

## $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸及び $\gamma$ -ブチロラクトンの分析法の検討

室井 洋昭\*, 岡崎 龍介\*, 唯是 稔\*, 倉本 智和\*, 寺内 豊\*, 松崎 隆一\*

### Examination of analysis of $\gamma$ -hydroxybutyric acid and $\gamma$ -butyrolactone

Hiroaki MUROI\*, Ryuusuke OKAZAKI\*, Minoru YUIZE\*, Norikazu KURAMOTO\*, Yutaka TERAUTI\*  
and Ryuuiti MATUZAKI\*  
\*Tokyo Customs Laboratory  
2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

GHB (( $\gamma$ -hydroxybutyric acid) is a substance having hallucinatory action and central inhibitory action. In foreign countries, GHB is used in health supplements and also in medical fields because of its excellent effect. However, since cases of poisoning and deaths due to drinking by mistake or excessive ingestion and criminal uses have occurred, GHB was designated as a narcotic drug last year for regulation also in Japan. Many reports have been made concerning GHB, but there have been few reports on the chemical properties of GHB. The authors examined the stabilities and methods of analyzing GHB and GBL, a related compound of GHB, under various conditions using FT-IR, NMR, GC/MS and HPLC. This paper reports the findings.

### 1. 緒 言

$\gamma$ -ヒドロキシ酪酸（以下GHBと略記する。）は、人の細胞内に存在する神経伝達物質で、催眠、筋弛緩、成長ホルモンの分泌促進等の作用を有している。

GHBは、医療の現場では導入麻酔剤、麻酔維持療法等に使用され、不眠症、アルコール依存症等に優れた効果を示すと言われている。また、健康補助食品としても利用されている。

しかし、誤飲、過剰摂取による中毒例や犯罪に使用される事例が見受けられるようになり、米国では1990年に製造、販売が禁止された。

また、我が国においては、インターネットの輸入代行サイトにより個人での入手が容易なため、濫用が懸念されており、死亡事例の報告もある。

そのため、平成13年10月26日より麻薬、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令が改正され、第1条第38号に「4-ヒドロキシ酪酸及びその塩類」（別名 $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸）として、新たに規制の対象となっている。

GHBの分析法としては、いくつかの報告があるが、血清等生体成分中の分析が主であり、GHBの持つ特殊な挙動につい

て報告した事例は少ない。

以上のことから、GHBの分析法を確立するため、GHBについて基礎的な検討を行うこととした。

また、GHBはラクトンに変化しやすい性質を有するため、GHBのラクトン型である $\gamma$ -ブチロラクトン（以下GBLと略記する。）についても検討し、pH変化による挙動、両者の関係、相互の判別法について、いくつかの知見が得られたので報告する。

### 2. 実 験

#### 2. 1 標準試薬

- 4-Hydroxybutyric acid sodium salt（以下GHB-Naと略記する）：ACROS ORGANICS 製
- $\gamma$ -Butyrolactone（以下GBLと略記する）：和光純薬工業（株）製

#### 2. 2 測定条件及び分析装置

##### 2. 2. 1 フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）

装置：Nicolet Magna IR 560（Nicolet社製）

測定条件：KB r 錠剤法及び液膜法

##### 2. 2. 2 核磁気共鳴スペクトル（NMR）

\* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-56

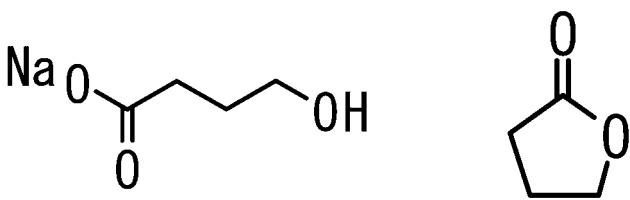


Fig. 1 Chemical structure of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid sodium salt (GHB-Na) and  $\gamma$ -butyrolactone (GBL)

装置：MERCURY-300 (VARIAN社製)

測定核種： $^1\text{H}$

溶媒：重水及び重塩酸

### 2. 2. 3 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC / MS)

装置：HP6890 (GC) / HP5973 (MS) (HEWLET PACKARD社製)

カラム：HP-5MS (30m  $\times$  0.25mm I.D 膜厚0.25  $\mu\text{m}$ )

注入口温度：200°C

昇温条件：60°C (2 min)  $\rightarrow$  (20°C/min)  $\rightarrow$  180°C (4 min)

### 2. 2. 4 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

装置：HP1100 (HEWLET PACKARD社製)

カラム：ZORBAX BONUS-RP (4.6 ID  $\times$  150mm)

移動相：水：アセトニトリル=98:2

流量：0.9ml/min

カラム温度：30°C

検出器：フォトダイオードアレイ検出器 (検出波長210 nm)

## 2. 3 実験方法

### 2. 3. 1 GHBの合成

C. S. Marvelらの方法<sup>1)</sup>によりGHBを合成した。

操作手順は以下の通りである。

① GBL 14.4mlに水酸化ナトリウム7.4g及び精製水30mlを加え、95°Cで3時間還流する。

② 反応後、生成した塩が溶解するまで水を加え、不溶分をろ過する。

③ 減圧下エバボレーターにより溶媒を留去する。

④ エタノールで再結晶し、精製する。

### 2. 3. 2 塩酸酸性下におけるIRによる測定

次の手順でGHBを調製し、IRスペクトルを測定した。

① GHB-Na 0.05 gに規定度の異なる塩酸0.1N, 1N, 2N, 6Nをそれぞれ2mlずつ加え、約1分間の超音波振とう後、反応させるために5分間室温で放置する。

② 同量のGHB-Naに塩酸1Nを2ml加え、約1分間の超音波振とう後、反応させるために5分、10分、15分及び20分間、室温で放置する。

③ 同量のGHB-Naに塩酸1Nを2ml加え、約1分間の超音波振とう後、反応させるために5分間室温放置及び60°Cで加

熱する。

④ 上記それぞれの反応液にジエチルエーテルを加え液-液抽出した後、エバボレーターで溶媒を留去する。

⑤ 液膜法にてIRスペクトルを測定する。

### 2. 3. 3 塩酸酸性下におけるNMRの測定

GHB-Na 0.02gに、濃度の異なる重塩酸0.1%, 1%, 5%, 10%, 20%をそれぞれ1mlずつ加えたものを試料溶液とし、プロトンNMRスペクトルを測定した。

### 2. 3. 4 GHBのTMS誘導体化

GHBをトリメチルシリルエーテル化 (TMS化) するため、C. A. de Vriendtらの方法<sup>(2)</sup>及びK. M. Gibsonら<sup>(3)</sup>の方法を参考とし、TMS化の最適条件を検討した。

操作は以下の通りである。

① GHB-Na 0.02 gに0.1Nの塩酸1mlを加える。

② 約1分間の超音波振とう後、反応させるために5分間室温で放置する。

③ デジタルエーテルで液-液抽出後、エバボレーターで溶媒を留去する。

④ TMS化試薬0.05mlとクロロホルム2mlを加え、60°Cで加熱したものを試料溶液とする。

TMS化試薬はTrimethylchlorosilane (以下TMCSと略記する。) のN, O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (以下BSTFAと略記する。) 溶液 (TMCSを10%含有) を使用する。

⑤ 試料溶液をGC / MSにより、EI法でマススペクトルを測定する。

また、GHB-Naを弱酸性下の状態にせず、塩のまま直接室温下及び加熱条件下でTMS化試薬と反応させた場合についての検討、並びにGBLが上記のTMS化条件により、加熱により開環しGHBと同様にTMS化されるか否かについても確認を行った。

### 2. 3. 5 HPLCの測定

GHB-Na及びGBLをそれぞれ約0.25g秤取り、超純水で100mlに定容し、0.45  $\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とし、HPLCに注入した。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 GHBとGBLの関係

#### 3. 1. 1 GHBの合成

GBLから合成したGHB-Naの融点は147°Cで、文献値<sup>4)</sup>とほぼ一致し、赤外吸収スペクトルは標準品のGHB-Naと一致した (Fig.2)。

このように塩基性下でGBLは容易に開環し、ヒドロキシカルボン酸であるGHBのナトリウム塩が生成することが確認できた。

#### 3. 1. 2 IRによる検討

標準品のGHB-Na及びGBLの赤外吸収スペクトルをFig. 3に示す。

GHB-Naでは、1560cm<sup>-1</sup>付近にカルボン酸塩のカルボニル基伸縮振動による吸収がみられる。一方、GBLでは1780 cm<sup>-1</sup>付

近にラクトンのカルボニル基伸縮振動による吸収がみられる。

次に、GHB-Naに規定度の異なる塩酸を加えて室温で5分間放置したものの赤外吸収スペクトルをFig.4に示す。GHB-Naに2N以上の濃度の塩酸を加えると、閉環してGBLになることがわかった。

一方、1N以下の場合は1720cm<sup>-1</sup>付近に強い吸収を持つスペクトルが得られる。これは二量体化したGHB遊離酸のカルボニル基の伸縮振動によるものと考えられる。

このようにカルボニル基に由来する吸収は、吸収領域がほぼ一定しており、妨害物質の影響もあまり受けず、強い吸収を示すことから、これらの判別が容易である。

次に、1N塩酸を加えた時の反応時間による挙動をFig.5に示す。反応時間の経過とともにGHBがGBLへと変化していることがわかった。

また、1N塩酸を加え、5分間の反応において加熱の有無による影響をFig.6に示す。60℃加熱によってGBLへの反応が加速されることがわかる。

### 3.1.3 NMRによる検討

GHB及びGBLについて、それぞれのプロトンNMRスペクトルの帰属をFig.7, 8に示す。

GHB-Naに0.1-20%の重塩酸を加えた場合、低濃度(0.1%)の重塩酸ではGHBのスペクトルを示すが、高濃度(20%)になると、ほぼGBLのスペクトルを示している。

このことから、強酸性下でGHB-Naは閉環し、ラクトンになることが確認された(Fig.9)。

また、中間濃度(1%~10%)の重塩酸を加えた時はGHBとGBLの両方のシグナルが認められ、反応時間、温度条件を変えても変化なく、完全にGBLへと移行しないことから、塩酸濃度(pH)によってGHBとGBLの両者が混在する平衡状態になるものと考えられる。

### 3.2 TMS化条件の検討

GHBは分子内に極性基の水酸基、カルボキシル基を有しており、そのままでは揮発性が低くGC/MSによる検出が不可能である。

そこで、GHBをトリメチルシリルエーテル(TMS)誘導体とし、GC/MSにより分析を行った。

文献等<sup>2), 3)</sup>によると、GHBのTMS化は弱酸性下TMS化試薬を加えることによって行われる。

GHB-Naに1N塩酸、TMS化試薬を加えた後60℃、5分間反応させたもののトータルイオンクロマトグラムをFig.10に示す

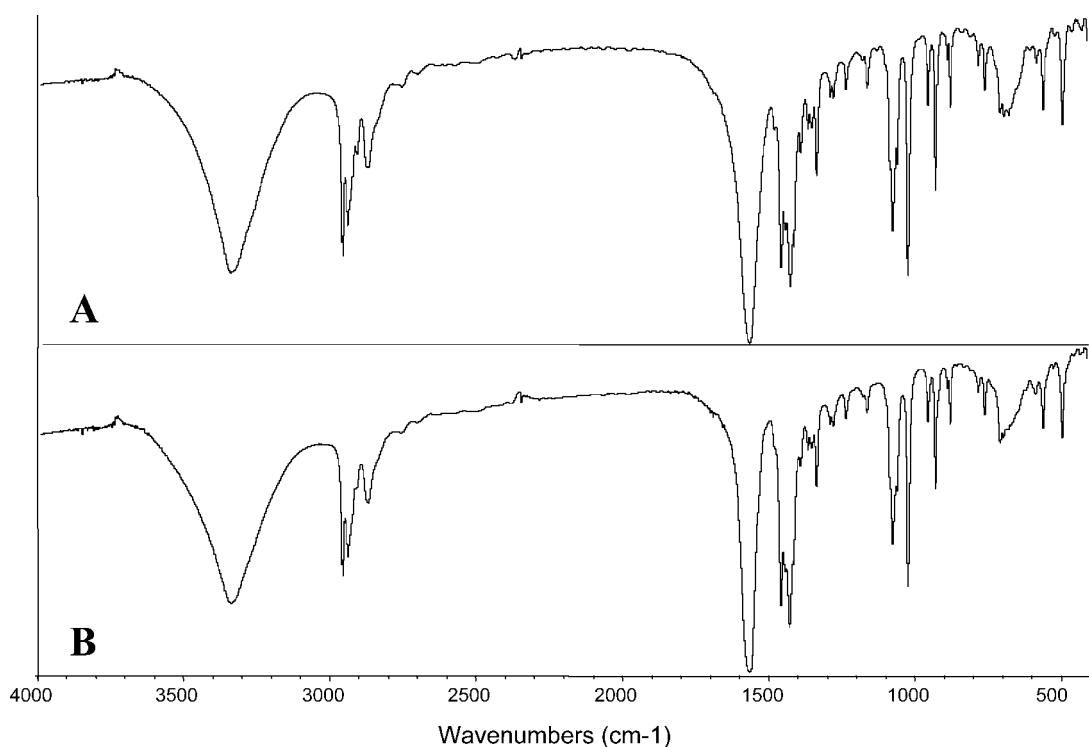


Fig. 2 IR spectra of GHB-Na : A (synthetic), B (standard)

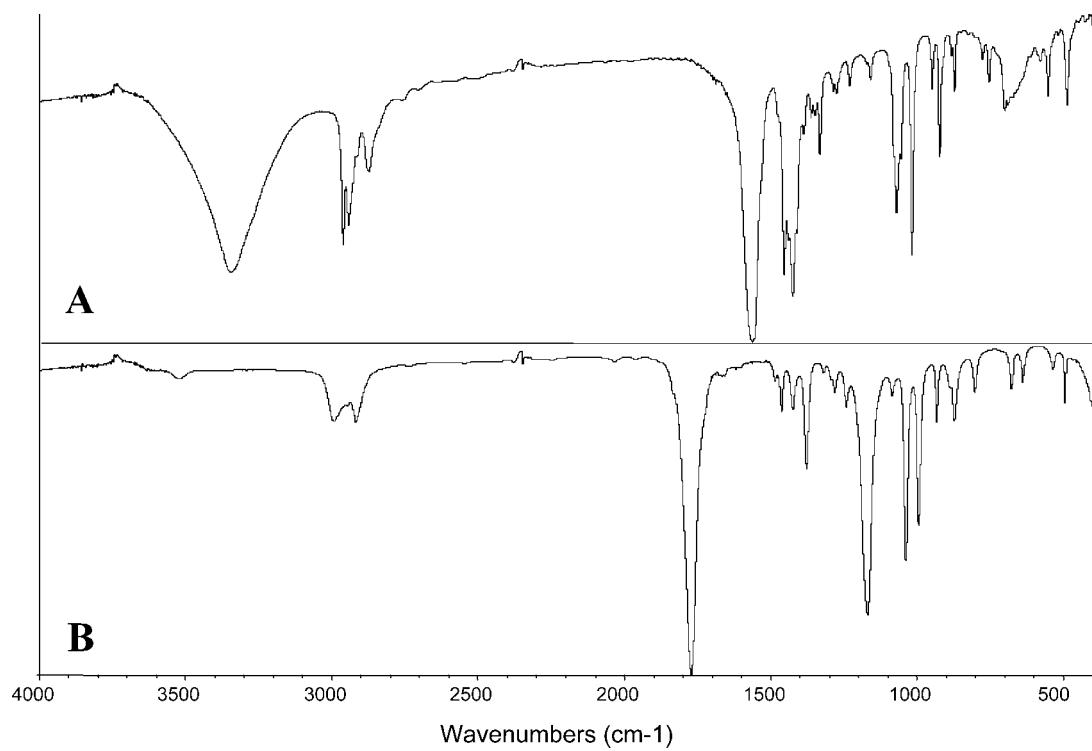


Fig. 3 IR spectra of standards : A (GHB-Na), B (GBL)

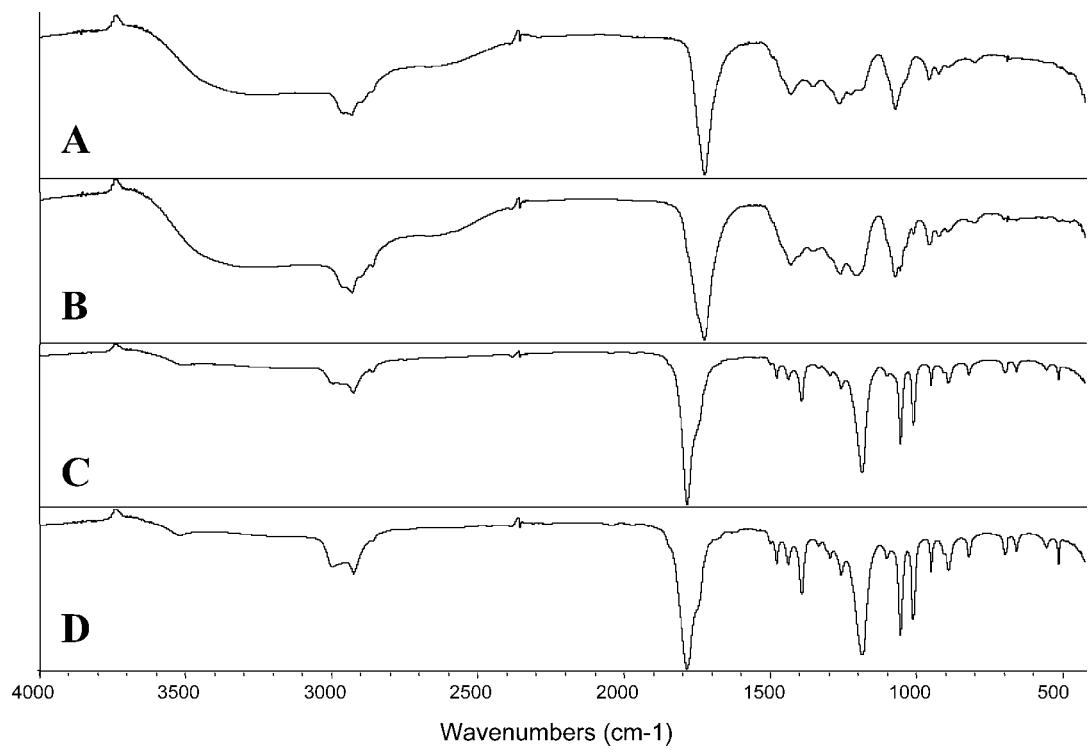


Fig. 4 IR variation of GHB added HCl in various concentrations : A (0.1 N), B (1 N), C (2 N), D (6 N)

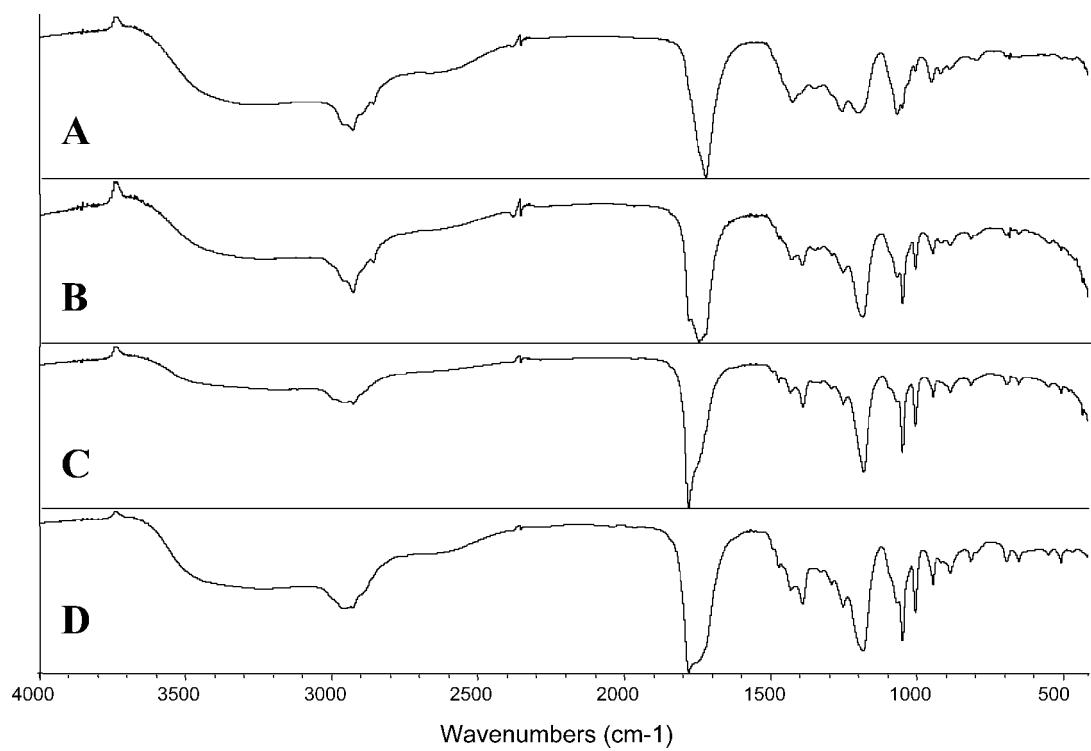


Fig. 5 IR variation of GHB by reaction time added 1N-HCl : A (5min), B (10min), C (15min), D (20min)

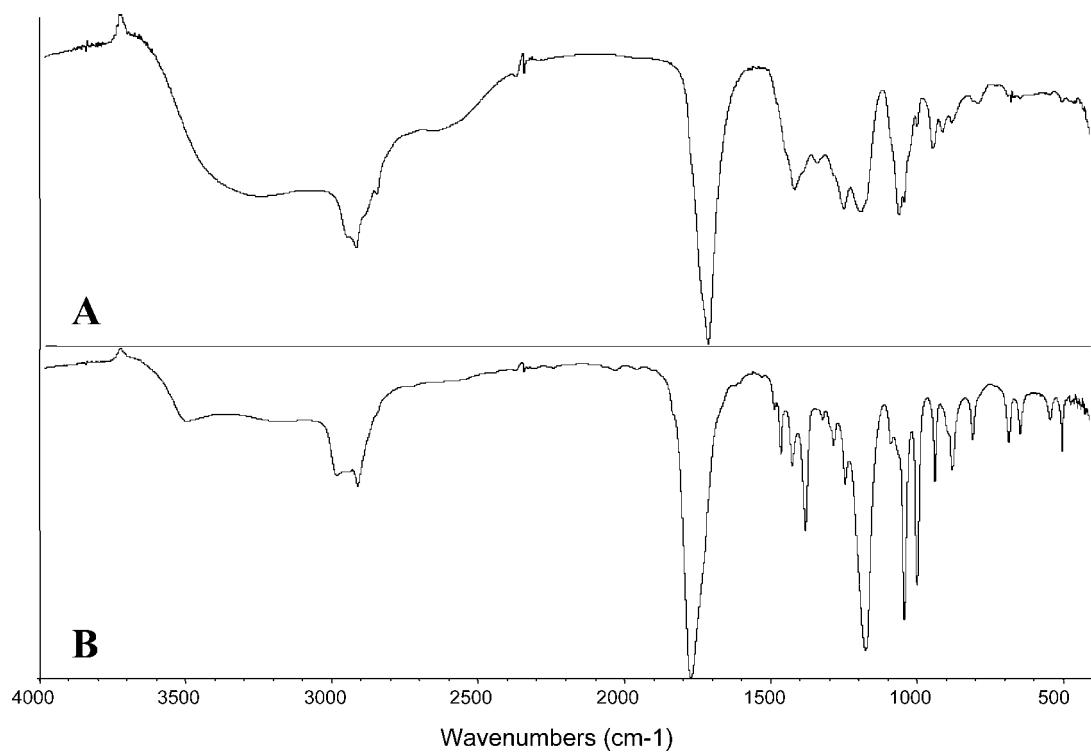
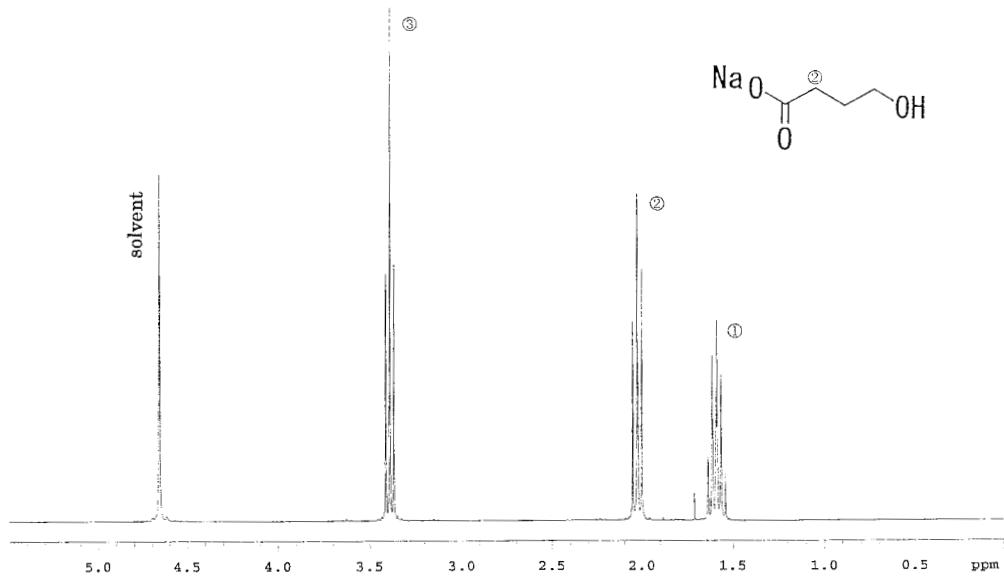
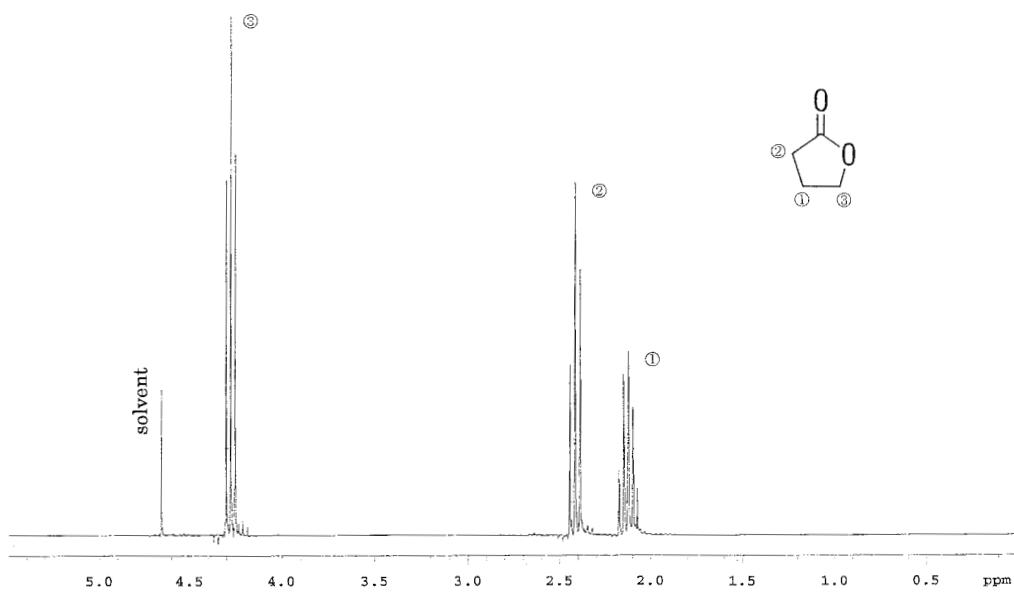
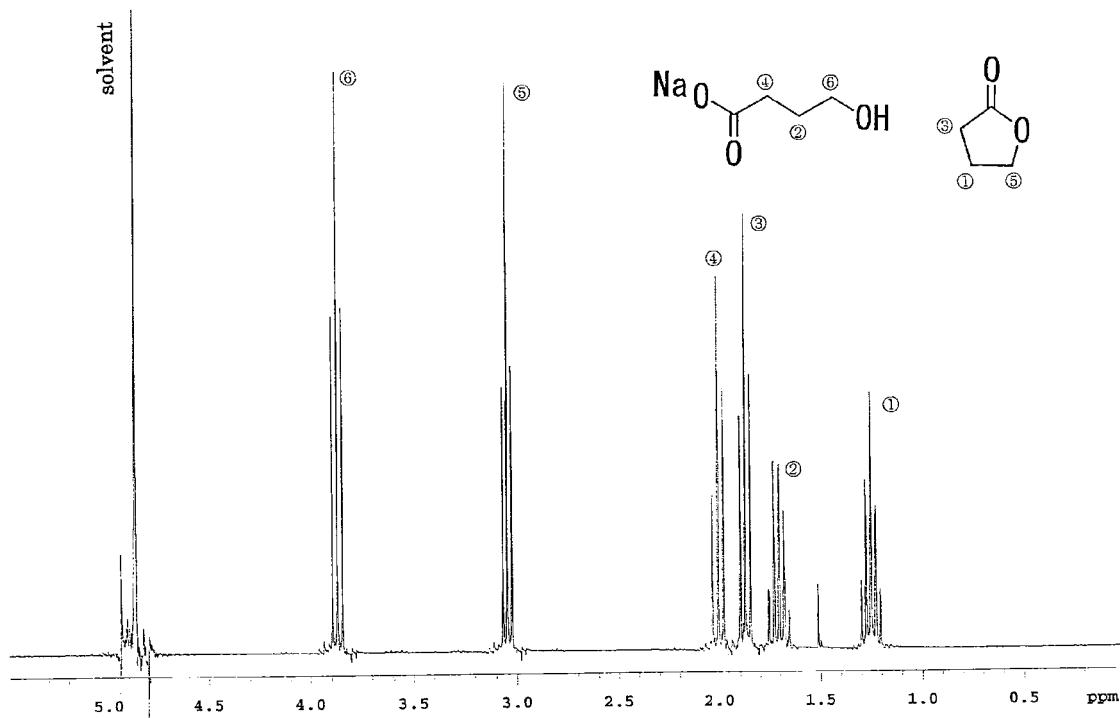


Fig. 6 IR variation of GHB on heating or at room temperature added 1N-HCl : A (60°C), B (room temperature)

Fig. 7  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of GHBFig. 8  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of GBL

Fig. 9  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of GHB added 5% HCl

が、ピークは大きく3つに分かれている。

Retention time 7.50分付近のピークのマススペクトルは、分子量-15である233のフラグメントイオン（生成したトリメチルシリルエーテルからSi-CH<sub>3</sub>結合の1つが切れたもの）が認められ、TMS誘導体に特徴的なマススペクトルを示す（Fig.11）。これよりGHBは水酸基、カルボキシル基の両方がTMS化され、di-TMS化されることが確認できる。

R.T 4.30分付近にはGBLが検出されるが、これはGHBが部分的に閉環し、GBLが生成したためと考えられる。

また、R.T 6.70付近にはGHBの副生成物であるmono-TMS誘導体と思われるピークが認められる。

GHB-Naに直接TMS化試薬を加え、加熱して反応させたもののマススペクトルをFig 12に、また室温で反応させたもののマススペクトルをFig 13に示す。いずれもdi-TMS化されるこ

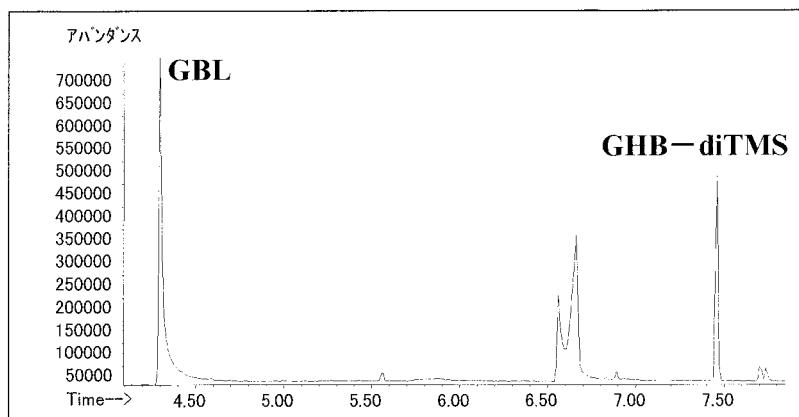


Fig. 10 Total ion chromatogram of GHB under weakly acidic and heating (60°C) conditions

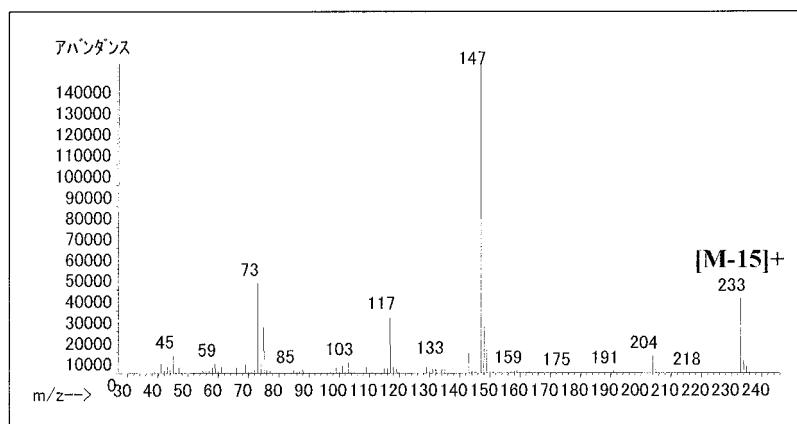


Fig. 11 Mass spectrum of GHB added TMS reagent under weakly acidic and heating (60°C) conditions

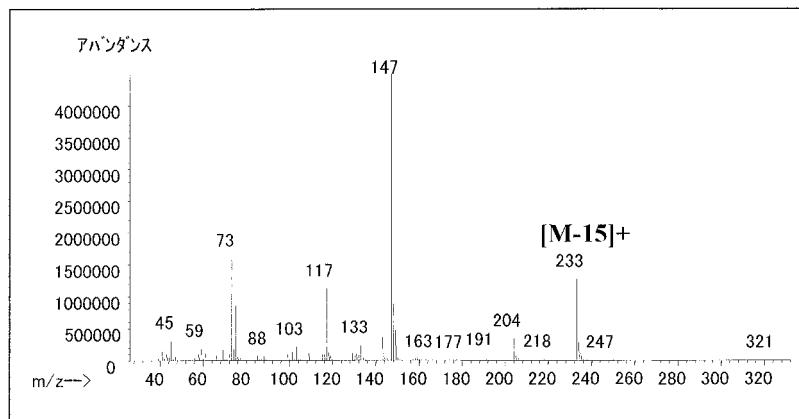


Fig. 12 Mass spectrum of GHB-diTMS under heating (60°C) conditions

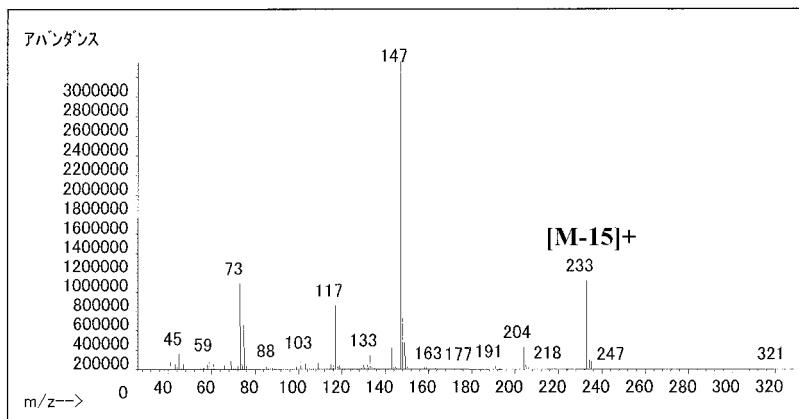


Fig. 13 Mass spectrum of GHB-diTMS at room temperature

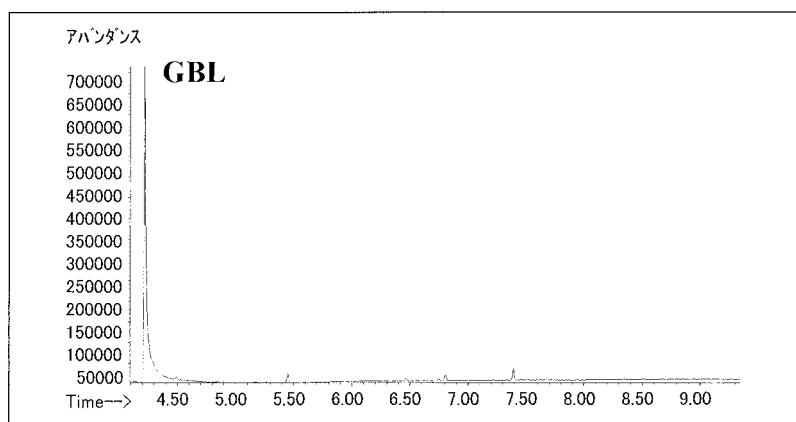


Fig. 14 Total ion chromatogram of GBL under heating (60°C) conditions

とが確認できた。

Fig.14はGBLにTMS化試薬を加え、加熱してTMS化を試みたもののトータルイオンクロマトグラムである。

Fig.10からも明らかなように、GBLは変化せずに検出される。GHBをTMS化する反応条件下では加熱による開環はせず、更にGHB-di-TMS誘導体には変化しないため、両者を判別することは可能である。

以上のことから、GC / MSによるGHBの確認にはTMS化が有効であり、その場合、GHB-Naは加熱することなく室温でTMS化されることが判った。

また、今回TMS化試薬はTMCS10%のBSTFA溶液を使用したが、TMCSの濃度を変えても影響は見られなかった。

### 3. 3 HPLCによる検討

#### 3. 3. 1 GHBとGBLの分離条件

移動相として水100%でも使用可能なカラム、Zorbax Bomus-RPを用い、GHBとGBLの混合試料について逆相分離モードにおける分離条件を検討した。

初めに有機酸の分離によく用いられるリン酸緩衝液の移動相を検討したが、GHBとGBLはほぼ同じ時間に溶出し、分離が不可能であった。

文献<sup>2)</sup>の条件を参考にした20 mM リン酸二水素カリウム：アセトニトリル=98：2を移動相とした場合では、ピークのテーリングが見られた (Fig.15 B)。これは今回使用したカラムが文献のものと異なることが原因の1つと考えられる。

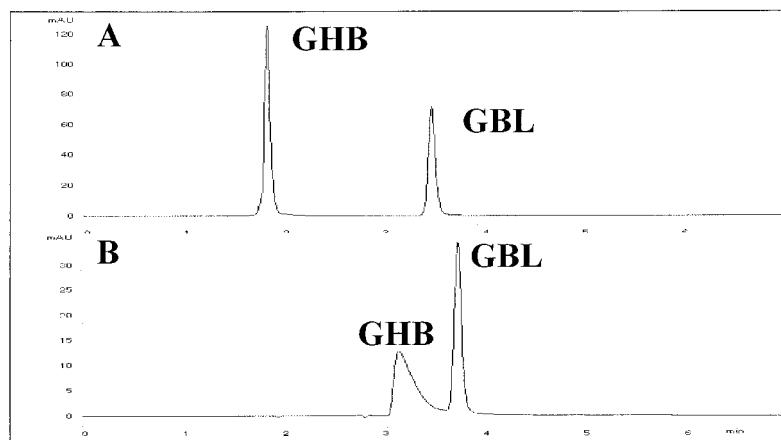


Fig. 15 Liquid chromatogram of mixture of standard GHB and GBL : 0.25%, respectively  
Mobile phase ; A ; H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN = 98 : 2  
B ; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 98 : 2

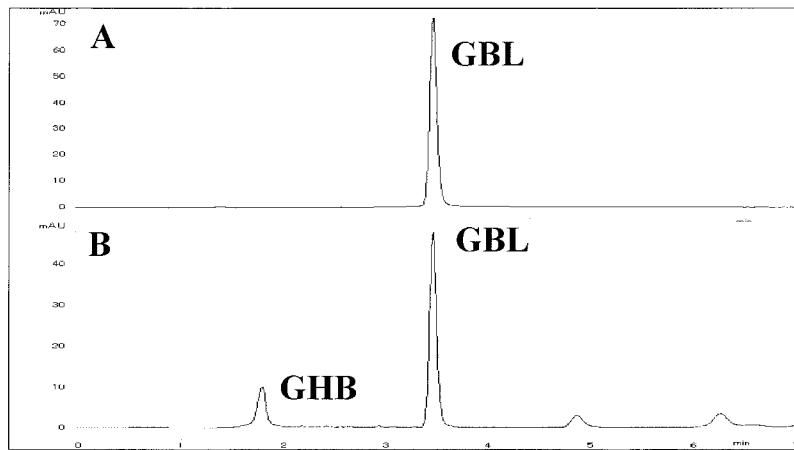


Fig. 16 Liquid chromatogram of GBL. Temperature conditions : A (room temperature), B (95°C)

水 : アセトニトリル = 98 : 2 を移動相としたもののクロマトグラムを Fig. 15A に示す。この条件では分離度が 14.28 となり、良好な分離を示した。

### 3. 3. 2 GBL の熱による変化

Fig. 16 は GBL の水溶液を室温に放置したものと、それを 95°C に加熱した場合の変化について、HPLC を用い上記分離条件により測定したものである。

この結果から GBL は加熱することにより一部開環し、GHB になることが確認できた。

### 4. 要 約

新たに規制薬物となった GHB 及びその関連化合物である GBL の分析法を検討した。

GBL は加水分解により容易に GHB を生成し、また酸性条件

下では GHB は閉環して一部 GBL となり、両者の平衡状態になることが確認できた。

GC / MS による GHB の確認において、TMS 化することが有効であり、TMS 化条件としては、GHB-Na に TMS 化試薬を加えて室温で TMS 化することが好ましい。

HPLC により、GHB と GBL はカラム Zorbax Bomus-RP を用い、移動相が水 : アセトニトリル = 98 : 2 の場合において良好な分離を示した。

しかし、他の物質が混入された場合等、今後、検討しなければならない課題もある。

### 文 献

- 1) C. S. Marvel, E. R. Birkhimer : , 59, 260 (1929)
- 2) C. A. de Vriendt, D. K. van Sassenbroeck, M. T. Rosseel, E. J. van de Velde, A. G. Verstrete, Y. Vander Heyden, F. M. Belpaire : J Chromatography B, 752, 85 (2001)
- 3) K. M. Gibson, S. Aramaki, L. Sweetman, W. L. Nyhan, D. C. DeVivo, A. K. Hodson, C. Jakobs : 19, 89 (1990)
- 4) 日本分析化学会編：分析化学便覧，改訂四版，(1991)