

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 μ g となるように 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。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 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。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 $\Delta^9\text{-THC}$, 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 $\Delta^9\text{-THC}$, 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 $\Delta^9\text{-THC}$ 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 $\Delta^9\text{-THC}$ 総量として換算し、各試料中の $\Delta^9\text{-THC}$ 含量を計算した (n=3)。

$\Delta^9\text{-THC}$ 総量の計算式:

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

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

$\Delta^9\text{-THC}$ 含量の計算式:

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

【飲料】 $\Delta^9\text{-THC}$ の含量 (%) = $\Delta^9\text{-THC}$ 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。 $\Delta^9\text{-THC}$ 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。 $\Delta^9\text{-THC}$ 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 $\Delta^9\text{-THC}$ 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, $\Delta^9\text{-THC}$ 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 $\Delta^9\text{-THC}$ の低濃度添加試料で 120%を超えるものが見られたが, $\Delta^9\text{-THC}$ 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 $\Delta^9\text{-THC}$ および THCA-A が検出された。ただし $\Delta^9\text{-THC}$ 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、 $\Delta^9\text{-THC}$ 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