

分担研究課題:法規制薬物の分析手法の検討

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

—違法薬物の GC/MS 分析における Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化の有効性に関する検討(カンナビノイド類の代謝物分析への応用)—

研究協力者:杉江 謙一 九州厚生局麻薬取締部 鑑定課 厚生労働技官

研究要旨:大麻使用罪の創設に伴い,尿中大麻成分代謝物 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) の分析が今後大麻取締において非常に重要となる.近年では Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) 以外の Cannabidiol (CBD) などのカンナビノイドを含有する大麻リキッドが出回っており,今後,被疑者がこのような大麻リキッドを摂取したと抗弁する可能性がある.特に CBD 代謝物は熱や酸によって THC-COOH に変換される可能性があり,大麻尿試験においてはこのような変換を防止する試験法を開発する必要がある.本研究では, CBD 代謝物の変換に対しては TMS 誘導体化が有効であると考えられ, GC 注入口で誘導体化する Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化法の検討を行った.また, CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD), 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD) 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った.

IPD-TMS 誘導体化のための GC 注入口条件を検討したところ,注入口温度を 250°C, スプリット比を 1:1 に設定し,試料溶媒にアセトニトリルを用いる条件を設定するに至った.さらに,この条件を用いて,従来の加熱法による TMS 誘導体化の反応性と比較したところ, IPD-TMS 誘導体化は加熱法と同等の反応効率を有することを確認し, IPD-TMS 誘導体化を用いることで試験時間を大幅に短縮可能であることが示唆された.

また, IPD-TMS 誘導体化法を用いた大麻尿試験法を設計し,各物質を 40 ng/mL 含有する尿試料を用いて添加回収試験を実施したところ,本法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5%となり,低濃度の大麻尿に対しても本法は対応可能であることが示唆された.

本研究により, IPD-TMS 誘導体化を用いることで GC 注入口での CBD 代謝物の変換を防止し,さらに CBD 代謝物と THC-COOH を識別可能,より迅速な大麻尿試験法を構築した.

研究協力者

木口 昭夫 九州厚生局麻薬取締部 鑑定課
課長

A. 研究目的

大麻使用罪の創設に伴い,今後,尿中大麻成分
代 謝 物 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -

Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) の分析が非常に重要なものとなることが予想される.一方,近年では, Cannabidiol (CBD) などのカンナビノイドを高濃度含有する製品がインターネット上で容易に購入できる状態であり,被疑者がこのような製品を使用したなどと抗弁する可能性がある.その

ため、尿中大麻成分代謝物の鑑定では THC-COOH だけでなく、CBD などカンナビノイド代謝物の分析を要求される可能性がある。GC や GC/MS は薬物分析で汎用される分析機器であるが、特に CBD は熱や酸により Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) に異性化することが知られており、GC 注入口においても同様の現象が引き起こされる^{1,2)}。この現象は CBD 代謝物にも引き起こされることが予想され、すなわち GC 注入口で CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD) が THC-COOH へ変換される可能性もあると考えられる。なお、7-COOH-CBD の変換について、ペンタフルオロプロピオン酸無水物による誘導体化や試験中の尿を長時間の酸性状態に置くことにより引き起こされることが報告されており²⁾、大麻尿鑑定において誤判定を引き起こす可能性があり、THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な試験法構築も必要であると考えられる。

GC 注入口における CBD 代謝物の変換については、化学構造中の水酸基を誘導体化することが効果的であり、誘導体化反応の際に酸性条件を要さない Trimethyl silyl (TMS) 試薬を用いた誘導体化が有効と考えられる。また、TMS 誘導体化については、従来の加熱法以外に GC 注入口内で直接反応させる Injection Port Derivatization (IPD) が報告されており、IPD を用いることで、反応時間の短縮や試験法の簡素化が期待できる。実際に、IPD を用いた TMS 誘導体化を尿中 THC-COOH の分析に応用する報告もあり⁴⁾、CBD 代謝物の TMS 誘導体化にも IPD の応用は可能であると考えられた。そのため、本研究では IPD-TMS 誘導体化を用いた GC 注入口での CBD 代謝物の変換を防止する GC/MS 分析法を検討し、IPD-TMS 誘導体化を用いた GC/MS による大麻尿試験法の構築を試みた。また、本研究の対象物質として、CBD 代謝物として 7-COOH-CBD 及び 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD)、大麻尿使用罪のターゲット物質である Δ^9 -

THC 代謝物の THC-COOH を選択し、各物質の識別が可能であるかも検証した。

B. 研究方法

1 試薬及び試料

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の各 1 mg/mL のメタノール溶液は Sigma Aldrich[®] 社製のものを使用した。N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (以下 BSTFA) は Sigma Aldrich[®] 社製のものを使用した。健常人尿はフナコシ(株)から購入した。その他の試薬は特級品を使用した。

2 装置及び器具

アルミブロック恒温槽 (TAITEC 社製, 型番: DTU-1CN), 10k ミニ遠心分離機 (ALLSHENG 社製, 型番: Mini-10k), Silicon Coating Tubes 2.0 mL (株)バイオメディカルサイエンス社製, 型番: bmb2200)

3 IPD-TMS 誘導体化

試料液 40 μ L に BSTFA 10 μ L を添加したものを GC/MS に注入した。

4 加熱による TMS 誘導体化

試料液 40 μ L をガラスバイアルに入れ、BSTFA 10 μ L 加えた後、80°C のアルミブロック恒温槽で 30 分間加熱した。反応後、窒素気流により溶媒を蒸発乾固し、アセトニトリル 50 μ L に再溶解したものを GC/MS に注入した。

5 尿試料の調製方法

40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し、添加回収試験に使用した。尿試料 1 mL を 2 mL のマイクロチューブに入れ、0.2 mL の 10 N 水酸化カリウム添加し、攪拌した後、60°C の水浴で 30 分間加温した。加温後、酢酸 0.2 mL を添加し、抽出溶媒としてヘキサン・酢酸エチル混合液 (7:1) 0.5 mL を加え、10 秒間攪拌した後、遠心分離 (10,000 rpm, 10 秒間) した。遠心分離後、上層の有機層を分取した。同様の抽出操作を都合 3 回繰り返し、分取した有機層は一つの試験管にまとめ

た. 分取した有機層を窒素気流により乾固した後, アセトニトリル 40 μ L で再溶解し, BSTFA 10 μ L を添加したものを GC/MS に注入した.

6 分析条件

GC/MS 分析条件

装置: Agilent 社製: 7890GC system/5977 GC/MSD)

分析カラム: DB-5MS (30 m \times 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μ m) (Agilent 社製)

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

注入法: スプリット (1:1)

注入量: 1 μ L

昇温条件1 (条件検討): 200 $^{\circ}$ C (1 min 保持) – 40 $^{\circ}$ C /min 昇温 – 300 $^{\circ}$ C (2.5 min 保持)

昇温条件2 (添加回収試験) 100 $^{\circ}$ C (1 min 保持) – 20 $^{\circ}$ C /min 昇温 – 300 $^{\circ}$ C (4 min 保持)

トランスファーライン: 280 $^{\circ}$ C

キャリアーガス: ヘリウム

イオン化法: 電子イオン化法 (EI)

イオン化電圧: 70 eV

イオン源温度: 200 $^{\circ}$ C

四重極温度: 150 $^{\circ}$ C

測定モード 1: SCAN モード (m/z 40~600)

測定モード 2: SIM モード

THC-COOH 測定用イオン: m/z 371, 確認用イオン: m/z 488

7-COOH-CBD 測定用イオン: m/z 492, 確認用イオン: m/z 561

7-OH-CBD 測定用イオン: m/z 478, 確認用イオン: m/z 546

C. 結果及び考察

1 IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口条件の検討

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化のため, GC 注入口条件を検討した.

1. GC 注入口温度による IPD-TMS 誘導体化への影響

1-1 試料溶媒の選択

IPD-TMS 誘導体化における試料溶媒の影響について検証した. 溶媒は無極性溶媒のヘキサン, 極性溶媒の酢酸エチル及びアセトニトリル, 誘導体化試薬の BSTFA を選択した. 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD, THC-COOH について, 各種溶媒を用いて 10 μ g/mL の試料液を調製し, 同試料液 40 μ L に BSTFA 10 μ L を添加したものを GC/MS で測定した. その結果, 全ての溶媒で十分に TMS 誘導体化反応が進行し, 7-COOH-CBD 及び 7-OH-CBD については TMS が 3 つ付加した 7-COOH-CBD-3TMS, 7-OH-CBD-3TMS, THC-COOH については TMS が 2 つ付加した THC-COOH-2TMS が検出された. Fig. 1 に GC/MS により得られた Total Ion Current Chromatogram (TICC) と各物質の TMS 誘導体のマススペクトルを示す.

次に, 試料液濃度による反応性を検証するため, 各種溶媒を用いて 100 μ g/mL の試料液を調製した. その結果, ヘキサン溶媒では 7-OH-CBD のみが誘導体化され, ほかの物質について TMS 誘導体化は十分に進行しなかった (Fig. 2-1). 他方, 酢酸エチル, アセトニトリル, BSTFA を溶媒として用いた場合, 全ての物質の TMS 誘導体化が十分に進行した. アセトニトリル溶媒で測定した際の各物質 TMS 誘導体の TICC を Fig. 2-2 に示す.

溶媒による IPD-TMS 誘導体化への影響は, 溶媒ごとの極性が要因であると考えられた. すなわち, 極性溶媒のアセトニトリル, 酢酸エチルでは IPD-TMS 誘導体化が進行するが, 他方, ヘキサンのような無極性溶媒は IPD-TMS 誘導体化を促進しないという性質があるものと推測された. さらに, 7-OH-CBD のみ, ヘキサン溶媒で TMS 誘導体化が進行していたことから, 特にカルボキシル基への IPD-TMS 誘導体化には極性溶媒が適していると考えられた.

また、これら溶媒における各物質 TMS 誘導体のピーク面積を比較したところ、BSTFA を用いた際に全ての TMS 誘導体で最もピーク面積は低くなった (Fig. 3). 他方、アセトニトリルと酢酸エチルの場合、7-OH-CBD と THC-COOH の TMS 誘導体においてピーク面積に差はみられなかったが、7-COOH-CBD の TMS 誘導体においてはアセトニトリルの方がピーク面積は高くなった。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における溶媒として、アセトニトリルを選択することとした。

1-2 注入口温度の設定

次いで、IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口温度の設定について検討した。GC 注入口温度を 200, 220, 250, 280 及び 300°C, スプリット比を 20:1 に設定し、10 µg/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH のアセトニトリル溶液 40 µL に BSTFA 10 µL を添加したものを GC/MS で測定した。その結果、全ての注入口温度において、各物質の TMS 誘導体化は十分に進行し、そのピーク面積も全温度において一定であった (Fig. 4)。

次にスプリット比 1:1 における GC 温度の影響について検証した。その結果、全物質で温度上昇によりピーク面積は上昇し、250°C 以降で一定となった。

以上のことから、上記範囲の GC 注入口温度において、各物質の IP-TMS 誘導体化は十分に進行することが示唆され、スプリット比 1:1 における 7-COOH-CBD と THC-COOH のピーク面積上昇を考慮すると、GC 注入口温度は 250°C 以上に設定することが望ましいと考えられた。

1-3 スプリット比の設定

次に、GC 注入口のスプリット比による IPD-TMS 誘導体化への影響について検証した。10 µg/mL のアセトニトリル溶液 40 µL に BSTFA 10 µL を添加したものを GC/MS で測定した。その際に、GC 注入口温度は 250°C に設定し、GC 注入口のスプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定した。各スプリット比にお

けるカラムへの試料導入量を算出し、各物質の TMS 誘導体のピーク面積との関係を検証した。カラム導入量は試料注入量 1 µL をカラム流量 1 mL/min と各スプリット流量の総和により除すことで算出した。その結果、カラムへの試料導入量と各物質の TMS 誘導体ピーク面積の間には強い相関関係があることが確認された (Fig. 5)。このことから、全てのスプリット比において、IPD-TMS 誘導体化の反応効率は一一定であることが推測された。

さらに、各スプリット比における 7-OH-CBD のピーク面積に対する 7-COOH-CBD 及び THC-COOH とのピーク面積比を検証した。その結果、スプリット比が低いほど 7-COOH-CBD/7-OH-CBD と THC-COOH/7-OH-CBD が高くなる傾向があり、7-COOH-CBD と THC-COOH は低スプリット比により感度が上昇することが確認された (Fig. 6)。これは両物質が 7-OH-CBD よりも揮発性が低く、高スプリット比ではインサート内の試料滞留時間が短く、十分に気化されていないことが原因であると考えられた。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口のスプリット比については、全ての物質がより高感度に検出可能な 1:1 に設定することとした。

2 IPD-TMS 誘導体化と加熱法の比較

IPD-TMS 誘導体化の有効性を検証するため、汎用される加熱法との比較を行った。各物質につき 10 µg/mL のアセトニトリル溶液を試料液とした。加熱法については「4 加熱による TMS 誘導体化」に従い試料調製を行い、GC/MS で測定した。なお、加熱法について、試料液中の BSTFA により GC/MS 注入時に IPD が引き起こされるため、加熱反応後の反応液を一度、窒素乾固する工程を入れている。GC/MS の条件として、スプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定し、各誘導体化法における各物質 TMS 誘導体のピーク面積の挙動を比較した。その結果、窒素乾固していることから、加熱法での各物

質のピーク面積は IPD より若干小さくなるが、両者のピーク面積の挙動はほぼ一致していた (Fig. 7). 加熱法では全物質が TMS 誘導体化された状態で GC/MS に注入されるため、IPD と加熱法のピーク面積挙動が一致するということは、全スプリット比において IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を示すと考えられた。以上のことから、7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を有し、かつ加熱法で要する 30 分の反応時間も省略できることから、各物質の TMS 誘導体化法として有用であることが示唆された。

3 IPD-TMS 誘導体化における検出限界, 定量下限及び検出限界

設定した注入口条件を用い、各物質の IPD-TMS 誘導体化における検出限界および定量下限を検証した。その際、GC/MS の測定モードは SCAN を用いた。その結果、各物質 TMS 誘導体ともに検出限界は 0.5 µg/mL, 定量下限 1 µg/mL であった。また、1~50 µg/mL の濃度範囲で検量線を作成したところ、全物質 TMS 誘導体につき $r=0.999$ 以上の良好な相関性が得られた (Fig. 8)。なお、本 GC 注入口条件を用いた IPD-TMS 誘導体化において、7-COOH-CBD の THC-COOH への変換は確認されなかった。

4 尿試料への IPD-TMS 誘導体化の応用

大麻尿試験への IPD-TMS 誘導体化の適応を検討するため、40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し、添加回収試験を実施した。その際の GC 注入口条件は注入口温度を 250°C, スプリット比を 1:1 に設定した。なお、本添加回収試験において、尿中の夾雑成分の影響を避けるため GC/MS の測定モードは SIM を用いた。測定の結果得られた各物質 TMS 誘導体の測定イオンのクロマトグラムを Fig. 9 に示す。尿試料の測定においても IPD-TMS 誘導体化反応は進行し、7-OH-CBD, 7-COOH-CBD 及び THC-COOH の TMS

誘導体もそれぞれ分離され、識別が可能であった。また、クロマトグラム上の各 SN 比は 7-OH-CBD-3TMS が 188, 7-COOH-CBD-3TMS が 85, THC-COOH-2TMS が 143 となり 40 ng/mL と低濃度の尿試料についても良好な感度が得られた。さらに、本実験で採用した前処理法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5% であった。CBD 代謝物の回収率が THC-COOH よりも低くなったのは、各 CBD 代謝物の化学構造にある 2 つの水酸基により、THC-COOH よりも水溶性が高くなり、液液抽出時の有機層への分配性が低下したことが要因であると考えられた。そのため、本前処理で採用した抽出溶媒については、溶媒の種類や混合比率の検討を行い、CBD 代謝物の回収率を改善する必要があると考えられた。一方、一般的に使用される大麻尿のスクリーニングキットのカットオフ値は 50 ng/mL であることを考慮すると、本試験法でも大麻尿試験に十分に対応可能であると考えられた。

以上のことから、大麻尿試験においても CBD 代謝物、THC-COOH への IPD-TMS 誘導体化は応用可能であることが示唆された。また、IPD-TMS 誘導体化を用いた各物質を識別可能かつより迅速な大麻尿試験法を構築した。

D. 結論

本研究では CBD 代謝物である 7-OH-CBD 及び 7-COOH-CBD の GC/MS 分析における IPD-TMS 誘導体化の有用性について検証した。その結果、各物質の IPD-TMS 誘導体化に最適な条件として、GC 注入口温度 250°C, スプリット比 1:1 に設定し、試料溶媒としてアセトニトリルを用いることを考案した。IPD-TMS 誘導体化により GC 注入口での CBD 代謝物の変換を防止可能であることを確認した。さらに、実試料を想定した添加回収試験を実施したところ、大麻尿試験へも IPD-TMS 誘導体化が有効であることが示され、大麻尿試験の試験時間短縮と簡素化が期待できるも

のと考えられた。

本研究では各物質のグルクロン酸抱合体を用いた加水分解の検証は行っておらず、大麻尿試験で一般的に使用されている加水分解法で 7-COOH-CBD と THC-COOH が十分に脱抱合されていると仮定して実験を行った。そのため、本研究で構築した試験法については各物質のグルクロン酸抱合体を対象とした検証も必要である。

以上のことから、今後の研究では THC-COOH 及び 7-COOH-CBD のグルクロン酸抱合体を対象とした大麻尿試験法の構築を検討するとともに、近年、大麻リキッドに含有され、令和 4 年 3 月 7 日に指定薬物に指定された Hexahydrocannabinol (HHC) の代謝物についても対象物質として追加し、幅広いカンナビノイド代謝物に対応可能な鑑定試験法の構築を試みていきたい。

E. 参考文献

- 1) 杉江謙一, 林侑加子, 津村ゆかり, 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラーサイエンス政策研究事業)「規制薬物の分析と鑑定等の手法の開発のための研究」令和2年度総括・分担研究報告書「ガスクロマトグラフ注入口における cannabidiol から tetrahydrocannabinoid への異性化に関する研究」
- 2) Golombek P., Muller M., Barthlott I., Sproll C., Lachenmeier D. W., *Toxics.*, **8(2)**.
- 3) E. D. Hart, S. Vikingsson, J. M. Mitchell, R. E. Winecker, R. Flegel, E. D. Hayes , *J. Anal. Toxicol.*, **46(5)**, 573–576 (2022).
- 4) Y. E. Sim, J. W. Kim, J. Y. Kim, *Analytical Science and Technology*, 34, 68-77 (2021).

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 学会発表
なし
2. 論文発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

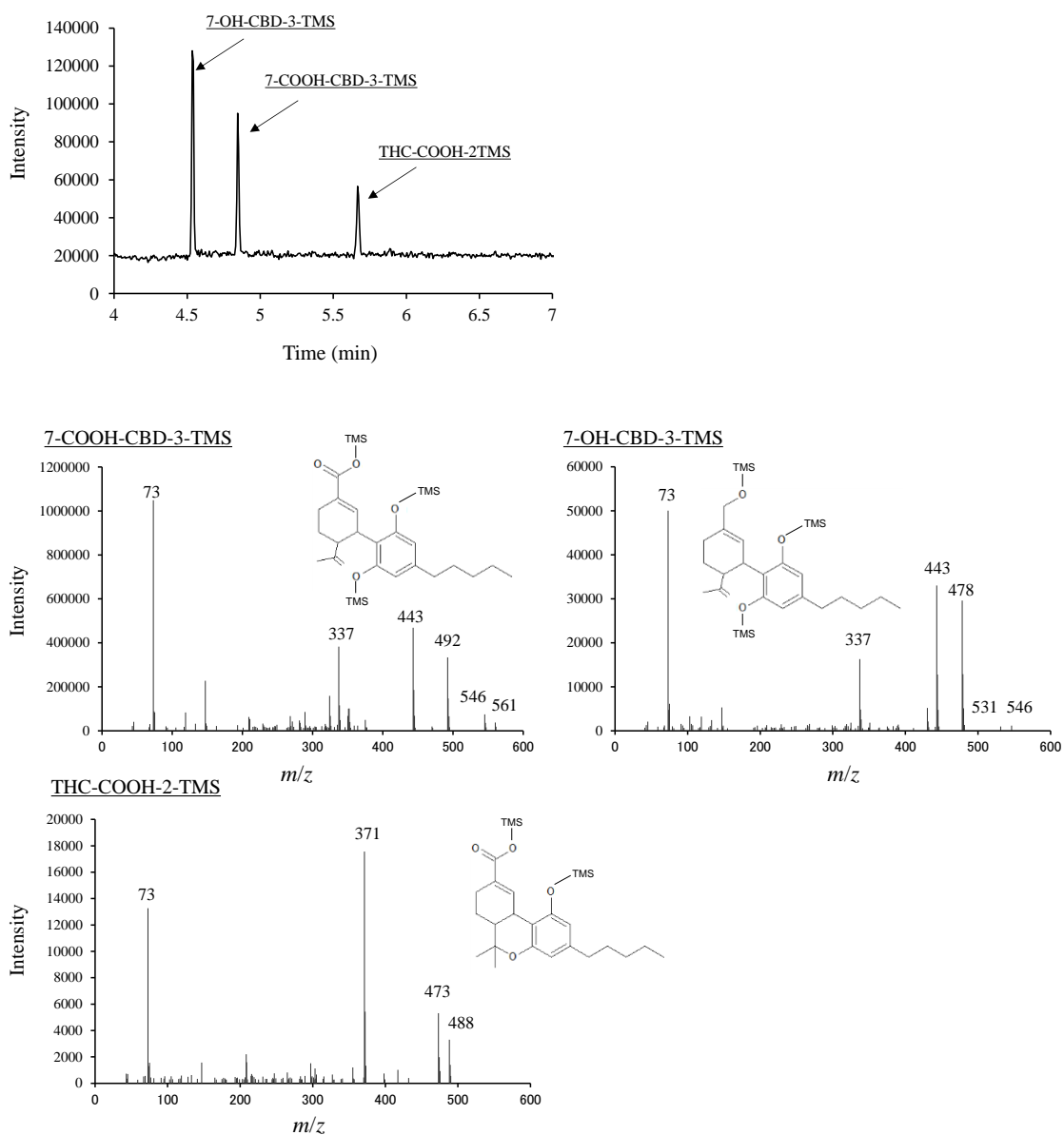


Fig. 1 Total ion current chromatogram and Mass spectrum of 7-COOH-CBD-3TMS, 7-OH-CBD-3TMS and THC-COOH-2TMS measured by GC/MS.

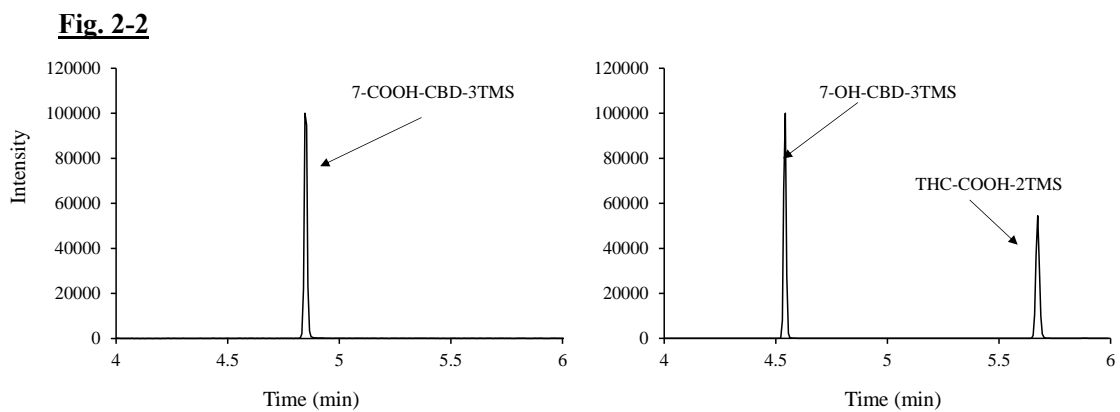
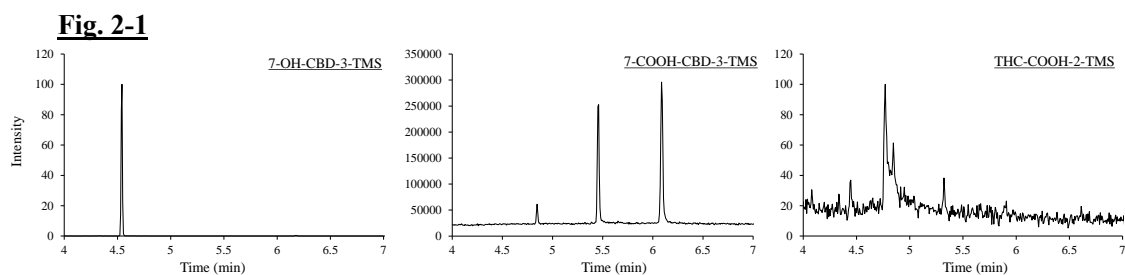


Fig. 2 TIC of 7-OH-CBD, 7-COOH-CBD and THC-COOH 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in hexane or acetonitrile solution measured by GC/MS. 2-1: hexane solvent. 2-2: acetonitrile solvent.

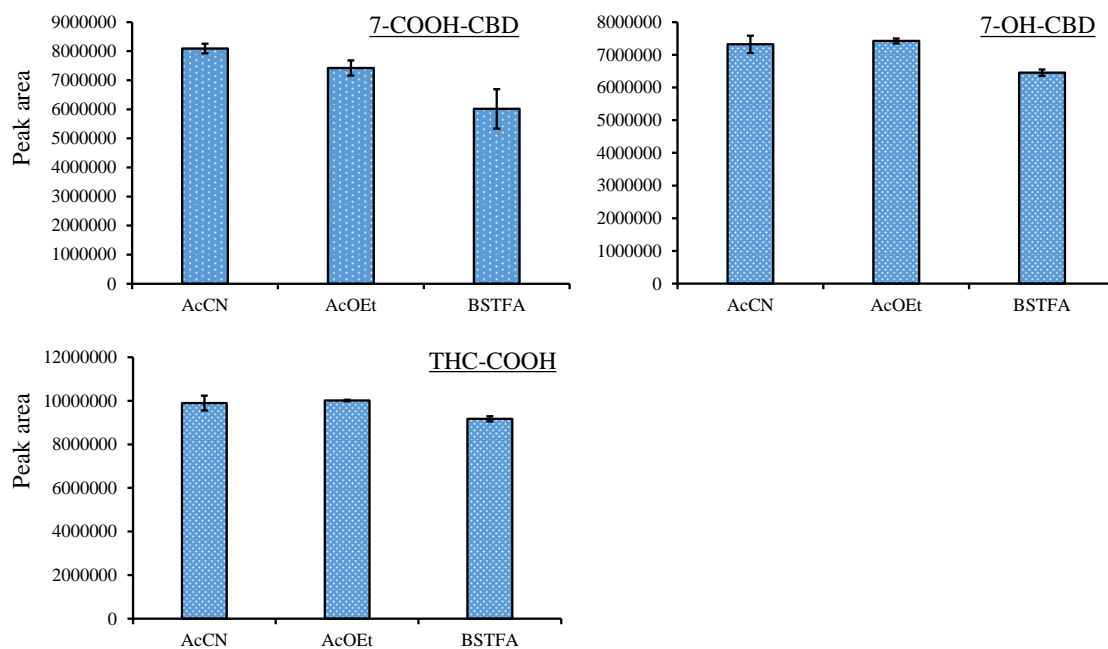


Fig. 3 Comparison of peak areas of substances measured by GC/MS using each solvent.

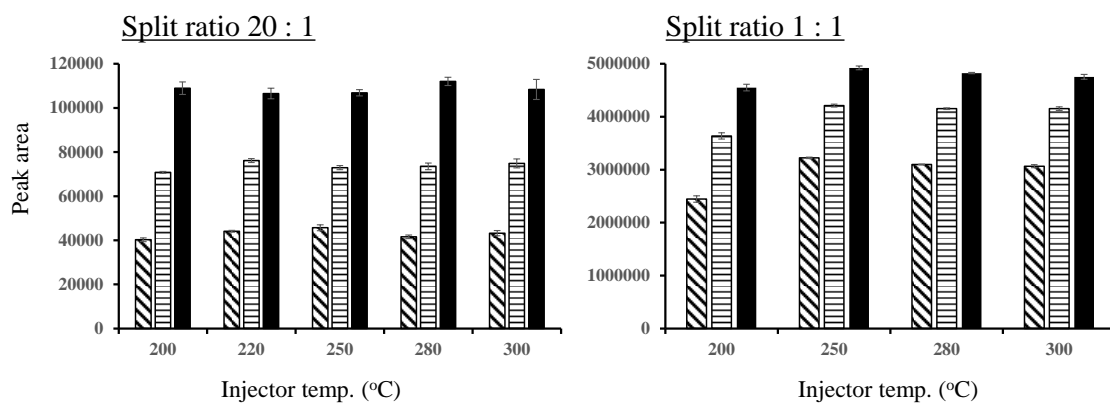


Fig. 4 Comparison of peak areas of substances measured by GC/MS at each injector temperatures. ■ 7-OH-CBD. ▨ 7-COOH-CBD. ▩ THC-COOH

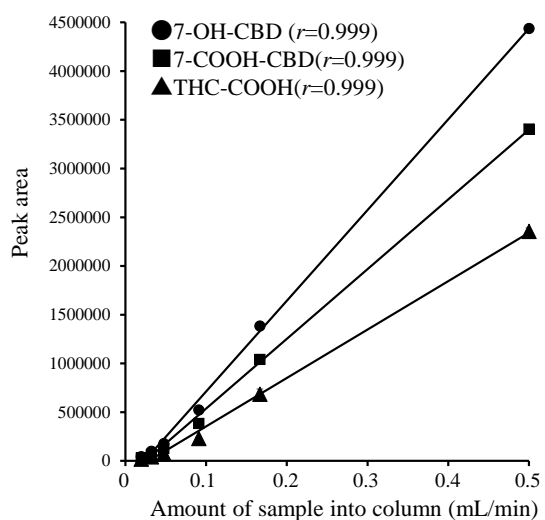


Fig. 5 Relationships of between peak areas of substances with amount of sample introduced into column measured by GC/MS.

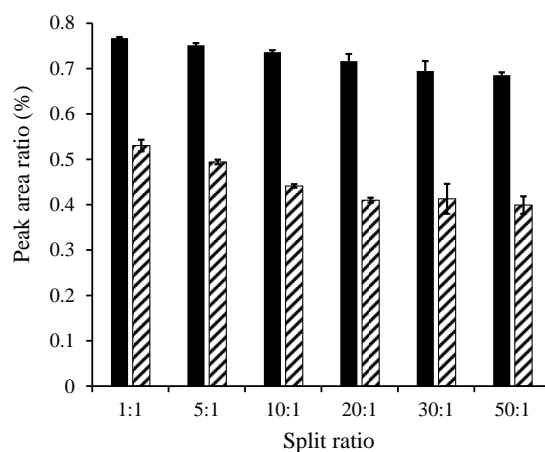


Fig. 6 Comparison of peak area ratio and each split ratio measured by GC/MS. ■ 7-COOH-CBD/7-OH-CBD. ▨ THC-COOH/7-OH-CBD.

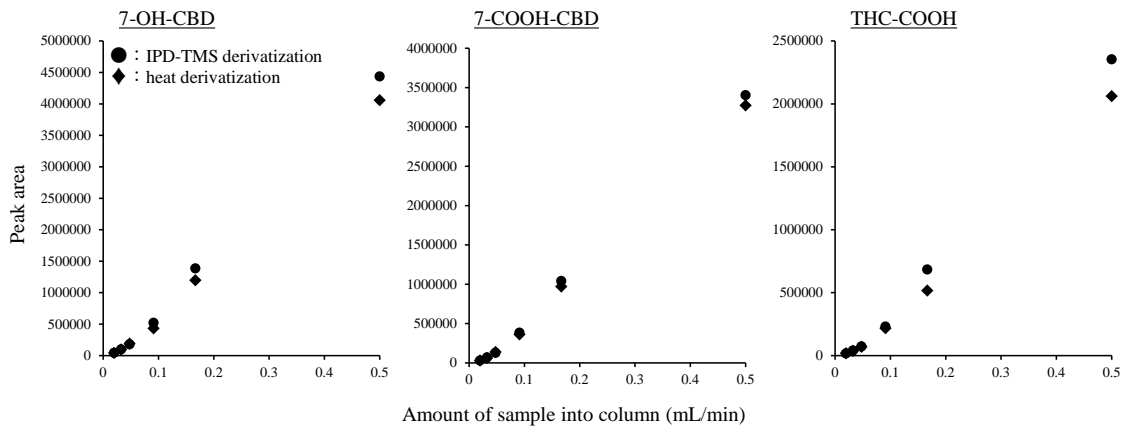


Fig. 7 Relationships of between peak areas of substances with amount of sample introduced into column measured by GC/MS at IPD and heat derivatization. ●: IPD-TMS derivatization. ◆: Heat derivatization.

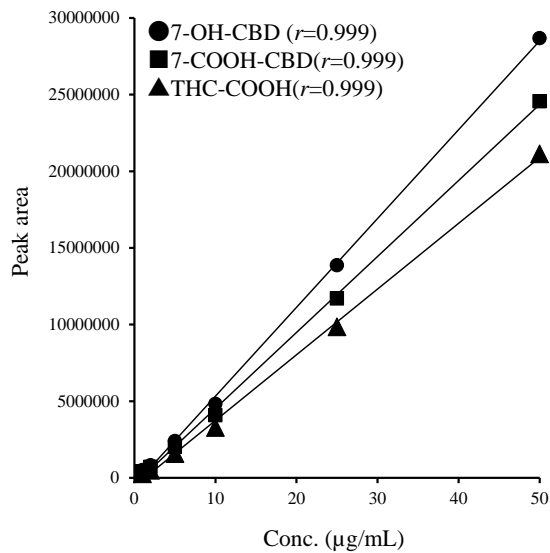


Fig. 8 Calibration curves of each 7-OH-CBD, 7-COOH-CBD and THC-COOH measured by GC/MS.

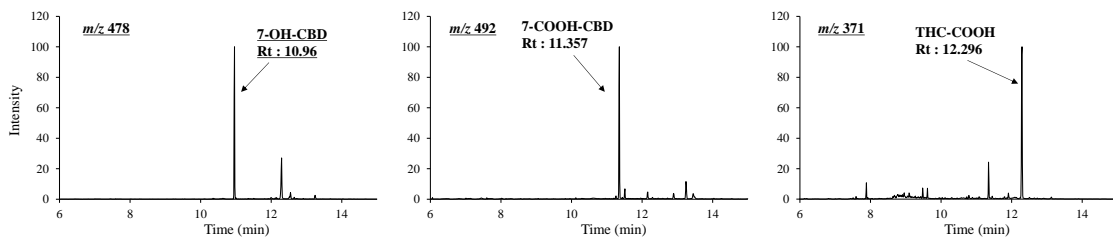


Fig. 9 Chromatograms of each substances monitored ions measured by GC/MS. 7-OH-CBD : m/z 478, 7-COOH-CBD : m/z 492, THC-COOH : m/z 371.