

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:  $^1\text{H}$  核を用いる定量 NMR ( $^1\text{H-qNMR}$ )法は、濃度が既知の物質と濃度未知の試料の  $^1\text{H-NMR}$  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、 $^1\text{H-qNMR}$  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  $\Delta^9\text{-THC}$  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 $-20^\circ\text{C}$ で保存していたものであった。 $^1\text{H-qNMR}$  法による定量の結果、 $\Delta^9\text{-THC}$ 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  $^1\text{H-qNMR}$  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  $\Delta^9\text{-Tetrahydrocannabinol}$  ( $\Delta^9\text{-THC}$ )が最も中枢作用が強く大麻草の活性本体である。 $\Delta^9\text{-THC}$ 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 $\Delta^9\text{-THC}$ 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  $^1\text{H}$  核を用いる場合  $^1\text{H-qNMR}$  法と称している<sup>1)7)</sup>。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<sup>8)</sup>。 $^1\text{H-NMR}$ 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  $^1\text{H-}$

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  $^1\text{H}$ -qNMR 法を適用して、含有される成分の定量を検討した<sup>9)-11)</sup>。今回、大麻草由来カンナビノイドについて、 $^1\text{H}$ -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  $\Delta^9$ -THC 及び THCA (THCA-A) (Fig. 1) の実際の純度の測定を  $^1\text{H}$ -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、 $\Delta^9$ -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  $^1\text{H}$ -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. $^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -qNMR 用標準液 (0.183 mg/mL) とした。 $^1\text{H}$ -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. $^1\text{H}$ -qNMR 測定用試料の調製

$\Delta^9$ -THC 及び THCA はそれぞれ 200 $\mu\text{L}$  を濃縮乾固した。これに 1.00 mL の  $^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。

### 4. $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの測定

最初に  $\Delta^9$ -THC 及び THCA の  $^1\text{H}$ -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。 $^1\text{H}$ -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  $\delta$  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、 $C_{\text{BTMSB}}$ ,  $C_{\text{Sample}}$  はそれぞれ 1,4-BTMSB- $d_4$  及び各化合物のモル濃度 (mol/mL),  $I_{\text{BTMSB}}$ ,  $I_{\text{Sample}}$  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  $^1\text{H}$ -qNMR 法による  $\Delta^9$ -THC 及び THCA の純度の測定結果を示した。また Fig. 3-4 に  $\Delta^9$ -THC 及び THCA の  $^1\text{H}$ -NMR のチャートを示した。

今回、 $^1\text{H}$ -qNMR 法で検討した大麻草由来カンナビノイド試薬の  $\Delta^9$ -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 $\mu\text{g}$ /200 $\mu\text{L}$  で純度の測定を検討した。

調製した  $\Delta^9$ -THC 及び THCA の  $^1\text{H}$ -qNMR 測定用試料の  $^1\text{H}$ -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、 $\Delta^9$ -THC については  $^1\text{H}$ -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、<sup>1</sup>H-qNMR 法による純度の測定に用いることにした。すなわち、 $\Delta^9$ -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*<sub>4</sub> のシグナルの面積を比較して濃度を算出した。その結果、 $\Delta^9$ -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±0.68%、6.17 ppm のシグナルで 94.39±0.48%、6.08 ppm のシグナルで 94.75±0.50%となった。THCA については 6.40 ppm のシグナルで 95.51±0.59%、6.11 ppm のシグナルで 96.82±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 <sup>1</sup>H-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°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  $\Delta^9$ -THC となる可能性もある。しかしながら、今回測定した  $\Delta^9$ -THC の <sup>1</sup>H-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  $\Delta^9$ -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、<sup>1</sup>H-qNMR 法を用いて純度の測定を検討した。その結果、 $\Delta^9$ -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 <sup>1</sup>H-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

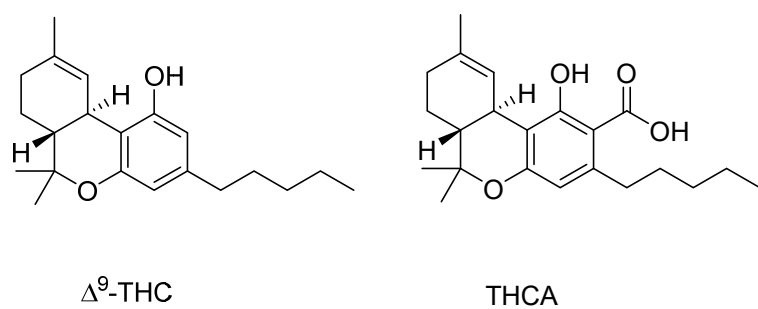
なし

論文発表

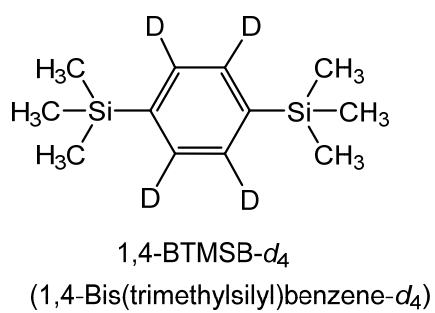
なし

H. 知的所有権の取得状況

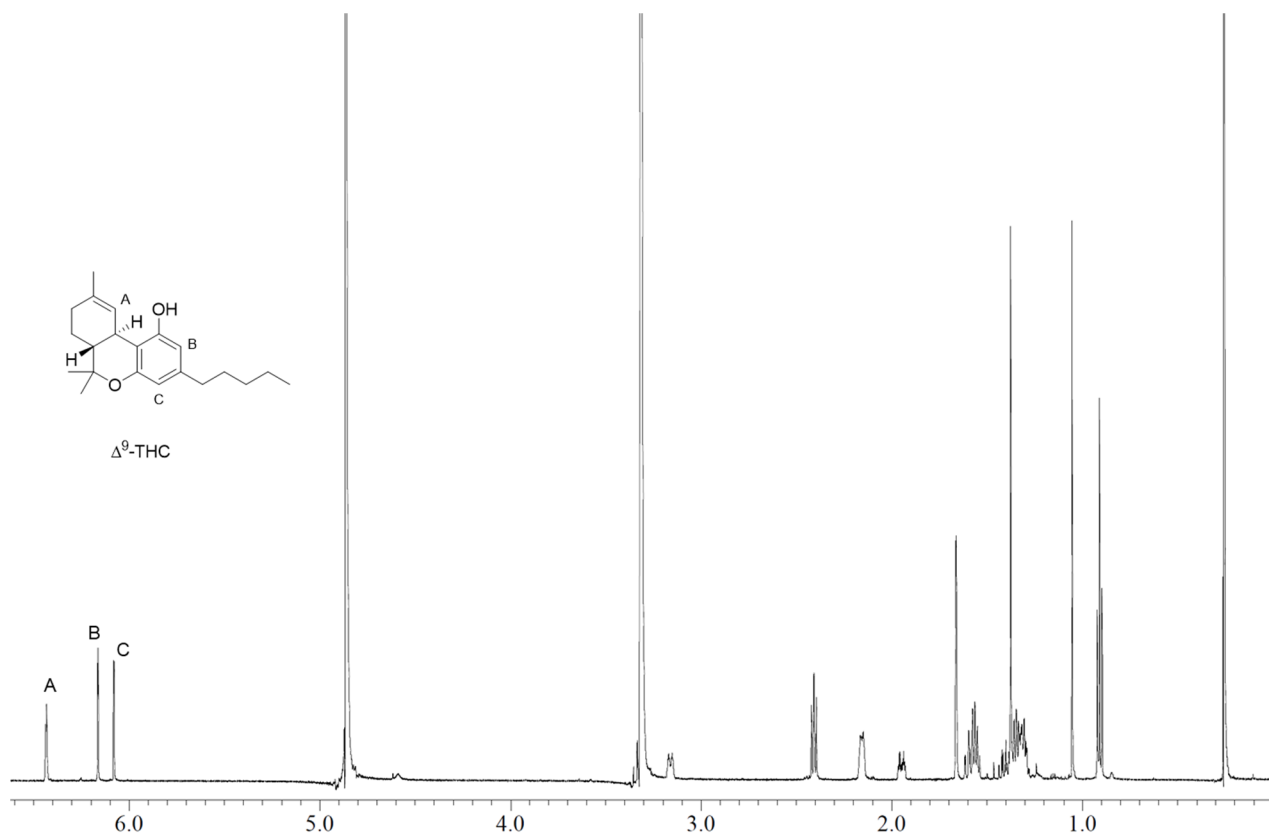
なし



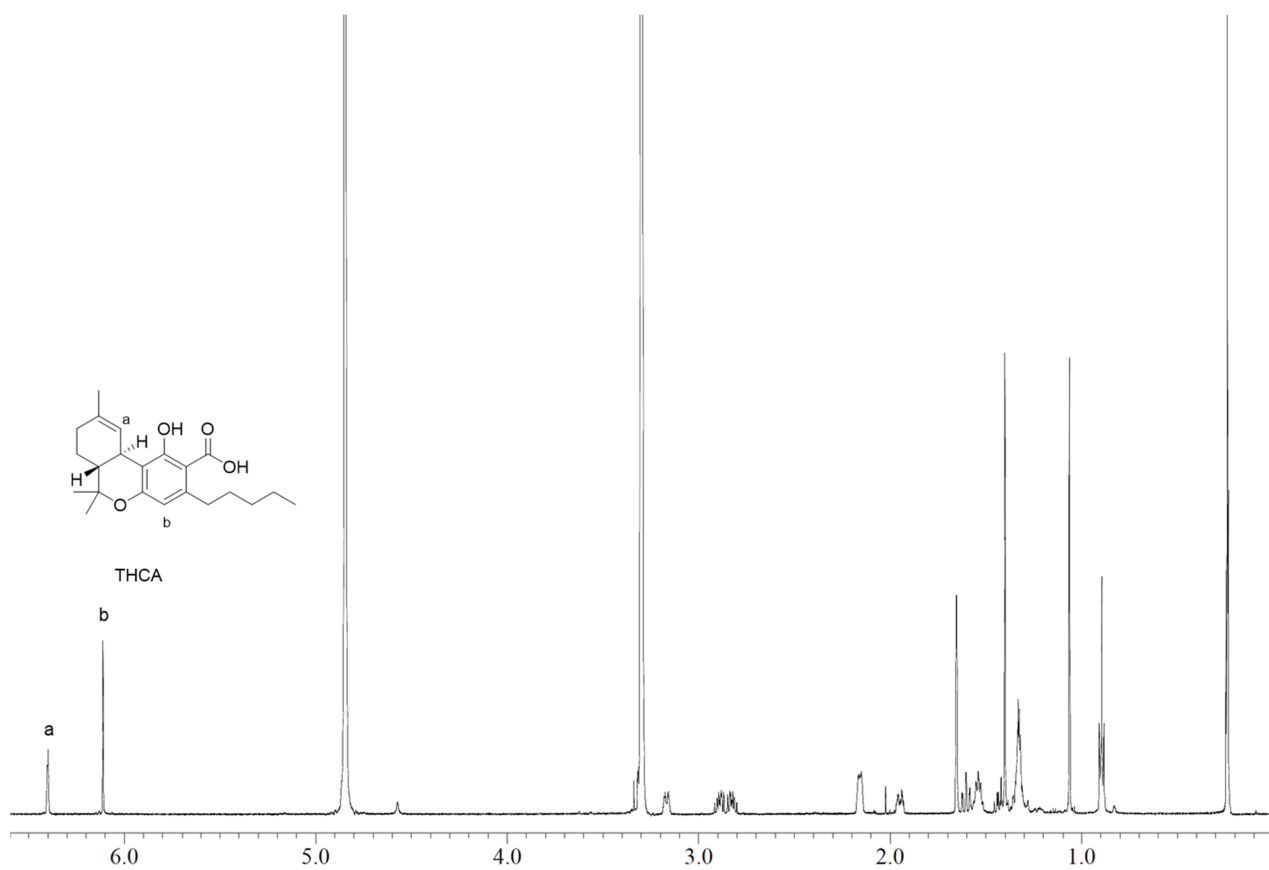
**Fig. 1** Chemical structures of  $\Delta^9$ -THC and THCA



**Fig. 2** Chemical structure of 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>



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



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

**Table 1**  $^1\text{H}$ -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**  $^1\text{H}$ -qNMR 法による  $\Delta^9$ -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**  $^1\text{H}$ -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