

分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグの化学的特性及び in vitro 薬理特性の検討

研究分担者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

半合成カンナビノイドを含む大麻成分由来 23 化合物の一斉識別法の検討

研究要旨:種多様な成分を含む製品分析に対応可能な一斉分析法を確立するために, 合成化合物を含む大麻成分由来23化合物を対象として, LC-MSとGC-MSによる分離分析法を検討した. また本分析法を用いて, これら化合物含有を標榜する3製品の分析を行い, 検出成分についての検討を行った. まず, 天然由来16カンナビノイド成分(CBDV, CBDB, CBD, CBDP, CBDA, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCB, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCA-A, CBG, CBGA, CBC, CBL, CBN)を対象とし, LC-MSの分離識別法を検討した結果, カラムPhenyl-Hexyl(2.1mm i.d.×100mm, 1.7 μ m, Waters)を用いた方法で十分な分離分析が可能であった. しかし, 近年流通が問題となっているカンナビノイド及びそのアセチル化体計11化合物(CBN, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 及びアセチル化体CBN-O, Δ^8 -THC-O, Δ^9 -THC-O, 11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O)について, 同条件で測定をした結果, 十分な分離が達成できなかった. そこで, 他のカラムを用いて分析条件を検討したところ, カラムCortecs C18(2.1mm i.d.×150mm, 2.7 μ m, Waters)のグラジェント分析で, これら11化合物の良好な分離が得られ, その他の天然由来カンナビノイド成分を合わせた計23化合物の一斉分析においても十分な分離識別が可能であった. 一方, GC-MSでは, カラムHP-5MS(30m×0.25mm i.d., 0.25 μ m, Agilent)による分析で, カルボン酸体を除く計20化合物の分離識別が可能であった. 次に, これらの測定条件を用いてHHC, HHC-O, THC-O等の含有を標榜するオイル状製品の抽出物について分析を行った結果, LC-MSとGC-MSで, 主成分以外に, 合成時の副生成物と考えられる複数の成分が検出された. LC-QTOFMS及びGC-QTOFMSにより, それぞれのピークのスペクトルを詳細に解析すると, CBDを原料とする2つの合成経路が推測された. また, これらの製品から異性体が複数検出されたが, 解析する上でGC-QTOFMSの精密質量情報が有用であった. しかしGC-MSで検出されない微量成分が, LC-MSで検出される場合も散見され, LC-MSとGC-MSの両方で解析を行うことが望ましいと考えられた.

研究協力者

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

近年, 大麻の代替品として, 大麻の幻覚作用の主体である麻薬成分 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol(Δ^9 -THC)と構造類似の大麻成分由来化合物を含有する製品の国内流入が急増している. Δ^8 -THCあるいは Δ^9 -THCを還元することにより得られるhexahydrocannabinol(HHC), また2019年

に大麻草からの単離同定が報告された, Δ^9 -THCとアルキル側鎖の長さが異なる新規カンナビノイド Δ^9 -tetrahydrocannabiphorol(Δ^9 -THCP)は, 2022年3月に指定薬物に指定された. しかし, 規制後すぐに主要なカンナビノイド成分をアセチル化した化合物等を含有する製品が出現して問題となっている. 従来大麻草からはごく微量しか検出されない成分やその誘導体が, インターネット市場で, 半合成/合成の高純度な粉末・オイル状製品として流通している. 欧州薬物・薬物依存監視セ

ンター (EMCDDA) は、2022年12月に、「HHCおよび関連半合成カンナビノイド (semi-synthetic cannabinoids; SSC) に関する専門家会議」を開催し、大麻成分から半合成されるHHCなどの化合物の出現が、15年前に合成カンナビノイドを含有する「脱法ハーブ」が出現して以来、大麻に代わる「合法的」な市場において、初めての大きな変化となる可能性を指摘している。本研究では、多種多様な成分を含む製品分析に対応可能な一斉分析法を確立するために、半合成化合物を含む大麻成分由来23化合物を対象として、LC-MSとGC-MSによる分離分析法を検討した。また本分析法を用いて、これら化合物含有を標榜する3製品の分析を行い、検出成分についての検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬及び試料

①試薬

分析対象とした 23 カンナビノイドのうち、 Δ^8 -THC、 Δ^9 -THC、CBN及び11 α -HHC、11 β -HHCのアセチル化体は国立衛研で合成したものを使用した。その他のカンナビノイドは Cerillant/ Merck 社、Sigma-Aldrich 社もしくは Cayman 社から購入したものを使用した。標準溶液として、天然由来 16 カンナビノイド成分 (CBDV, CBDB, CBD, CBDP, CBDA, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCB, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCA-A, CBG, CBGA, CBC, CBL, CBN) の混合アセトニトリル溶液と、カンナビノイド及びその還元体、アセチル化体計 11 化合物 (CBN, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 及びアセチル化体 CBN-O, Δ^8 -THC-O, Δ^9 -THC-O, 11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O) の混合アセトニトリル溶液、各 50 μ g/mL、また合計 23 化合物の混合溶液 25 μ g/mL を作成し、適宜希釈して用いた。上記化合物の構造を Fig. 1-1 及び Fig. 1-2 に示した。

②試料

2022 年に入手した 3 製品 (A, B, C) を分析に用

いた。製品は、薄褐色もしくは褐色のペースト状であった。

2) 分析条件

①LC-QTOFMS

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

Column1: ACQUITY CSHTM Phenyl-Hexyl (2.1 mm i.d. x 100 mm, 1.7 μ m, Waters), Column2: Cortecs C18 (2.1 mm i.d. x 150 mm, 2.7 μ m, Waters), Mobile phase: A 0.1% formic acid in water, B 0.1% formic acid in acetonitrile, Gradient program 1: A/B 90/10 (1min) - 35/65 (10min) - 20/80 (30min) - 5/95 (35min, 4min hold), Gradient program 2: A/B 90/10 (1min) - 35/65 (10min) - 30/70 (20min) - 20/80 (30min) - 5/95 (35min, 4min hold), Flow rate: 0.3 mL/min, Column temp.: 40°C

Ion source: ESI, positive mode, Source temp.: 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: 10 V, Collision Energy (CE): Q1 10 V, Q3 30 V, Mass spectral range: TOFMS m/z 100-650 TOFMS2 m/z 100-400

②GC-QTOFMS

Instrument: 7890B GC System/7200 Q-TOF GC-MS (Agilent, USA) Column: HP-5MS (30m x 0.25mm i.d., 0.25 μ m, Agilent) Gas: He Gas flow: 1mL/min Oven temp.: 150°C (1min hold) - 2.5°C/min - 250°C - 10°C/min - 310°C (1min hold) Inlets temp.: 220°C Inlet mode: Splitless Aux temp.: 280°C Ion source: EI and, High resolution mode Ion source temp.: 250°C Quadrupole temp.: 150°C Emission: 35uA (Fixed) Scan range: m/z 50 - 650

3) 試料からの抽出法

製品 A, B, C の 3 試料について、1 mg を 5 mL チューブに秤量し、アセトニトリル 1 mL を加えて

超音波抽出を 10 分間行った。抽出溶液をフィルターろ過してサンプル溶液とし、測定を行った。測定は LC-QTOFMS 及び GC-QTOFMS においてスキャンモード、プロダクトイオンモードで分析を行った。

C. 結果及び考察

1) LC-MS 及び GC-MS による一斉分析法の検討

はじめに、天然由来 16 カンナビノイド成分 (CBDV, CBDB, CBD, CBDP, CBDA, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCB, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCA-A, CBG, CBGA, CBC, CBL, CBN) を対象とし、LC-MS の分離識別法を検討した。その結果、カラム Phenyl-Hexyl column (2.1mm i.d.×100mm, 1.7 μ m, Waters) を用いた方法で 16 成分は十分な分離分析が可能であった¹⁾。しかし、近年流通が問題となっているカンナビノイドの還元体やアセチル化体計 11 化合物 (CBN, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及びアセチル化体 CBN-O, Δ^8 -THC-O, Δ^9 -THC-O, 11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O) について、同条件で測定をした結果、十分な分離が達成できなかった (Fig. 2-1)。そこで、Acquity UPLC HSS T3 column (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m, Waters), Cortecs C18 column (2.1 mm x 150 mm, 2.7 μ m, Waters) 及び Triart C18 ExRS column (2.1 mm x 100 mm, 1.9 μ m, YMC) を用いて、分離条件を検討した。その結果、コアシェルタイプのカラム Cortecs C18 を用いた、0.1%ギ酸水と 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液のグラジエント分析で、これら 11 化合物について、良好な分離が得られた (Fig. 2-2)。さらに、本分離条件を天然由来カンナビノイド成分を合わせた計 23 化合物の一斉分析に適用した結果、CBDP と Δ^9 -THC, CBC と THCA 等、一部の化合物の分離が不十分であったが、それら化合物は分子量が異なることから、本条件で 23 成分は十分識別が可能であった (Fig. 2-3)。一方、GC-MS では、(5%-フェニル)-メチルポリシロキサンタイプのカラム HP-5MS (30 m×0.25 mm i.d.,

0.25 μ m, Agilent) による分析で、熱により分解 (脱炭酸) が認められるカルボン酸体を除く、計 20 化合物の分離識別が可能であった (Fig. 3)。

2) 半合成カンナビノイド含有を標榜する製品分析への適用

1) で確立した測定条件を用いて HHC, HHC-O, THC-O 等の含有を標榜するペースト状 3 製品 (製品 A, B, C) のアセトニトリル抽出物について分析を行った。LC-MS と GC-MS による測定結果を、Fig. 4, 5, 6 に示した。

分析の結果、GC-QTOFMS 測定において、HHC 含有を標榜する製品 A から、11 α -HHC, 11 β -HHC 及び CBN が主ピークとして検出され、dihydro-iso-THC, Δ^8 -THC も確認された。また、その他マイナー成分として、HHC (m/z 316.2402) と同質量を有するピークが複数検出された (Fig. 4-1)。そのうち、図中の赤③と赤④のピークについては、HHC と類似のマススペクトルを示した。LC-QTOFMS 測定においても、GC-QTOFMS 測定と同様に、CBN, 11 α -HHC, 11 β -HHC, Δ^8 -THC が主に確認された (Fig. 4-2)。CBD を酸触媒下加熱することにより、 Δ^8 -THC 及び Δ^9 -THC が合成されるが、その際、副生成物として、 Δ^8 -iso-THC, $\Delta^{4(6)}$ -iso-THC が生成することが報告されている²⁾。今回、GC-QTOFMS 測定において製品 A から検出された dihydro-iso-THC は、これら副生成物の還元体である。従って、本製品に含まれる 11 α -HHC, 11 β -HHC は、CBD から Δ^8 -THC, Δ^9 -THC (Δ^8 -iso-THC, $\Delta^{4(6)}$ -iso-THC) を経て、さらに還元されて合成されたものであることが推測された。なお、CBN については、別途、製品に添加されたものである可能性が考えられた。

次に、HHC-O 含有を標榜する製品 B について、GC-QTOFMS 測定を行った。その結果、11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O 及び CBN-O が主ピークとして検出され、その他、HHC-O と同一の質量数 (m/z 358.2508) を有する複数のマイナーピークが確認された (Fig. 5-1)。マイナーピークのうち、図

中の赤③‘と赤④’のピークについては、HHC-O と類似のマススペクトルを示した。LC-QTOFMS 測定においても同様に、11 α -HHC-O、11 β -HHC-O、CBN-O が主に確認されたが、GC-MS では確認できなかった 11 α -HHC 及び 11 β -HHC のピークも確認することが可能であった (Fig. 5-2)。

さらに、THC-O 含有を標榜する製品 C について GC-QTOFMS 測定を行った結果、 Δ^8 -THC-O が主に検出された。また、 Δ^9 -THC-O、 Δ^8 -THC、CBN-O も確認され、その他、THC-O と同一の質量数 (m/z 356.2351) を有する複数のマイナーピークも確認された (Fig. 6-1)。LC-QTOFMS 測定においても GC-QTOFMS 測定と同様に、 Δ^8 -THC-O が主に検出され、マイナーピークとして Δ^9 -THC-O、 Δ^8 -THC、CBN-O が確認された (Fig. 6-2)。

以上、LC-QTOFMS 及び GC-QTOFMS の結果より得られた、製品 A、B、C の推定関係図を Fig. 7 に示した。製品 A については、HHC がジアステレオマーとして存在することから、 Δ^8 -THC もしくは Δ^9 -THC を還元することにより得られたものであることが推測され、また、dihydro-iso-THC が検出されることから CBD を原料とする合成経路が推測された。いずれの製品においても、CBN あるいは CBN のアセチル化体が検出されたが、CBN の還元体は検出されなかった。

D. 結論

多種多様な成分を含む製品分析に対応可能な一斉分析法を確立するために、天然由来 16 カンナビノイド成分及び半合成 7 化合物 (還元体及びアセチル化体) を含む計 23 化合物を対象として、LC-MS と GC-MS による分離分析法を検討した。その結果、LC-MS 測定において、コアシェルタイプのカラム Cortecs C18 を用いたグラジエント分析で、23 化合物の十分な分離識別が可能であった。一方、GC-MS では、(5%-フェニル)-メチルポリシロキサンタイプのカラム HP-5MS による分析で、カルボン酸体を除く計 20 化合物の分離識別が可能であった。次に、これらの測定条件を用い

て HHC、HHC-O、THC-O 等の半合成カンナビノイド含有を標榜するオイル状 3 製品の抽出物について分析を行った。その結果、LC-MS と GC-MS で、主成分以外に、合成時の副生成物と考えられる複数の成分が検出された。LC-QTOFMS 及び GC-QTOFMS により、それぞれのピークのスペクトルを詳細に解析すると、CBD を原料とする合成経路が推測された。また、これらの製品から異性体が複数検出されたが、解析する上で GC-QTOFMS の精密質量情報が有用であった。しかし GC-MS で識別されない微量成分が、LC-MS で識別される場合も散見され、LC-MS と GC-MS の両方で解析を行うことが望ましいと考えられた。

E. 参考文献

- 1) 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) 「規制薬物の分析と鑑別等の手法の開発のための研究」令和 2 年度研究分担報告「LC-QTOFMS による大麻製品中 16 カンナビノイド成分の定量分析」(花尻 (木倉) 瑠理)
- 2) P. Marzullo et al., Cannabidiol as the Substrate in Acid-Catalyzed Intramolecular Cyclization. *J. Nat. Prod.* 83, 2894–2901 (2020).

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

- 1) 水谷佐久美, 河村麻衣子, 田中理恵, 三澤隆史, 辻巖一郎, 黒原崇, 伊藤美千穂, 出水庸介, 花尻 (木倉) 瑠理: 大麻成分由来 23 化合物の一斉分析法の検討. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.26, 札幌)

論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

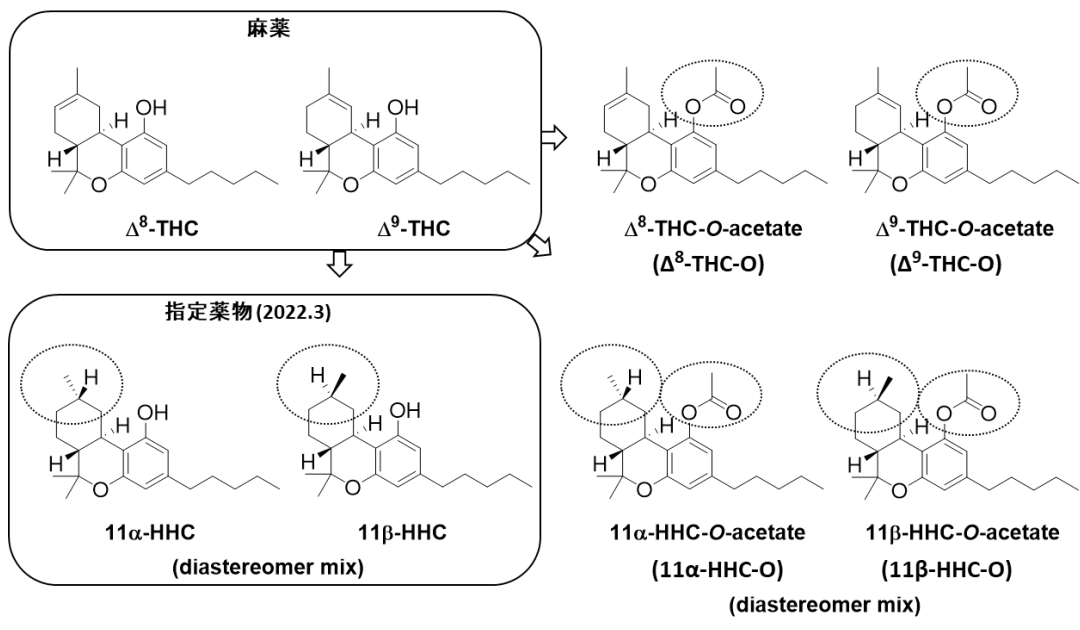


Fig. 1-1 Δ^8 -THC 及び Δ^9 -THC 由来半合成化合物(還元体及びアセチル化体)の構造

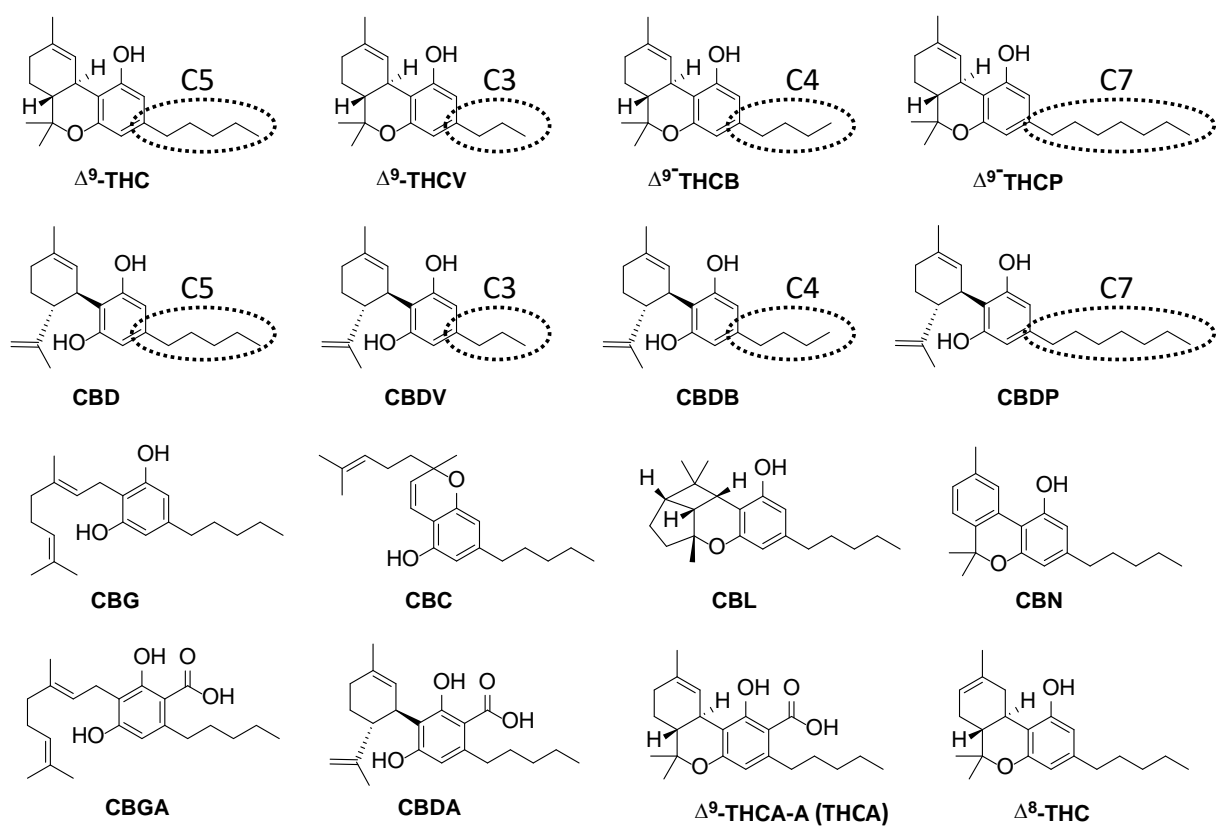


Fig. 1-2 主な大麻草由来カンナビノイドの構造

Table 1 LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオン

	[M + H] ⁺	組成式	抽出イオン	成分
●	287.2006	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	287.2006	CBDV, THCv
●	301.2162	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	301.2162	CBDB, Δ ⁹ -THCB
●	311.2006	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	311.2006	CBN
●	315.2319	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315.2319	CBD, Δ ⁹ -THC, Δ ⁸ -THC, CBL, CBC
●	317.2475	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	317.2475	CBG, 11α-HHC, 11β-HHC
●	343.2632	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	343.2632	CBDP, Δ ⁹ -THCP
●	353.2111	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	311.2006	CBN-O
●	357.2424	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	357.2424	Δ ⁹ -THC-O, Δ ⁸ -THC-O
●	359.2217	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	341.2110	CBDA, THCA
●	359.2581	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	359.2581	11α-HHC-O, 11β-HHC-O
●	361.2373	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	343.2268	CBGA

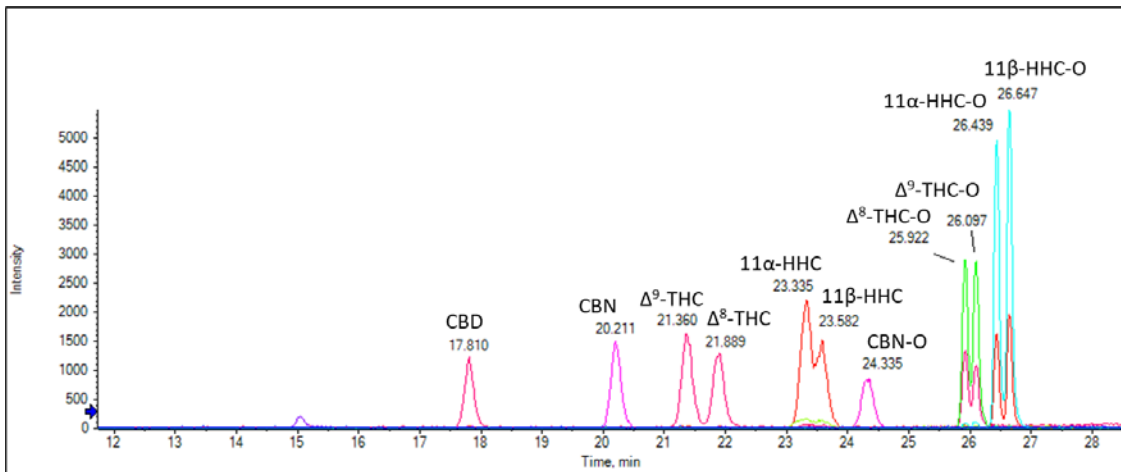


Fig. 2-1 大麻成分 Δ⁸-THC, Δ⁹-THC, CBD 及び CBN 由来半合成化合物(還元体及びアセチル化体)の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム (Phenyl-Hexyl column 使用)

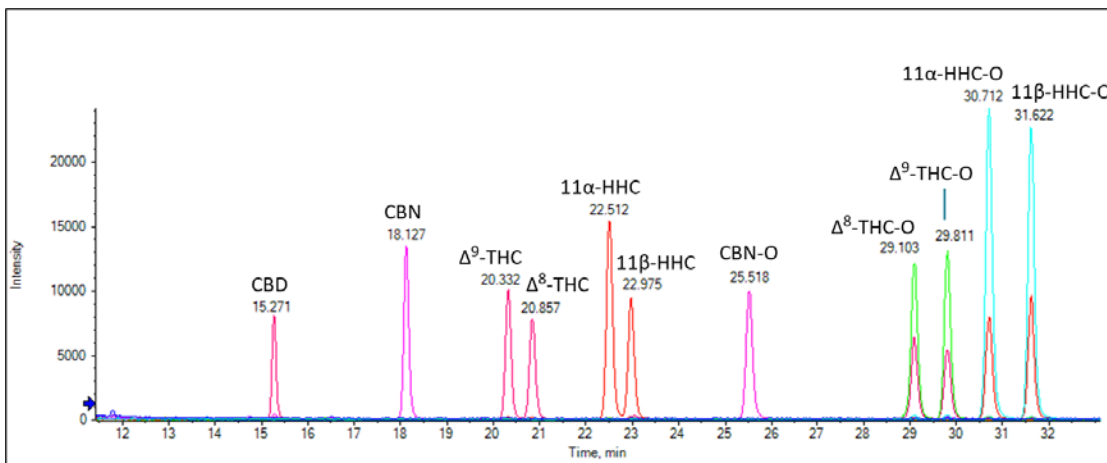


Fig. 2-2 大麻成分 Δ⁸-THC, Δ⁹-THC, CBD 及び CBN 由来半合成化合物(還元体及びアセチル化体)の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム (Cortecs C18 column 使用)

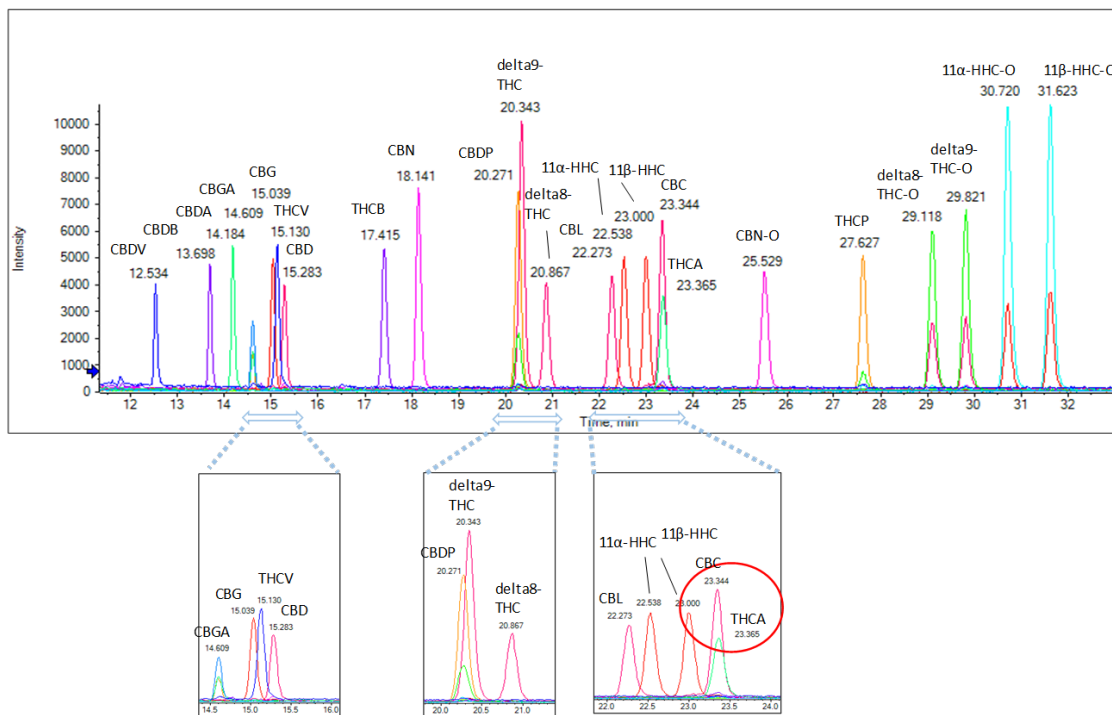


Fig. 2-3 主な大麻草由来カンナビノイド及び半合成化合物 23 化合物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

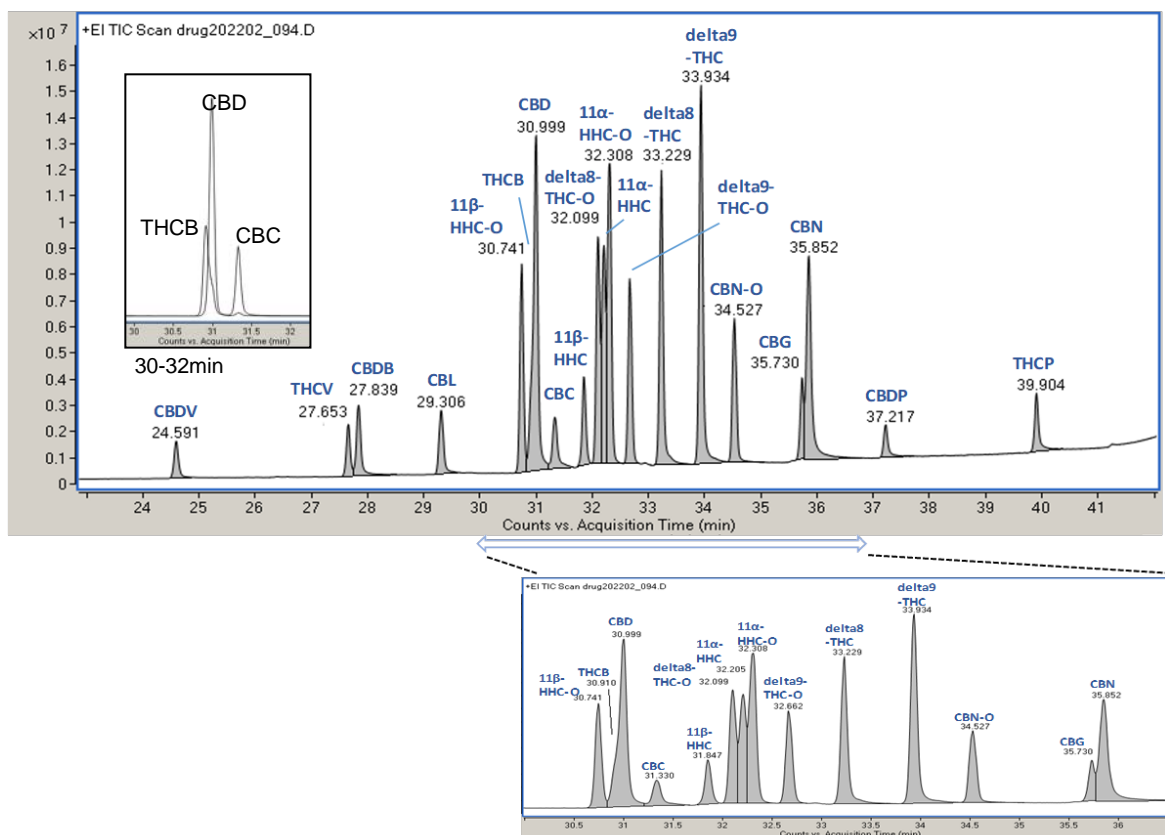


Fig. 3 主な大麻草由来カンナビノイド(カルボン酸体を除く)及び半合成化合物 20 化合物の GC-MS 測定におけるトータルイオンカレントクロマトグラム(TIC)

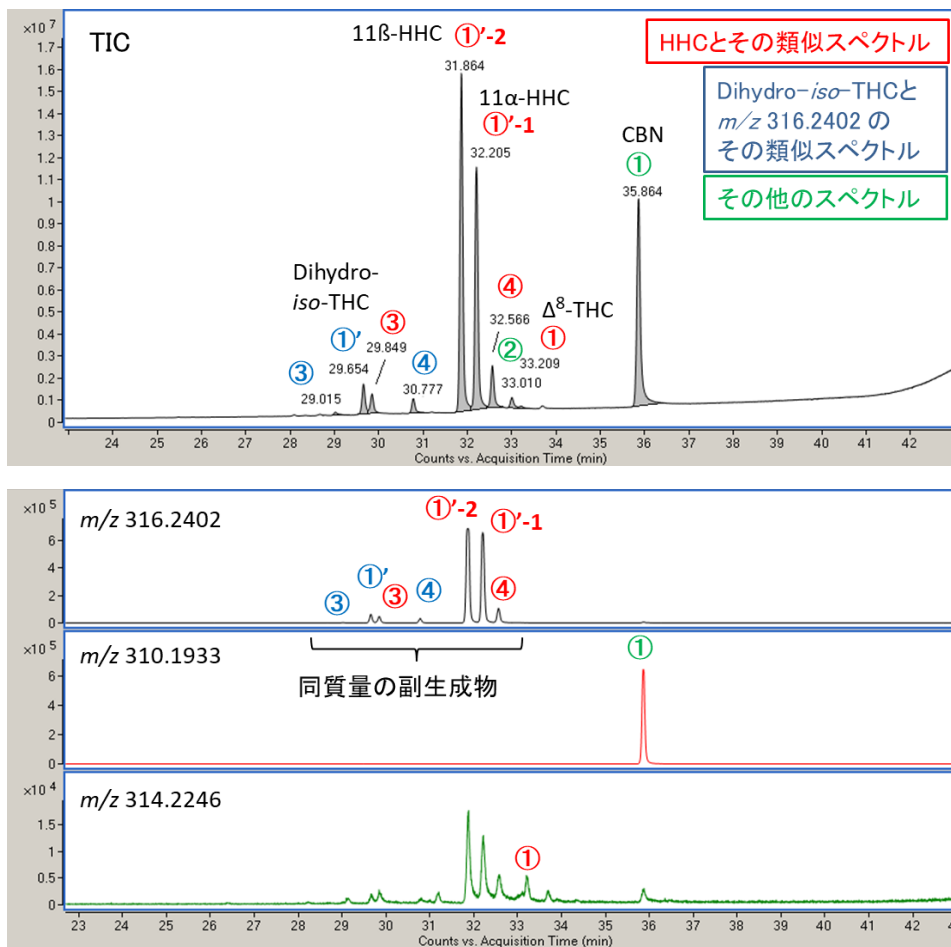


Fig. 4-1 製品 A のアセトニトリル抽出物の GC-QTOFMS 測定結果
 上段: トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC), 下段: 抽出イオンクロマトグラム

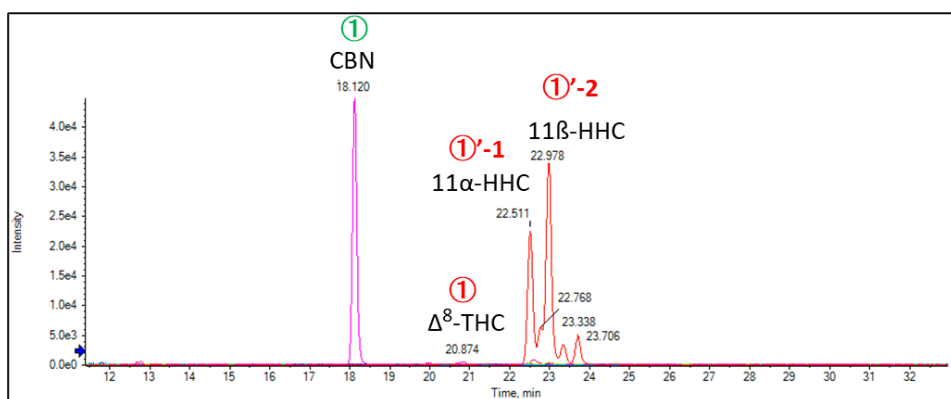


Fig. 4-2 製品 A のアセトニトリル抽出物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

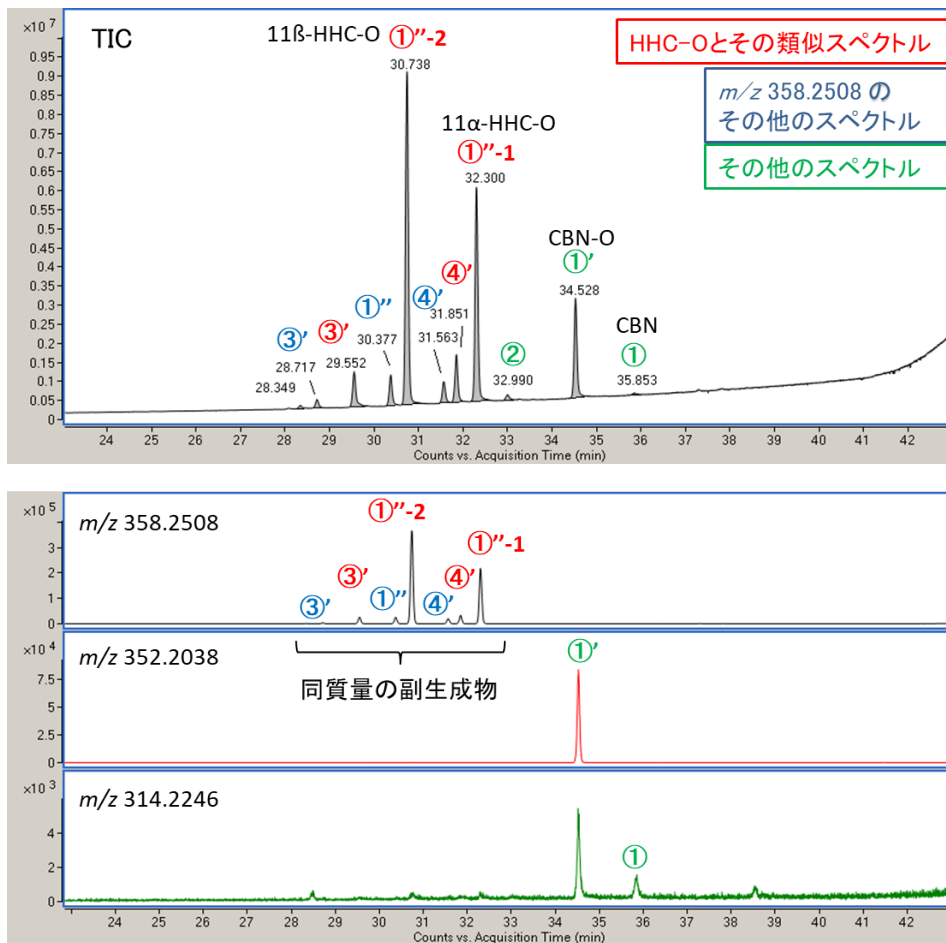


Fig. 5-1 製品 B のアセトニトリル抽出物の GC-QTOFMS 測定結果

上段: トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC), 下段: 抽出イオンクロマトグラム

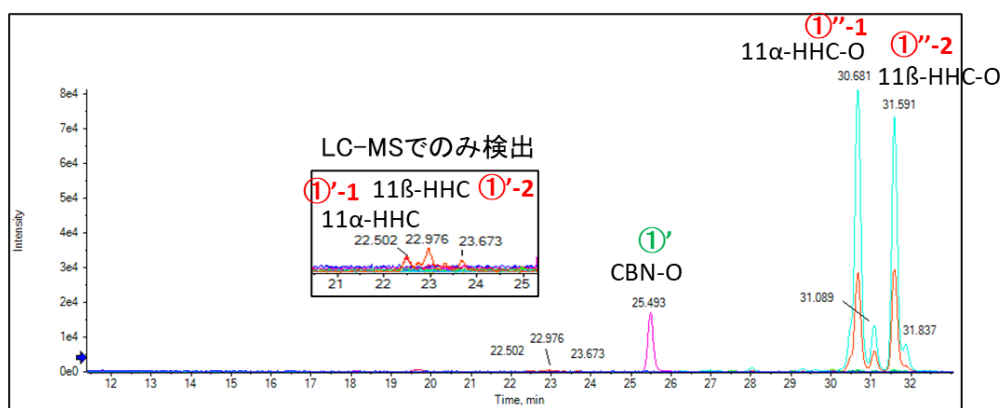


Fig. 5-2 製品 B のアセトニトリル抽出物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

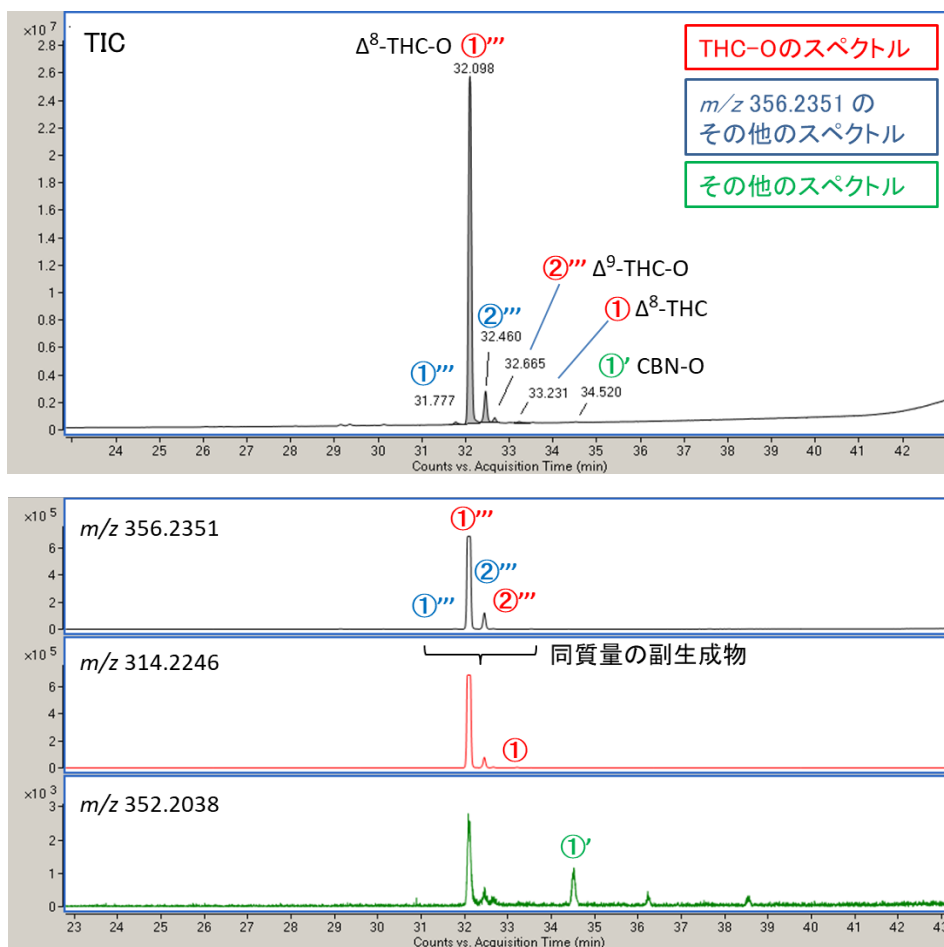


Fig. 6-1 製品 C のアセトニトリル抽出物の GC-QTOFMS 測定結果
 上段: トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC), 下段: 抽出イオンクロマトグラム

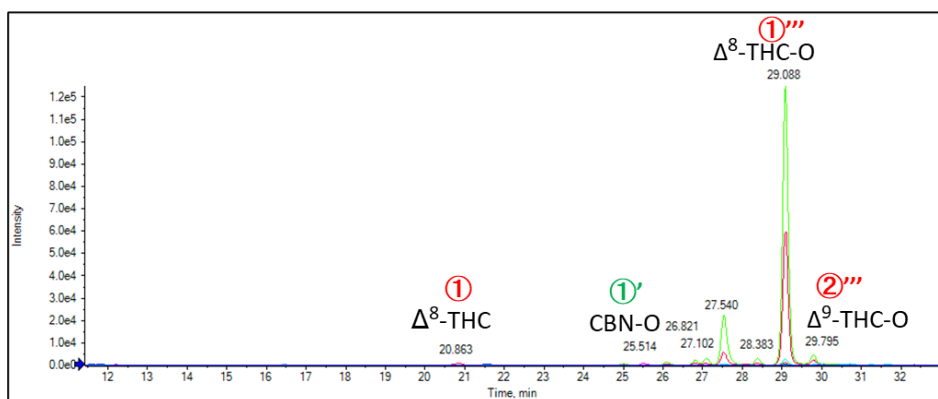


Fig. 6-2 製品 C のアセトニトリル抽出物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

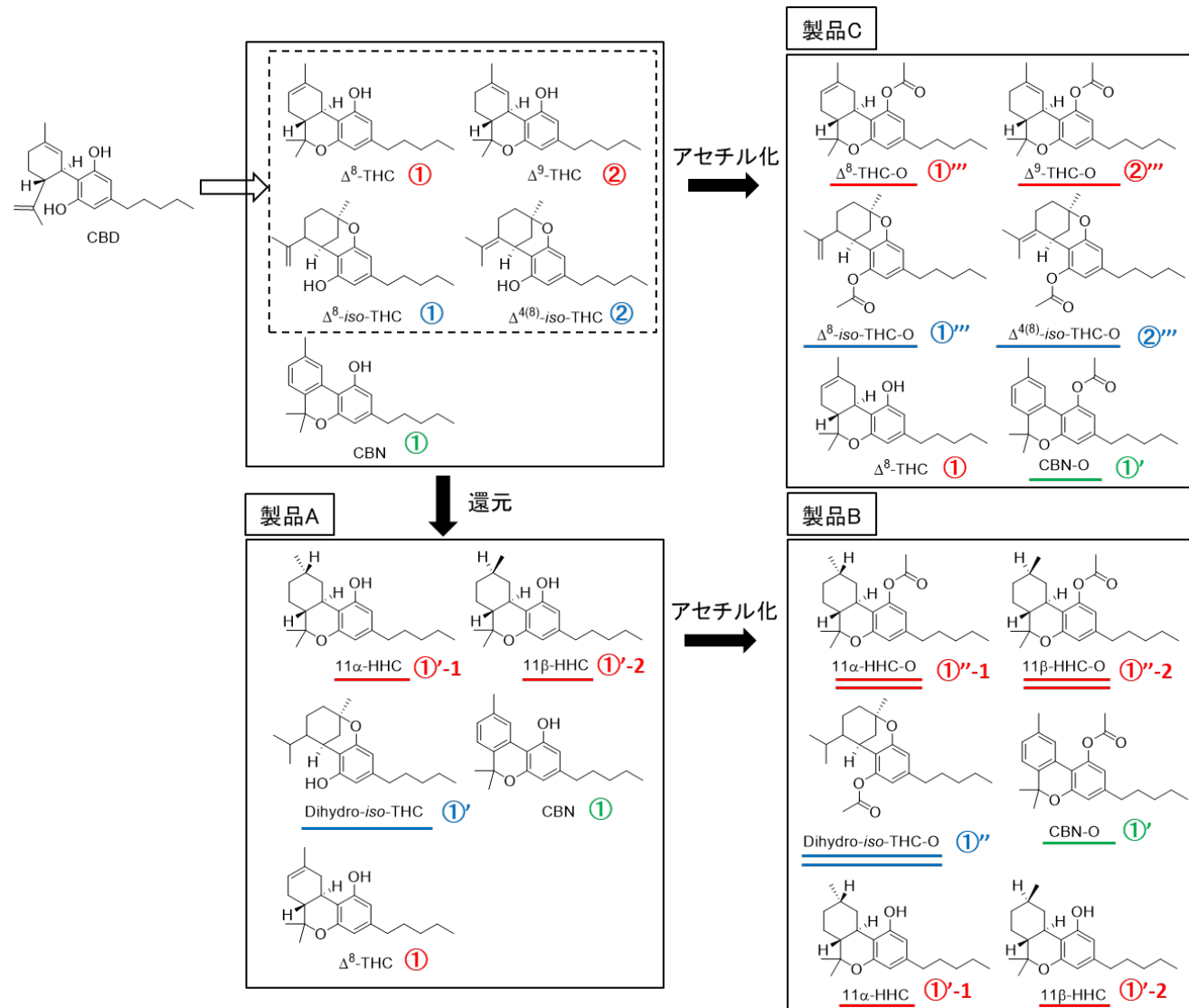


Fig. 7 検出された化合物から推定される製品 A, B 及び C の関連図