濃度, 高濃度) で評価した (n=3)。

1. オイル, グミ, クッキー

各ブランク 3 試料に対し, ブランク試料 200 mg あたり 0.2, 2, 10 μg となるように Δ^9 -THC, THCA-A

アセトニトリル溶液 100 μ L ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出し、その平均値を求めた。別に 20, 200, 1000 ng/mL の Δ^9 -THC, THCA-A 混合標準溶液を測定し、得られたピーク面積から各試料それぞれの化合物について回収率を求めた。

2. 飲料

ブランク 3 試料に対し、ブランク試料 1 mL あたり 10, 100, 1000 ng となるように Δ^9 -THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μ L ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出し、その平均値を求めた。別に 2, 20, 100 ng/mL の Δ^9 -THC, THCA-A 混合標準溶液を測定し、得られたピーク面積からそれぞれの化合物について回収率を求めた。

⑤精度・真度

1. オイル, グミ, クッキー

各ブランク 3 試料に対し、ブランク試料 200 mg あたり 0.2, 2, 10 μ g となるように Δ^9 -THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μ L ずつを添加した。各試料を B. 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を B. 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出した。④で作成した検量線から各試料・各濃度について化合物ごとの Δ^9 -THC, THCA-A の精度 (RSD) および真度を求めた。

2. 飲料

ブランク 3 試料に対し、ブランク試料 1 mL あたり 10, 100, 1000 ng となるように Δ^9 -THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μ L ずつを添加した。各試料を B. 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を B. 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出した。④で作成した検量線から各試料・各濃度について化合物ごとの Δ^9 -THC, THCA-A の精度 (RSD) および真度を求めた。

6) 実試料の測定

CBD 含有製品オイル・グミ・クッキー・飲料について、3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出した。オイルは Δ^9 -THC の含有量が多く、試料溶液の測定結果が直線性の範囲を逸脱したため、アセトニトリルで 5 倍希釈して再度測定した。④で作成した検量線から各試料 1 g (飲料は 1 mL) あたりの Δ^9 -THC, THCA-A 定量値を算出した。最終的には下記計算式から Δ^9 -THC 総量として換算し、お各試料中の Δ^9 -THC 含量を計算した。

飲料以外: Δ^9 -THC 総量 (μ g/g) = Δ^9 -THC 量 (μ g/g) + 0.877 x THCA-A 量 (μ g/g)

Δ^9 -THC の含量 (%) = Δ^9 -THC 総量 (μ g/g) / 10^6 x 100

飲料: Δ^9 -THC 総量 (ng/mL) = Δ^9 -THC 量 (ng/mL) + 0.877 x THCA-A 量 (ng/mL)

Δ^9 -THC の含量 (%) = Δ^9 -THC 総量 (ng/mL) / 10^9 x 100

C. 結果

1) 分析法バリデーション

分析法バリデーションは B. 5) の方法に従って実施した。

各ブランク試料を分析法に従って抽出・測定し、 Δ^9 -THC 及び THCA-A の保持時間、モニタリングイオンにおいて、すべての試料で試料由来成分の妨害がないことを確認できた (データ示さず)。

各試料の LOD, LOQ, および直線性については表 1 に示した。標準溶液を添加した各ブランク試料を用いて、LOD, LOQ の検討を行ったところ、飲料以外の試料については LOD が 0.25 μ g/g, LOQ が 1 μ g/g となったオイルの THCA-A を除き、すべての試料において Δ^9 -THC および THCA-A の LOD が 0.1 μ g/g, LOQ が 0.25 μ g/g (表 1a) であり、飲料では Δ^9 -THC の LOD が 1 ng/mL, LOQ が 2.5 ng/mL, THCA-A の LOD が 2.5 ng/mL, LOQ が 5 ng/mL であった (表 1b)。各試料での直線性

の検討の結果、検量線の R^2 値は Δ^9 -THC では 0.9933~0.9984, THCA-A では 0.9960~0.9998 と THCA-A の方がより良好な直線性を示した(表 1)。

試料の回収率(recovery), 精度(precision), および真度(accuracy)については表 2 に示した。すべての試料において recovery は, Δ^9 -THC では 95.8~109.5%, THCA-A では 101.6~118.8%の範囲にあり, いずれの試料についても概ね良好であった。Precision は Δ^9 -THC で最大 3.43%以下, THCA-A で最大 6.66%とやや THCA-A でばらつきが大きい傾向が確認されたものの, 概ね良好な結果であった。Accuracy は Δ^9 -THC で 95.2~134.5%, THCA-A で 93.6~108.5%と Δ^9 -THC の低濃度試料で 120%を超える試料が見られたものの, いずれの試料においても中濃度以上の添加試料では良好な結果であった。

2) 実試料の分析

CBD 含有製品(オイル・グミ・クッキー・飲料)について各 3 サンプルを秤量し, 分析・解析した定量結果を表 3 にまとめた。

今回測定用いた試料のうち, オイル試料からは Δ^9 -THC と THCA-A がともに検出され, 分析したオイル試料中の定量値はそれぞれ $140 \pm 1.63 \mu\text{g/g}$ および $1.18 \pm 0.0534 \mu\text{g/g}$ であった。この結果から求められる試料溶液中の Δ^9 -THC 総量は $141 \pm 1.67 (\mu\text{g/g})$, オイル試料中の Δ^9 -THC の含量(%)は 0.0141 %と算出された。グミ試料からは測定の結果 Δ^9 -THC のみが検出されその量は $3.36 \pm 0.116 \mu\text{g/g}$, 含量(%)は 0.000336 %であった。クッキーからは検出下限を上回ると思われる Δ^9 -THC のピークが確認されたが, 同一精密質量 (m/z 315.2319 \pm 10 mDa)の抽出イオンクロマトグラム上に保持時間が近接し, 完全分離できないピークが認められたため正確な定量を実施することができなかった(図 1)。飲料試料からは Δ^9 -THC および THCA-A に該当するピークは検出されなかった。

D. 考察

1) 感度について

今回の検討では, 分析法の感度は良好であり, 定量性に問題ない感度が得られていると考えられた。オイルの THCA-A で LOQ が直線性の検討範囲の下限値と同じ $1 \mu\text{g/g}$ であったが, 当該濃度での S/N 比は 3 試行の平均値で 21.9 と 10 を大きく上回っており, 実際にはより低い濃度まで定量性を担保できるものと考えられた。

本検討において質量分析の条件については, 同一メーカーの装置(6545 LC/Q-TOF MS system, Agilent Technologies, CA, USA)を用いて Δ^9 -THC および THCA-A を含むカンナビノイドに対して最適化の検討を行った既報¹⁾の条件を採用した。詳細な検討は実施していないが, Capillary voltage, Nozzle Voltage, Fragmentor, Skimmer のパラメータを上下に変動させて分析したところ, 両化合物のプロトン化イオンをともに感度よく検出できたのが当該条件であったため, そのまま用いた。本条件下では $[M+H-H_2O]^+$ と一致する m/z 343.2111 の抽出イオンクロマトグラム上に, THCA-A と保持時間が合致したピークが見られており, こちらのイオンの検出について条件の最適化を行うことでも感度の改善が期待できるかもしれない。

2) 直線性について

直線性の検討では, Δ^9 -THC において高濃度領域でピークが飽和し, やや検量点が直線から外れているものが確認された。その傾向は R^2 値が 0.9934 と最も低かったオイル試料において最も顕著であった(図 2a, 表 2)。オイル試料の検量点のうち, 高濃度領域 2 点(50, 100 $\mu\text{g/g}$)を LOQ, LOD の確認に用いた低濃度試料 2 点(0.1, 0.25 $\mu\text{g/g}$)に置き換えたところ R^2 値は 0.9999 となり, 直線性は大きく改善された(図 2b, 表 4)。同じように検量点を置き換えた検量線で R^2 値を確認したところ, グミ試料では 0.9998, クッキー試料では 0.9999 と共に直線性は大きく改善された。飲料で

は最も高い添加濃度 (500 ng/mL) の試料を (5 ng/mL) に置き換えたところ、0.9969 であった R² 値は 0.9990 となり、直線性は改善された (表 4)。

3) Recovery・Precision・Accuracy について

Recovery はオイルの低濃度 Δ^9 -THC 試料 (1 $\mu\text{g/g}$) で 95.8 % と 100% を下回ったのを除き、すべての試料で 100% を上回った。濃度レベルによる一定の傾向は確認できなかったが、結果が 110% を超えたものは THCA-A のみであり、 Δ^9 -THC と比較すると recovery が高い傾向が見られた。しかしながら、回収率の範囲はすべての濃度・化合物・マトリックスにおいて 95.8 ~ 118.8% と 70 ~ 120% の範囲に収まっており、定量ではなく限度値との対比という観点では限度値相当の濃度の標準溶液を分析し、前処理した試料溶液と比較することで可能かもしれない。

Precision は低濃度試料で高い傾向が見られ、また化合物間の比較では THCA-A において高い傾向が確認された。低濃度試料では、ベースラインの乱れやマトリックス等の影響を受けやすく、精度を下げる要因となったと考えられた。本条件では Δ^9 -THC に比べて THCA-A の感度がやや低かったことから、化合物間で比較すると THCA-A の方がより精度が低い傾向が見られたものと推定された。Precision については、最大でも 6.66% であり分析法の性能として問題ないものと考えられた。

Accuracy については、 Δ^9 -THC の低濃度・中濃度領域で 120% を超える試料が見られた。これは D. 2) で述べたように高濃度領域でピークが飽和し、濃度に対してピーク面積が小さくなっていることに起因すると思われた。D. 2) において作成した、高濃度領域の検量点を低濃度領域に置換した検量線を用いて Accuracy を算出したところ、その直線性範囲に含まれる低濃度 ~ 中濃度領域ではすべての試料で 96.4% ~ 113.4% の範囲であり、良好な結果となった (表 4)。高濃度領域についても算出したところ、80.3% ~ 86.6% とピークの飽和に

よる影響でやや低かったものの、許容範囲内であった。

THCA-A については元の検量線を用いた場合でも Accuracy が 93.6% ~ 108.5% と良好な結果が得られた。 Δ^9 -THC と異なり THCA-A は検量線の R² 値が低いもので 0.9960 と比較的直線性が良好であり、特に高濃度領域での明確なピーク面積低下等は確認できなかったことから、低濃度領域においても 100% に近い結果が得られたものと考えられた。

4) 実試料の分析結果について

4 種類の CBD 含有製品 (オイル・グミ・クッキー・飲料) の分析結果は表 3 の通りであり、オイル試料溶液からは Δ^9 -THC, THCA-A が検出され、その総 Δ^9 -THC 量は限度値として想定した 0.001% を上回っていた。グミ試料溶液からは想定限度値を下回る量の Δ^9 -THC が確認され、飲料試料溶液からは LOD を超える Δ^9 -THC, THCA-A は検出されなかった。

クッキー試料溶液においては、LOD を上回る Δ^9 -THC の検出が疑われたが、同一精密質量 (m/z 315.2319 \pm 10 mDa) の抽出イオンクロマトグラム上に保持時間が近接した妨害ピークが確認された。完全分離できておらず、正確な定量が期待できないことから今回は「定量できず」としている。しかし、確認された妨害ピークは完全分離ではないものの分離はできている。今回は含有する Δ^9 -THC 量が少ないため、妨害ピークの肩として確認されたが、妨害ピークは想定限度値の相当の Δ^9 -THC と比較するとおおむねピーク高さが半分程度であり、今回の試料については限度値相当を上回らないという判定はできるものと考えられた。

本検討で分析法バリデーションに用いたクッキーの試料溶液では、 m/z 315.2319 \pm 10 mDa の抽出イオンクロマトグラム上に Δ^9 -THC 定量の妨害となるピークは確認されておらず、実試料との結果の相違から、ブランク試料・実試料共に分析

対象試料を増やして検討する必要があるものと考えられた。

5) その他

本研究で分析対象とした Δ^9 -THC は麻薬及び向精神薬取締法の麻薬に該当し、日本においては標準品の入手に通常の化合物と比べて多大なコストがかかるだけでなく、発注から入手までおおむね半年程度の時間を要すると考えられる。大麻由来製品中に含まれる微量 Δ^9 -THC の定量には標準品の整備が必須であり、監視指導等を目的として定量分析を継続的に実施するには、国内の分析機関において安価かつ短納期で入手しうる、安定な供給体制の整備が重要であると考えられた。

また、 Δ^9 -THC には2か所の不斉炭素に由来する立体異性体や、不飽和結合の位置異性体などを含めて数多く同一組成式(精密質量)の類縁化合物が多数存在している。今回用いたLC分離条件では不飽和結合の位置異性体について過去に分離が確認されているが、分離の確実性という観点からは同じ条件下で標準品を用いて異性体等の分析を実施して分離を確認することが好ましい。中には標準品の入手が極めて困難な化合物もあるが、今回の法改正により入手しやすくなる化合物もあると考えられる。今後、 Δ^9 -THC のみならず異性体や類縁化合物等も含めて、必要な標準品の供給体制整備に期待したい。

E. 結論

今回分析対象としたブランク試料ならびにCBD製品の実試料においては、本検討で用いた分析条件を用いて、総 Δ^9 -THC 量の限度値として想定した 0.001 % (飲料は 0.00001%)を超える含有の有無について判定しうるものと考えられた。

しかしながら、本検討に供した製品はオイル・グミ・クッキー・飲料のブランク試料・実試料それぞれ1製品ずつのみであった。その中でもクッキーの実試料で Δ^9 -THC 量の妨害となるピークが確認

されている。分析対象を拡充・充実させるとともに、詳細な分離条件の検討を加え、確実な定量を実施できる条件を設定する必要があると考えられた。

また、 Δ^9 -THC をはじめとして大麻関連化合物の標準品は入手が困難なものが多く存在している。LC-QTOF/MS の分析では、同一精密質量の化合物との識別が重要であり、 Δ^9 -THC の異性体・類縁化合物等を含めて、十分な種類の標準品を整備しうる環境づくりが望まれる。

F. 参考文献

- 1) Song L, Carlson S, Valenzuela G, Chao M, Pathipaka S B: Development of a validated method for rapid quantification of up to sixteen cannabinoids using ultra-high-performance liquid chromatography diode-array detector with optional electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*. 2022; 1670: 462953.
- 2) Song L, Valenzuela G, Carlson S, Zachary D, Adisa M: Potency testing of up to twenty cannabinoids by liquid chromatography diode array detector with optional electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2022; 1207: 339827.
- 3) Lee J H, Min A Y, Han J H, Yang Y J, Kim H, Shin D: Development and validation of LC-MS/MS method with QuEChERS clean-up for detecting cannabinoids in foods and dietary supplements. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2020; 37: 1413.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

学会発表

なし

論文発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 オイル・グミ・クッキー試料(a)および飲料(b)における検量線の直線性と感度

a.

	Δ9-THC				THCA-A			
	Range (μg/g)	R ²	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)	Range (μg/g)	R ²	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
オイル	1 - 50	0.9933	0.1	0.25	1 - 50	0.9960	0.25	1
グミ	1 - 50	0.9977	0.1	0.25	1 - 50	0.9993	0.1	0.25
クッキー	1 - 50	0.9984	0.1	0.25	1 - 50	0.9992	0.1	0.25

b.

	Δ9-THC				THCA-A			
	Range (ng/mL)	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Range (ng/mL)	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
飲料	10 - 500	0.9969	1	2.5	10 - 500	0.9998	2.5	5

表2 オイル・グミ・クッキー試料(a)および飲料(b)における回収率(recovery), 精度(precision), および真度(accuracy)

a.

	Δ9-THC				THCA-A			
	Conc. (μg/g)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)	Conc. (μg/g)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)
オイル	1	94.8	3.19	114.8	1	103.8	4.55	110.5
	10	109.9	2.34	112.9	10	110.0	1.38	111.1
	50	106.3	1.37	98.5	50	111.6	1.15	97.7
グミ	1	105.4	3.96	136.2	1	115.1	5.46	102.7
	10	104.3	0.64	118.6	10	113.0	0.49	102.9
	50	103.8	0.47	98.8	50	105.5	0.23	98.7
クッキー	1	105.8	3.06	130.4	1	106.7	4.96	110.9
	10	101.9	1.47	116.5	10	110.5	1.53	104.8
	50	102.3	1.09	98.0	50	105.5	0.74	99.2

b.

	Δ9-THC				THCA-A			
	Conc. (ng/mL)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)	Conc. (ng/mL)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)
飲料	10	106.5	5.15	128.7	10	115.5	6.79	106.5
	100	107.2	1.28	114.3	100	109.5	1.63	95.2
	500	106.8	0.85	95.3	500	115.1	0.66	93.1

表 3 実試料の定量結果 (n=3)

	限度値	$\Delta 9$ -THC (ug/g)	THCA-A (ug/g)	THCとしての総量	THCとしての含有%
オイル	0.001%	140±1.63	1.18±0.0534	141±1.67	0.0141%
グミ	0.001%	3.36±0.116	N.D.	3.36±0.116	0.0003%
クッキー	0.001%	定量できず(*)	N.D.	定量できず(*)	定量できず(*)
飲料	0.00001%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*測定成分ピークと重複するピークが存在したため

N.D.; Not Detected

表 4 分析法バリデーションにおいて検量点を置き換えて算出した精度 (Accuracy)

	オイル	グミ	クッキー		飲料
Conc. ($\mu\text{g/g}$)	Accuracy (%)	Accuracy (%)	Accuracy (%)	Conc. (ng/mL)	Accuracy (%)
1	100.0	112.3	106.8	10	113.4
10	99.6	99.3	96.4	100	105.3
50	84.3	80.3	81.4	500	86.6

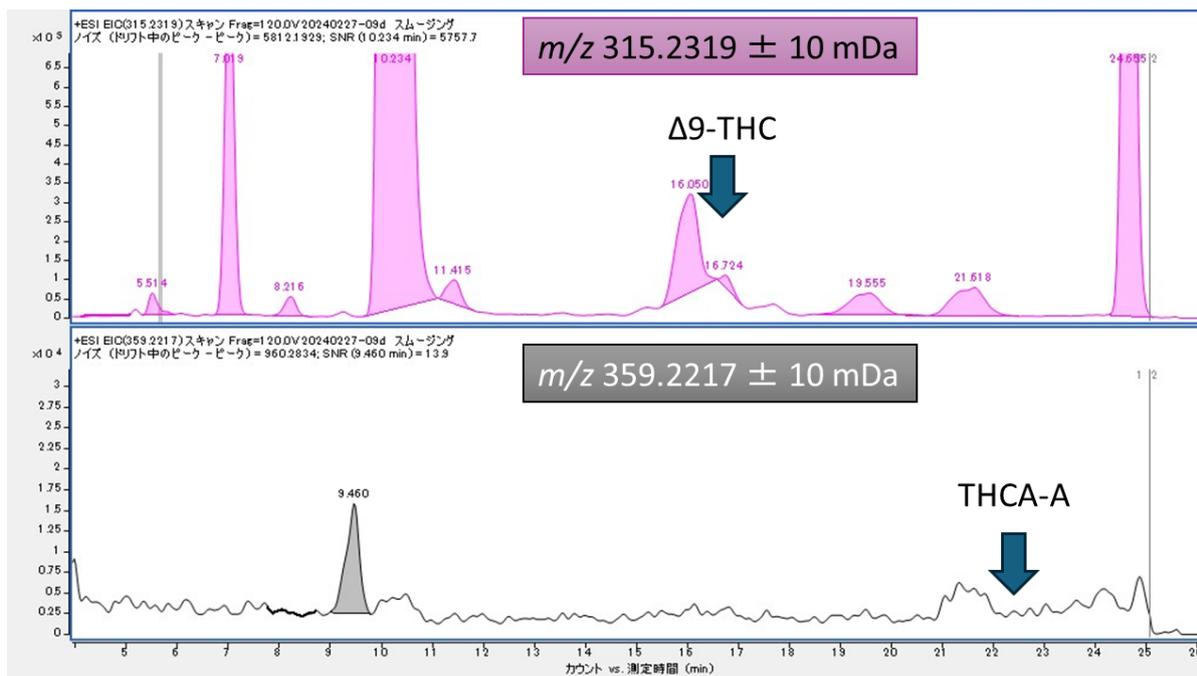


図 1 試料溶液（クッキー）の代表的な抽出イオンクロマトグラム

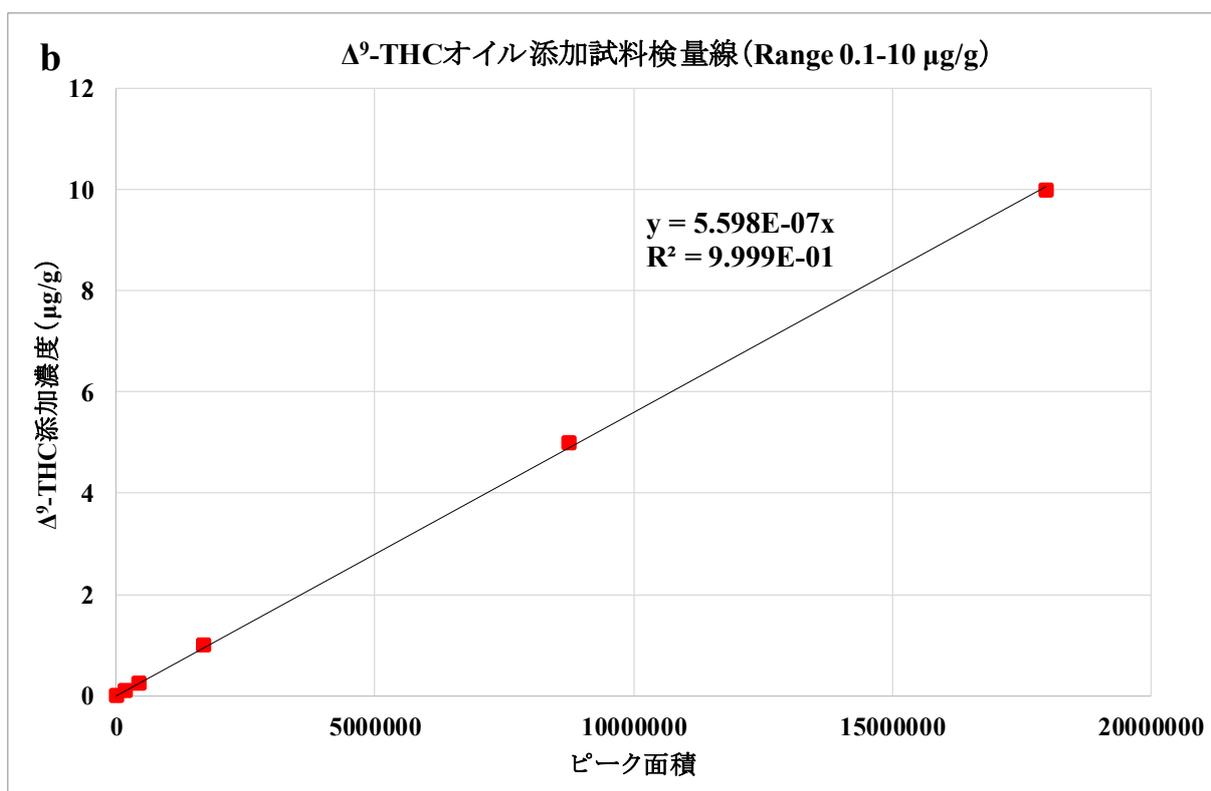
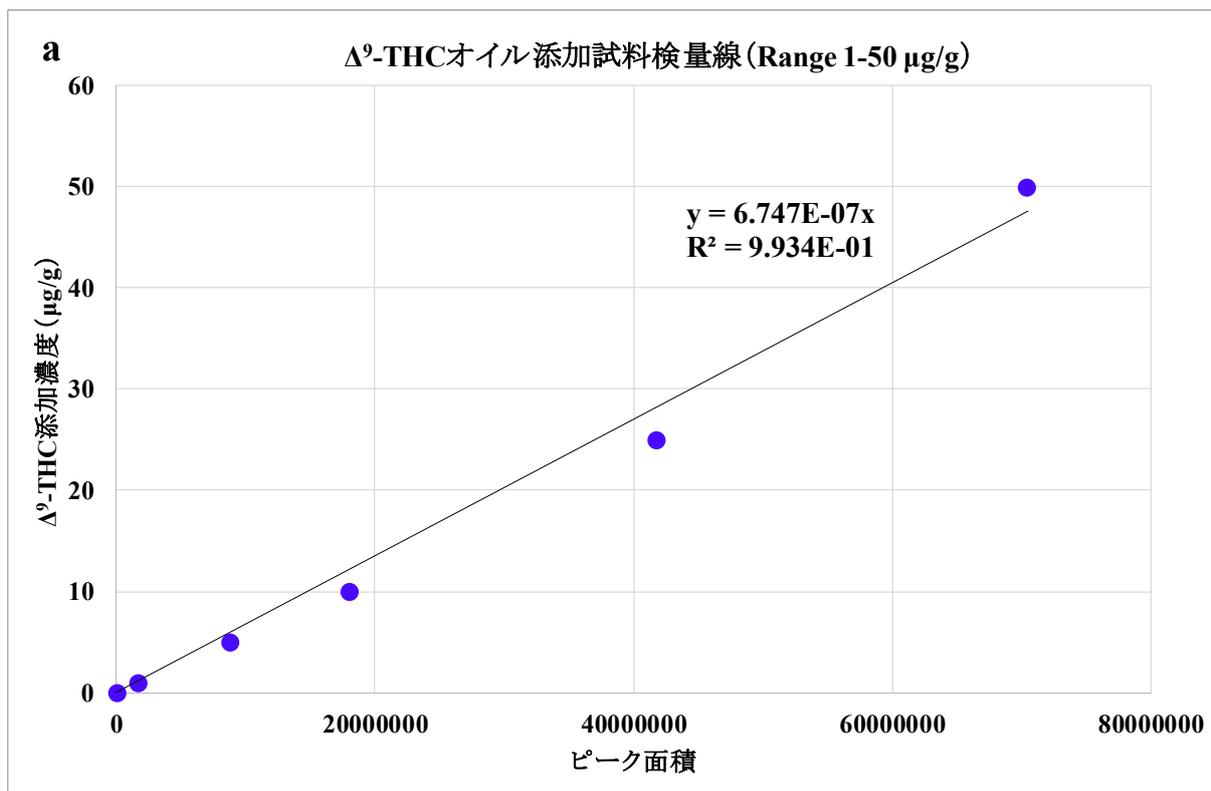


図2 範囲 1-50 $\mu\text{g/g}$ (a)および 0.1-10 $\mu\text{g/g}$ (b)におけるオイル添加試料の Δ^9 -THC 検量線

分担研究課題:分析法案の策定と分析法の妥当性評価(LC-QTOF MS)2

研究分担者:浅田 安紀子 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 主任研究員

LC-QTOF MSによる大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THCの
分析法妥当性評価と実試料の測定 2

研究要旨:大麻取締法及び麻薬及び向精神薬取締法の一部改正に伴い、大麻の適切な使用を促進する方向性が示されている。大麻由来製品である cannabidiol (CBD) 製品には、麻薬である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)に加えて、熱や光によって容易に Δ^9 -THCへ変化する tetrahydrocannabinolic acid (THCA-A)が微量に残留する可能性があるため、製品の安全性を担保するために製品中の THC 限度値を設定する必要が生じた。対象となる成分が設定限度値を下回るかどうか判断するためには、これら2成分を同時に定量可能な分析法が必要となる。

本研究ではオイル・グミ・クッキーおよび飲料の 4 製品群を対象として、分析法開発に必要な分析法妥当性評価(バリデーション)を実施した。さらに各群の実試料(CBD 含有を標榜する製品)を用いて Δ^9 -THC および THCA-A 含有量の測定を実施した。本報告書ではバリデーション検討および実試料測定の結果とともに、実際の分析作業において留意すべき点について記述する。

A. 研究目的

大麻由来製品(CBD含有製品)の適切な品質管理を指向した微量 Δ^9 -THCの定量分析法の開発を行う。具体的には分析法妥当性評価の実施と実試料への適用について、液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS)を用いた検討を行う。

なお、本報告ではCBD製品中の Δ^9 -THC含有限度値について、食品0.001%、飲料0.00001%と仮定して検討を実施している。

B. 研究方法

1) 試薬および試料

①試薬

Δ^9 -THC 1 mg/mL メタノール溶液 (Cerilliant 製)および THCA-A 1 mg/mL アセトニトリル溶液 (Cayman 製)は国立医薬品食品衛生研究所より譲渡されたものを用いた。その他試薬は富士フ

ィルム和光純薬株式会社製を用いた。試料前処理には EN Method QuEChERS Clean-up Kit, General Fruits and Vegetables, 15 mL Tube (Thermo Scientific 製)または DisQuE 900 mg MgSO₄ & 150 mg PSA, 15 mL Tube (Waters 製)を用いた。

②試料

分析法妥当性評価の空試料(いずれの cannabinoid も含まないことが知られている)には市販品のオリーブオイル・グミ・クッキーおよびミネラルウォーターを用いた。

CBD 含有製品は研究代表者より送付されたオイル・グミ・クッキー・飲料を用いた。

2) 機器および分析条件

①使用機器(LC-QTOF/MS)

6546 LC/Q-TOF MS system および 1290 Infinity II UHPLC system (Agilent Technologies, CA,

USA)

液体クロマトグラフ(LC)分離条件

カラム:CAPCELL PAK C18 MG II Column (3 μ m, 2.0 \times 100 mm) (大阪ソーダ製)

カラム温度:40 $^{\circ}$ C, サンプルクーラー温度:25 $^{\circ}$ C

流速:0.3 mL/min, 注入量:1 μ L(飲料は 5 μ L),

移動相 A:0.1% ギ酸水溶液,

移動相 B:0.1% ギ酸アセトニトリル溶液,

グラジエント条件:A/B = 95/5-35/65(3 min, 17 min hold)-0/100 (25 min, 5 min hold) [-95/5(31 min, 5 min hold)]

③質量分析(MS)測定条件

質量分析装置の条件は既報^{1), 2)}を参考に最適化した(別途研究分担者の報告を参照)。

Ion source: Dual-AJS ion source, Ionization: ESI positive mode, Gas temperature: 325 $^{\circ}$ C, Gas: N₂, Drying Gas: 10 L/min, Nebulizer: 20 psi, Sheath Gas Temperature: 400 $^{\circ}$ C, Sheath Gas Flow: 12 L/min, Capillary voltage: 3000 V, Nozzle Voltage: 600 V, Fragmentor: 120 V, Skimmer: 45 V, Oct 1 RF Vpp: 750 V, Mass spectral range: m/z 100–1000, MS reference mass ions: 121.0509 and 922.0098

④解析条件

取得データの解析には Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 を用いた。 Δ^9 -THC の定量には m/z 315.2319 \pm 10 mDa, THCA-A の定量には m/z 359.2217 \pm 10 mDa の抽出イオンクロマトグラムを用いた。

3) 試料溶液の調製³⁾

①オイル・クッキー

1. 試料(クッキーは細かく粉砕した)約 200 mg を 15 mL チューブに精密に量り取った。
2. ジクロロメタン 1 mL, 水 1 mL を加え, よく振り混ぜた後, アセトニトリル 5 mL 程度を加えた。
3. 超音波抽出を 30 分間行い, 室温に戻した後, ギ酸 100 μ L とアセトニトリルを加えて 10 mL にメスアップした。
4. 内容物を新しい 15 mL 遠心チューブにうつし,

冷凍(-20 $^{\circ}$ C)で 30 分間静置した。

5. 5 $^{\circ}$ C で 5 分間, 4000 rpm で遠心分離した。

6. 上清 5 mL を QuEChERS dSPE チューブへ入れ, よく振り混ぜた。

7. 5 $^{\circ}$ C で 5 分間, 4000 rpm で遠心分離した。

8. 上清を 0.2 μ m フィルター(コスモスピンフィルタ-G, ナカライテスク(株)製)で遠心ろ過し, 試料溶液とした。

②グミ

1. 試料はハサミで細切し, 冷凍(-20 $^{\circ}$ C)で一晩静置した。

2. 試料約 200 mg を 15 mL チューブに精密に量り取り, 4. の冷凍処理を除き, ①2~8. の操作を実施して試料溶液を調製した。

③飲料

1. 試料 1 mL にアセトニトリルおよびギ酸 50 μ L を加え, アセトニトリルで 5 mL にメスアップした。

2. 全量を QuEChERS dSPE チューブへ移した。

3. よく振り混ぜた後, 5 $^{\circ}$ C で 5 分間, 4000 rpm で遠心分離した。

4. 上清を 0.2 μ m フィルターでろ過し, 試料溶液とした。

4) 混合標準溶液の調製

①THC, THCA-A 100 μ g/mL アセトニトリル溶液

Δ^9 -THC 1 mg/mL メタノール溶液および THCA-A 1 mg/mL アセトニトリル溶液を各 900 μ L とり, アセトニトリル 7.2 mL を加え, THC, THCA-A 100 μ g/mL アセトニトリル溶液を調製した。

②THC, THCA-A 50 μ g/mL アセトニトリル溶液

①を 3 mL とり, アセトニトリル 3 mL を加えて調製した。

③THC, THCA-A 20 μ g/mL アセトニトリル溶液

②を 4 mL とり, アセトニトリル 6 mL を加えて調製した。

④THC, THCA-A 10 μ g/mL アセトニトリル溶液

③を 4 mL とり, アセトニトリル 4 mL を加えて調製した。

⑤THC, THCA-A 5 μ g/mL アセトニトリル溶液

④を6 mLとり、アセトニトリル 6 mL 加えて調製した。

⑥THC, THCA-A 2.5 ug/mL アセトニトリル溶液

⑤を1.0 mLとり、アセトニトリル 1.0 mL 加えて調製した。

⑦THC, THCA-A 2 ug/mL アセトニトリル溶液

⑤を4 mLとり、アセトニトリル 6 mL を加えて調製した。

⑧THC, THCA-A 1 ug/mL アセトニトリル溶液

⑦を4 mLとり、アセトニトリル 4 mL を加えて調製した。

⑨THC, THCA-A 0.5 ug/mL アセトニトリル溶液

⑧を2 mLとり、アセトニトリル 2 mL を加えて調製した。

⑩THC, THCA-A 0.1 ug/mL アセトニトリル溶液

⑨を2 mLとり、アセトニトリル 8 mL を加えて調製した。

調製した混合標準溶液は-20 °C で保管し、分析時に室温に戻して使用した。また、①～⑩に記載のない濃度の混合標準溶液については、①～⑩を用いて適宜アセトニトリル希釈して調製した。

5) 分析法妥当性評価

オイル・グミ・クッキー・飲料の試料ごとに、特異性・検出限界 (LOD)・定量限界 (LOQ)・回収率・直線性・精度および真度を算出した。

①特異性

各空試料を分析法に従って抽出・測定し、 Δ^9 -THC および THCA-A の保持時間、各抽出イオンクロマトグラムにおいて試料由来成分の妨害がないことを確認した (n=1)。

②LOD および LOQ

標準溶液を添加した空試料において、それぞれ LOD はシグナル対ノイズ比 (S/N) 3 以上、LOQ は 10 以上で評価した (n=3)。

1. オイル・グミ・クッキー

空試料 200 mg に対して、それぞれ添加量が 20, 50, 200 ng になるように混合標準溶液を添加し、3) に従って試料調製を行った。試料溶液を 2) の

条件で分析・解析し、得られたピークの S/N 比からそれぞれ LOD・LOQ を求めた。各濃度 3 試料ずつ添加試料の調製および分析・解析を行い、S/N 比の平均値を各濃度の値とした (n=3)。

2. 飲料

空試料 1 mL に対して、それぞれ添加量が 1, 2.5, 5 ng になるよう混合標準溶液を添加し、B. 3) に従って試料調製を行った。試料溶液を 2) の条件で分析・解析し、得られたピークの S/N 比からそれぞれ LOD・LOQ を求めた。各濃度 3 試料ずつ添加試料の調製および分析・解析を行い、S/N 比の平均値を各濃度の値とした (n=3)。

③回収率

対応する濃度の標準溶液のピーク面積と、標準溶液を空試料に添加して抽出を行った時のピーク面積のパーセンテージ (%) を比較することにより、3 濃度 (低濃度、中濃度、高濃度) で評価した (n=3)。

④直線性

1. オイル・グミ・クッキー

各空試料 200 mg あたり 0.2, 1, 2, 5, 10 μg となるように THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μL ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出し、その平均値を求めた。原点および測定した 5 点の添加量とピーク面積値から検量線を作成し、各試料それぞれの化合物について R^2 値を求めた (n=3)。

2. 飲料

空試料 1 mL あたり 10, 50, 100, 250, 500 ng となるように THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μL ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出し、その平均値を求めた。原点および測定した 5 点の添加量とピーク面積値から検量線を作成し、それぞれの化合物について R^2 値を求めた (n=3)。

⑤精度および真度

1. オイル・グミ・クッキー

各空試料 200 mg あたり 0.2, 2, 10 μg となるように THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μL ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出した。④で作成した検量線から各試料・各濃度について化合物ごとの Δ^9 -THC, THCA-A の精度 (RSD) および真度を求めた (n=3)。

2. 飲料

空試料 1 mL あたり 10, 100, 500 ng となるように THC, THCA-A アセトニトリル溶液 100 μL ずつを添加した。各試料を 3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出した。④で作成した検量線から各試料・各濃度について化合物ごとの Δ^9 -THC, THCA-A の精度 (RSD) および真度を求めた (n=3)。

6) 実試料分析

CBD 含有製品オイル・グミ・クッキー・飲料について、3) に従って抽出し、得られた試料溶液を 2) の条件で分析して各化合物のピーク面積を算出した。④で作成した検量線から各試料溶液の Δ^9 -THC および THCA-A 定量値を算出した。最終的には下記計算式を用いて Δ^9 -THC 総量として換算し、各試料中の Δ^9 -THC 含量を計算した (n=3)。

Δ^9 -THC 総量の計算式:

【オイル・グミ・クッキー】 Δ^9 -THC 総量 ($\mu\text{g/g}$) = Δ^9 -THC 量 ($\mu\text{g/g}$) + 0.877 x THCA-A 量 ($\mu\text{g/g}$)

【飲料】 Δ^9 -THC 総量 (ng/mL) = Δ^9 -THC 量 (ng/mL) + 0.877 x THCA-A 量 (ng/mL)

Δ^9 -THC 含量の計算式:

【オイル・グミ・クッキー】 Δ^9 -THC の含量 (%) = Δ^9 -THC 総量 ($\mu\text{g/g}$) / 10^6 x 100

【飲料】 Δ^9 -THC の含量 (%) = Δ^9 -THC 総量 (ng/mL) / 10^9 x 100

C. 結果

1) 分析法妥当性評価

結果を表1に示した。分析した4種類の空試料については妨害となるピークを認めず、特異性を確認した。 Δ^9 -THC および THCA-A の LOQ は全ての場合で設定した検量線の下限值を下回った。また LOD は LOQ の 0.25~0.5 倍の濃度であった。回収率はすべての試料・成分で 94.8%~115.5% と良好な結果であった。

検量線の直線性については R^2 値で評価した。 Δ^9 -THC の R^2 値は 0.9978~0.9984 であり 0.999 を下回った一方、THCA-A の R^2 値は 0.9992~0.9999 であり良好な結果であった。THCA-A と比較して Δ^9 -THC の R^2 値がやや低かった要因としては高濃度側のサチュレーションが考えられる。

精度については検討した3濃度(低濃度, 中濃度, 高濃度)のうち, Δ^9 -THC および THCA-A の低濃度試料で数値が大きくなる傾向にあったが, 最大でも 6.79%であった。真度については Δ^9 -THC の低濃度添加試料で 120%を超えるものが見られたが, Δ^9 -THC の中・高濃度および THCA-A の場合は 93.1%~118.6%となった。

2) 実試料分析

結果を表2に示した。各成分の定量値については 1) で作成した検量線に基づき、算出した。オイルからは Δ^9 -THC および THCA-A が検出された。ただし Δ^9 -THC は前述の方法に従って調製した溶液では検量線の濃度範囲を超えていたため、アセトニトリルで5倍希釈した溶液の面積値ピークを計算に用いた。THCとしての含有率は 0.0140% となり、今回想定している限度値を超過していた。グミおよびクッキーからは THCA-A は検出されず、 Δ^9 -THC のみが検出された。定量分析の結果、グミは 0.000306% の THC を含んでいた。クッキーは本分析条件では近傍に重複するピークとの完全な分離ができず、定量を実施できなかった。ただし夾雑ピークを考慮しても限度値 0.001% を超える含有量ではないと考えられた。また、飲料からは

いずれの対象成分も検出されなかった。すべての実試料からCBDと思われるピークが検出されたが、標準品がないため同定はできなかった。

D. 考察

本項では、分析法妥当性評価および実試料分析において留意すべき点について述べる。

1) 試料処理方法について

分析法妥当性評価および実試料分析中で、同一試料を分析した場合(n=3)のばらつきは7%以内に収まっていた。しかし今後分析対象とするCBD製品(特に固形試料)では測定対象成分が試料中に不均一に含まれていることが想定される。試料の性状に応じて、適宜秤取量や定容量が変更可能な分析方法とすることが望ましい。今回の分析では、試料の均一化が困難であったグミについては細切して分析を実施した。作業時、試料に含まれる糖分が器具に粘着して妨げとなったため、細切作業前に冷凍庫(-20℃)にてグミを十分冷やしたところ、器具への粘着が大幅に抑えられ、作業性が向上した。また、固形試料(特にクッキー)について、試料を処理する際に不溶物が生じた。この不溶物について、同時に分析を行った研究分担者AおよびBの2名で、定容時の処理を異なる方法で実施した。すなわち、分担者Aは生じた不溶物と液体をできる限りメスフラスコに移して定容したのに対し、分担者Bはなるべく不溶物を除く液体のみをメスフラスコに移して定容した。この操作による分析結果の比較を行ったところ、不溶物の処理方法の違いによる差異は特に認められなかった。

QuEChERSキットで処理を行う際、吸水による発熱が認められた。すなわち、ほぼ水分で構成されている飲料を処理する場合、キットに含まれる脱水剤の影響が大きくなる。飲料への添加回収実験(添加量100ng)の際、QuEChERSキットを使用してなるべく速やかに調製した試料溶液とQuEChERSキット処理を省略した試料溶液の分析結果を比較したところ、 Δ^9 -THCの回収率は平

均値で10%程度低下した。これはキットを用いた場合に溶液中の測定対象成分が濃縮されているためと考えられ、定量値が設定限度値付近となる場合は特に注意が必要である。

2) 機器分析および解析結果について

Δ^9 -THCの定量について、今回検討した範囲(原点を含む)における6点検量線の場合、高濃度域でサチュレーションの恐れがある(別途研究分担者の報告を参照)。より正確な定量を実施するためには、使用する分析機器に合わせた適当な濃度範囲において、測定対象と同程度の標準溶液を用いた定量を実施することが望ましい。

CBD製品中の Δ^9 -THC含有限度値を食品0.001%、飲料0.00001%と仮定した場合、本分析法でいずれも定量可能であった。ただし、分析法妥当性評価において低濃度の場合は精度・真度のばらつきが大きかったこと、実試料(クッキー)では他ピークの影響により定量が困難であったことを踏まえると、分析機器の状態や製品の夾雑成分により分析結果が大きく影響されると推察される。本報告ではMS部分を除く機器分析条件の検討を十分に実施できていないため、今後夾雑成分とのピーク分離のためにグラジエント条件の変更等を検討するべきと考えられる。試料溶液の調製方法を変更することも考えられるが、CBD等の測定対象外のカンナビノイドを多量に含む試料溶液を分析することで機器への負担が大きくなることに考慮が必要である。また、対象成分の検出を確認するために異なる分析機器を併用することも重要と考える。

3) その他

分析対象成分である Δ^9 -THCは麻薬に該当するため、当該標準品の入手には長期間を要するうえ金銭的負担が大きい。さらに定量時にマトリックス検量線を作成する場合、必要な標準品量は増加する。現状、国内で検査機関が安定して定量分析を実施するためには体制が不十分と思われる。

る。また標準品の保存方法や使用期限についても指針が示されるべきである。

E. 結論

今回検討した分析法は、CBD 製品に含まれる恐れのある微量 Δ^9 -THC および THCA-A について、総含有量として食品 0.001%、飲料 0.00001% の定量が可能であった。ただし、様々な要素によって定量可能な範囲が影響されることを鑑みて、使用する分析機器で適宜分析条件の最適化を図る必要がある。また、今回検討を実施した製品と異なる性状の CBD 製品にも対応可能な分析法とするには、引き続き慎重な検討が必要と考えられる。

F. 参考文献

- 1) Song L, Carlson S, Valenzuela G, Chao M, Pathipaka S B: Development of a validated method for rapid quantification of up to sixteen cannabinoids using ultra-high-performance liquid chromatography diode-array detector with optional electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*. 2022; 1670: 462953.
- 2) Song L, Valenzuela G, Carlson S, Zachary D, Adisa M: Potency testing of up to twenty cannabinoids by liquid chromatography diode array detector with optional electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2022; 1207: 339827.
- 3) Lee J H, Min A Y, Han J H, Yang Y J, Kim H, Shin D: Development and validation of LC-MS/MS method with QuEChERS clean-up for detecting cannabinoids in foods and dietary supplements. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2020; 37: 1413.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

学会発表

なし

論文発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 分析法妥当性評価結果(LC-QTOF/MS)

	Δ9-THC				THCA-A			
	Range (μg/g)	R ²	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)	Range (μg/g)	R ²	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
オイル	1 - 50	0.9981	0.1	0.25	1 - 50	0.9992	0.25	1
グミ	1 - 50	0.9978	0.1	0.25	1 - 50	0.9994	0.1	0.25
クッキー	1 - 50	0.9984	0.1	0.25	1 - 50	0.9994	0.1	0.25

	Δ9-THC				THCA-A			
	Range (ng/mL)	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Range (ng/mL)	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
飲料	10 - 500	0.9978	1	2.5	10 - 500	0.9999	2.5	5

	Δ9-THC				THCA-A			
	Conc. (μg/g)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)	Conc. (μg/g)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)
オイル	1	94.8	3.19	114.8	1	103.8	4.55	110.5
	10	109.9	2.34	112.9	10	110.0	1.38	111.1
	50	106.3	1.37	98.5	50	111.6	1.15	97.7
グミ	1	105.4	3.96	136.2	1	115.1	5.46	102.7
	10	104.3	0.64	118.6	10	113.0	0.49	102.9
	50	103.8	0.47	98.8	50	105.5	0.23	98.7
クッキー	1	105.8	3.06	130.4	1	106.7	4.96	110.9
	10	101.9	1.47	116.5	10	110.5	1.53	104.8
	50	102.3	1.09	98.0	50	105.5	0.74	99.2

	Δ9-THC				THCA-A			
	Conc. (ng/mL)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)	Conc. (ng/mL)	Recovery (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)
飲料	10	106.5	5.15	128.7	10	115.5	6.79	106.5
	100	107.2	1.28	114.3	100	109.5	1.63	95.2
	500	106.8	0.85	95.3	500	115.1	0.66	93.1

表2. 実試料分析(LC-QTOF/MS)

	Δ^9 -THC (ug/g)	THCA-A (ug/g)	THC としての総量	THC としての含有%
オイル	139 ± 4.29	1.22 ± 0.0398	140 ± 4.30	0.0140%
グミ	3.06 ± 0.106	N.D.	3.06 ± 0.106	0.000306%
クッキー	定量できず(*)	N.D.	定量できず(*)	定量できず(*)
飲料	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*測定成分ピークと重複するピークが存在したため

N.D.; Not Detected

研究成果の刊行に関する一覧表

特になし

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学特別研究事業

2. 研究課題名 大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THCの試験法策定に資する研究 (23CA2026)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医薬安全科学部・部長

(氏名・フリガナ) 花尻 瑠理・ハナジリ ルリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学特別研究事業

2. 研究課題名 大麻由来製品中に混在する微量Δ⁹-THCの試験法策定に資する研究 (23CA2026)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生薬部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 田中 理恵・タナカ リエ

4. 倫理審査の状況

Table with 5 columns: Item, 該当性の有無 (有/無), and 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) (審査済み, 審査した機関, 未審査 (※2)). Rows include ethics guidelines for life science, clinical research, animal experiments, and other specific guidelines.

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

Table with 2 columns: 研究倫理教育の受講状況, 受講 (checked) / 未受講 (unchecked).

6. 利益相反の管理

Table with 2 columns: Management item (COI management, committee, reporting, guidance) and status (有/無) with reasons.

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 東京都健康安全研究センター

所属研究機関長 職名 所長

氏名 吉村 和久

次の職員の令和5年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学特別研究事業

2. 研究課題名 大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THCの試験法策定に資する研究（23CA2026）

3. 研究者名 （所属部署・職名） 薬事環境科学部医薬品研究科 科長

（氏名・フリガナ） 鈴木俊也 （スズキトシナリ）

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容：)

（留意事項） ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 (地独) 大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 朝野 和典

次の職員の令和5年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学特別研究事業
2. 研究課題名 大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THCの試験法策定に資する研究 (23CA2026)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生化学部 医薬品課 主幹研究員
(氏名・フリガナ) 土井 崇広 (ドイ タカヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣殿

機関名 (地独)大阪健康安全基盤研究所所属研究機関長 職名 理事長氏名 朝野 和典

次の職員の令和5年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学特別研究事業
- 研究課題名 大麻由来製品中に混在する微量 Δ^9 -THCの試験法策定に資する研究 (23CA2026)
- 研究者名 (所属部署・職名) 衛生化学部 医薬品課 主任研究員
(氏名・フリガナ) 浅田 安紀子 (アサダ アキコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口 \square にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。