〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
34 (3) 237-240 (1988)

大麻の識別——高性能逆相薄層クロマトグラフィーによる
カンナビノイドの検出とその現場試験への応用

世取山 守, 鈴木秀夫
栃木県衛生研究所

Discrimination of Cannabis. Determination of Cannabinoids by High
Performance Reversed Phase Thin Layer Chromatography
and Its Application to the Field-Test

MAMORU YOTORIYAMA and HIDEO SUZUKI
Tochigi Prefectural Institute of Public Health, 4-9-7,
Yonan, Utsunomiya 320, Japan

(Received December 21, 1987)

By the use of reversed phase high performance thin layer chromatography, most cannabis acids were able to be separated from neutral cannabinoids (CN) simultaneously.

Therefore, the following field-test for cannabis has been developed; cannabis were extracted with acetone for 2-3 min, developed in acetonitrile for 5 min, dipped in a color-producing reagent where Echtblausalz B was suspended in a solution of sodium hydroxide for one second. This method made it possible to distinguish clearly the types of cannabis with different CN, CBDA species, native varieties and hybridized varieties. Moreover, the results agreed very closely with those obtained by the conventional GC method.

Keywords—cannabis; cannabinoids; HPLC; reversed phase HPTLC; field-test

ま え が き

大麻の成分としてはカンナビノイド (CN) 酸の tetrahydrocannabinolic acid (THCA), cannabidiolic acid (CBDA), cannabinolic acid (CBNA), cannabichromenic acid (CBCA) 等や, これらが脱炭酸した tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabichromene (CBC) 等の中性 CN が上げられる。

CN の分析には薄層クロマトグラフィー (TLC),¹⁾ ガスクロマトグラフィー (GC),²⁾ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC),³⁾ ラジオイムノアッセイ法 (RIA)⁴⁾ 等が用いられている。従来, TLC 法では順相系の担体を用い, CN 酸と中性 CN を検出するため, 異なった展開溶媒を使用しなければならなかった。また, GC 法でも通常の方法では CN 酸と中性 CN を同時に分析することができない。しかし, HPLC 法では, これらの CN を同時に分離測定でき, 種々の検出試薬⁵⁾ や検出器⁶⁾ により CN を高感度で検出できるようになった。RIA 法

でも CN を感度よく検出できるが, 放射性物質を使用するため, 使用施設が限られてしまう欠点がある。

近年, 展開時間の短縮, スポット量の少量化, 分離能の向上等を備えた高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) が種々の分析に用いられるようになった。⁷⁾ この HPTLC の担体の中で逆相タイプがあることに着目し, CN の分離条件の検討を行ったところ, 単一展開溶媒で CN 酸と中性 CN が短時間に, 同時に分析できるようになった。そこで, 本研究では, 大麻から CN の抽出方法, HPTLC の展開溶媒, 展開時間, 発色操作等を改良し, 大麻の現場試験法を開発し, 大麻の成分チェック試験や新旧大麻の成分比較等に应用したところ, 有効な方法であることが判明したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料 古い試料は THCA を主成分とする在来種の葉で, 1986年7月に採取し, 11ヵ月間室内に保存したもの。新しい試料は在来種及び CBDA を主成分とする CBDA 種の葉で, 1987年6月9日に, 当研究所内の

大麻畑 (広さ約 1 m²) から採取し、当日、試料とした。

2. 試薬 CN 標準品は世取山⁹⁾ らによって精製し、当所に保存していたエキスを及び Shoyama らの方法¹⁾ と 4 の HPLC 条件を利用し、分取したエキスを少量のエタノールに溶解した。

3. 試験溶液の調製 乾燥済みの古い大麻 0.2 g を細切し、アセトン 2 ml を加え、10 分間超音波抽出し、フィルター (DSMIS-13 JP, 0.5 μm, アドバンチック社製) でろ過し、そのろ液を試験溶液とした。

水分含量の多い、新鮮な大麻の葉 1—2 枚⁹⁾ (生重量で 0.3—0.6 g) をハサミで切り、試験管に入れ、アセトン 2 ml を加え、ガラス棒でかき混ぜながら抽出し、同様にろ過し、試験溶液とした。

4. HPLC の条件 装置: 日立 655 A, カラム: 4 mm i.d. × 150 mm のステンレスカラムに Partisil 10-ODS-3 を充填した。検出器: UV, 220 nm, 移動相: メタノール-0.02 N 硫酸 (4:1), 流量: 2.0 ml/min, カラム温度: 室温。

5. HPTLC の条件 展開溶媒: アセトニトリル, HPTLC プレート: RP-18 F₂₅₄s, 10 × 10 cm, 層厚は 0.2 mm のもの (Merk 13724)。発色試薬: Echtblausalz B (Merk) 8 mg を 0.1 N-NaOH 溶液 10 ml に懸濁させたもの。¹⁰⁾ 大麻の成分・THC, CBD, CBN に対して 0.01 μg の優れた感度を示す。¹¹⁾

6. 現場試験法の器具及び試薬 ネジ口試験管: 口内径 13 mm, 全長 140 mm のもの 3 本用いる。試験管 (A) にはあらかじめ抽出溶媒としてアセトン 2 ml, 試験管 (B) には展開溶媒としてアセトニトリル 1 ml, 試験管 (C) には 0.1 N-NaOH 溶液 20 ml を入れ、ネジをしておく。パスツールピペット: 外径 7 mm, 長さ 150 mm の市販されているもの。HPTLC: 5 と同じも

fresh sample 0.3—0.6 g

cut

test tube A

extract with 2 ml of acetone for 2—3 min
apply to HPTLC plate

test tube B

develop with 1 ml of acetonitrile for 5 min
dry

test tube C

add 20 ml of 0.1 N-NaOH and 16 mg of
Echtblausalz B

immerse a plate for 1 s

coloration

Chart 1. Analytical Procedure for the Field-Test of Cannabis

のを 1 × 10 cm に切断して用いる。発色試薬: 発色する直前に, Echtblausalz B 16 mg を試験管 (C) に懸濁させて使用する。

7. 現場試験法の操作 大麻の先端の小葉 1—2 枚を採取し、ハサミで細切し、試験管 (A) に入れる。パスツールピペットで 2—3 分間抽出する。その抽出液をパスツールピペットでプレートに 1—2 回スポットする。このプレートを試験管 (B) に入れ、直ちにネジをし、5 分間展開する。プレートの溶媒を揮散させ、試験管 (C) に約 1 秒間浸漬し、余分の発色液をろ紙等でふきとる。発色の程度が薄い場合はもう一度、発色操作を繰り返す。

結果と考察

4 種類の CN 酸・CBDA, CBNA, THCA, CBCA 及びこれらの中性 CN・CBD, CBN, THC, CBC の 8 種類について HPLC の結果を Fig. 1 に示した。

以前、著者らは大麻の品種改良に HPLC を用いたことがあるが、⁹⁾ このときの条件では CBCA が出終るまでの溶出時間が約 22 分であったが、今回は約 12 分と短縮された。更に、波長を 254 nm から 220 nm に変更した

Fig. 1. High Performance Liquid Chromatogram of Cannabinoids

Peak 1: CBD, 2: CBDA, 3: CBN, 4: THC, 5: CBC, 6: CBNA, 7: THCA, 8: CBCA.

Fig. 2. High Performance Thin Layer Chromatogram of Cannabinoids

Sample 1—8: same as Peak 1—8 in Fig. 1, 9: fresh CBDA cannabis, 10: fresh native cannabis, 11: mixture of CBDA cannabis and native cannabis, 12: old native cannabis.

ため、CBCA を除くすべての CN に感度がよくなった。著者らはこの HPLC の条件を利用して、THCA の分取クロマトグラフィーを行い、分離精製がより簡単にできた。そのため、他の CN の分離精製にも利用できると考えている。

つぎに、HPTLC について、いままでの大麻の抽出溶媒は乾燥試料を対象としたため、ベンゼン、ヘキサン、エーテル等の無極性溶媒が使用されてきたが、本研究では水分が多く含まれている新鮮な大麻の葉からも CN 抽出可能な溶媒（アセトン、エタノール、アセトニトリル、メタノール等）について検討したところ、アセトンが最も効率よく CN を抽出できることがわかった。

展開溶媒については、HPLC の溶離液、メタノール-0.02 N 硫酸 (4:1) を用いたところ、CN はほとんど原点にとどまっていた。メタノール-水 (4:1) では CN が多少展開したものの、十分な分離は得られなかった。また、抽出溶媒のアセトンではアセトニトリルとほぼ同じ展開時間を要したが、THC と THCA の分離が不十分であった。メタノールでは、アセトニトリルと同様に CN を分離したが、展開時間がアセトニトリルの約 2 倍かかった。以上の結果から、展開溶媒はアセトニトリルを使用することにした。

この溶媒を用い、8 種類の CN について HPTLC を行った結果を Fig. 2 に示した。Fig. 2 の No. 1—8 までの CN の順序は HPLC の CN の溶出順序と全く同一であった。各 CN の呈色は CBD, CBDA が橙、

CBNA が茶、その他の CN が赤から赤紫の色調を示した。主な CN の検出感度は THCA が $0.1 \mu\text{g}$ 、THC が $0.05 \mu\text{g}$ であった。従来の TLC では順相の担体（シリカゲル）であったため、CN 酸はヘキサン-酢酸エチル (1:1)、中性 CN ではベンゼン等と、別々の展開溶媒を用いて検出していた。今回の結果により、単一溶媒で主な CN 酸と中性 CN が同時に分析可能となった。

そこで、実際の試料について検討したのが Fig. 2 の No. 9—12 である。No. 9 は CBDA 種で、主成分の CBDA を検出した。この大麻は幻覚成分 THCA の含量が少ないので、大麻禍防止のため、栃木県では品種改良を行い、繊維作物に適した大麻を育成し、現在、とちぎしろ種として栽培されている。No. 10 は在来種で、主成分の THCA を検出した。No. 11 は CBDA 種と在来種の葉を 1 枚ずつ混ぜて抽出したものであり、各々の主成分 CBDA と THCA を検出した。Rf 値は CBDA が 0.57、THCA が 0.36 と差があり、しかも、発色試薬により CBDA は橙色、THCA は赤紫色と明確に区別ができた。No. 12 は採取後約 1 年を経た大麻の葉で、主成分の THCA の他に、THC も検出した。これは時間の経過とともに THCA が脱炭酸し、THC に変化したためである。

栃木県では、とちぎしろ種に栽培を切り替えてから、3 年を経過している。この大麻は在来種と交雑すると幻覚成分の THCA を含むようになること²⁾ が危惧される。そのため、交雑しているかどうかの成分チェック試験が必要となってくる。従来の大麻の現場試験は渡辺が開発した方法¹²⁾ で実施していたが、在来種はクロロホルム層が赤変するが、交雑種では赤変しにくいこと、また、大麻畑から直接採取した葉を、直ちに試験できる方法はないか等という、現場からの意見があった。渡辺の方法は総 CN の呈色反応であり、大麻以外の植物との区別には有効であるが、CN の主成分が異なる大麻の区別はしにくいこと、また、主に乾燥試料を対象にした抽出溶媒を使用しているためである。

そこで、CN の違いが区別でき、水分含量の多い試料でも抽出可能な現場試験法を開発した (Chart 1)。Fig. 2 の No. 9—12 と同じ試料を用いて検討した結果を Fig. 3 に示した。展開時間を 5 分間とし、パスツールピペットを抽出兼スポット用に使用したため、スポットがやや大きくなったが、CBDA 種、在来種、これらの混合物、1 年経過後の在来種の大麻の区別は容易にできた。この方法は 1 サンプルずつ実施する方法であるが、現場で多数のサンプルを処理する場合は $5 \times 10 \text{ cm}$ あるいは $10 \times 10 \text{ cm}$ のプレートを使用展開し、スプレー等

Fig. 3. High Performance Thin Layer Chromatogram of Field-Test in Cannabis

Sample 1, 2, 3 and 4 are same as sample 9, 10, 11 and 12 in Fig. 2, respectively.

TABLE I. The Result of Field-Test in Cannabis

Speciment	CBDA-cannabis	A native cannabis	Crossing cannabis
28	22	3	3

で発色させるのも1つの手段である。また、スポットが多少大きくなっても十分な分離が得られる、濃縮ゾーン

付きのプレートも市販されているので利用されるとよい。しかし、この方法の欠点は、発色液を長時間保存することが困難なので、使用の都度、調製することが望まれる。ただし、発色後のプレートの色は安定である。当研究所内の大麻畑で試験的に栽培した大麻について、この方法で実施した結果を Table I に示した。28検体中、CBDA 種型が22検体、在来種型が3検体、交雑種型が3検体であった。更に、これらの検体について GC 法²⁾により検討、比較したところ、同様の結果を得たため、この方法が CN の現場試験法として有効であることが認識された。

今後は、容器、試薬の改良など実用面についても検討を加え、更に、この方法が大麻の取締りの現場における鑑別法としても関心が寄せられることを期待する。

ま と め

1. 逆相タイプの HPTLC で大麻の主な CN 酸と中性 CN を同時に分離することが可能となった。
2. この HPTLC と3本の試験管により、抽出、展開、発色操作が可能で、大麻の現場試験法を開発した。
3. この方法により CN の異なる大麻、CBDA 種型、在来種型、交雑種型を明確に区別することができ、また、この結果と従来の GC 法の結果は全く一致していた。

引用文献及び注

- 1) Y. Shoyama, T. Yamauchi, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1327 (1970).
- 2) 世取山守, 沼尾公道, *衛生化学*, **25**, 166 (1979).
- 3) 世取山守, 伊藤 功, 高島大典, 正山征洋, 西岡五夫, *薬学雑誌*, **100**, 611 (1980).
- 4) P.L. Williams, A.C. Moffat, *J. Chromatogr.*, **186**, 595 (1979).
- 5) H.K. Borys, R. Karler, *J. Chromatogr.*, **205**, 303 (1981); C. Maseda, Y. Fukui, K. Kimura, K. Matsubara, *J. Forensic Sci.*, **28**, 911 (1983).
- 6) Y. Nakahara, H. Sekine, *J. Anal. Toxicol.*, **9**, 121 (1985).
- 7) 藤沼賢司, 冠 政光, 中里光男, 有賀孝成, 直井家壽太, *食衛誌*, **22**, 263 (1981); 宇野正清, 岡田 作, 大前利隆, 寺田育子, 谷川 薫, *ibid.*, **23**, 191 (1982); 斉藤貢一, 堀江正一, 星野庸二, 能勢憲秀, 中澤裕之, *衛生化学*, **32**, 442 (1986).
- 8) 世取山守, 福富 清, 志賀信雄, 第15回栃木県公衆衛生学会, 宇都宮, 1977年11月, pp.32-36; 世取山守, *衛生化学*, **26**, 50 (1980).
- 9) 大麻草の各部から採取した葉について、直ちに水分含有率を求めたところ、 $72.3 \pm 3.4\%$ ($n=12$) であった。
- 10) 朝比奈晴世, 島峰望彦, 高橋一徳, *衛生試験所報告*, **86**, 21 (1968).
- 11) F. Korte, H. Sieper, *J. Chromatogr.*, **13**, 90 (1964).
- 12) 渡辺敬三, *衛生化学*, **16**, 101 (1970).