キャピラリーガスクロマトグラフィーによる大麻油中の カンナビノイドの定量

世取山守, 岡田安雄, 鈴木邦夫

栃木県衛生研究所

Determination of Cannabinoids in Cannabis Oil by Capillary Gas Chromatography

MAMORU YOTORIYAMA, YASUO OKADA and KUNIO SUZUKI

Tochigi Prefectural Institute of Public Health, 4-9-7, Yonan, Utsunomiya-shi 320,
Japan

(Received April 14, 1992)

Cannabis oil (1 g) was extracted with *n*-hexane-saturated acetonitrile, and 91% of oil was removed by this method. Cannabinoids in extracted cannabis oil were identified by high performance thin layer chromatography (HPTLC) and capillary gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The cannabinoid contents were determined by capillary gas chromatography (GC) using 5 α -cholestane as an internal standard. Contents of CBD in the cannabis oil were 121 $\pm$ 17 μ g/g. However, other cannabinoids (THC and CBN) were not detected in this cannabis oil by HPTLC, GC-MS or GC.

Keywords — cannabis oil; cannabinoid; capillary gas chromatography; cannabidiol

はじめに

大麻の種子は大麻取締法から除かれているが、Matsunaga ら¹⁾は種子の表皮からテトラヒドロカンナビノール (THC) 及びカンナビノール (CBN) を検出している。大麻の種子を原料として製造される大麻油中にもこれらのカンナビノイド (CN) が含まれる可能性がある。

大麻油は昔、ボイル油、仮漆ペイント、燈用等に使用したらしいが、現在ではあまり使用してない。栃木県では、大麻油中にリノール酸、リノレン酸等の不飽和脂肪酸が多く含まれることに着目し、食用油としての試みもなされてきた。²⁾

これまでの大麻油中の CN の研究としては、大野ら³⁾は種子を乳鉢ですりつぶし、石油エーテルで抽出したエキス中の THC について、ガスクロマトグラフィー (GC) 及び呈色反応を用いて測定したが不検出であったと報告している。また、松永ら⁴⁾は大麻の種子をすりつぶし、その抽出エキスより CN を GC 及び薄層クロマトグラフィー (TLC) で検出して

いるが、多量の油脂成分が含まれているため CN の定量まではいたらなかった。このように、多量に含まれる油脂のため、大麻油中の CN は定量が困難とされていた。

そこで、著者らは油脂成分と CN を分離する目的で、農薬分析で通常用いられているヘキサノール-アセトニトリル分配法について検討した。また、大麻油と脂肪酸組成が似ている大豆油²⁾に CN エキスを添加し、回収率の検討を行うとともに、大麻油中の CN をハイパフォーマンス TLC (HPTLC) 及び GC 質量分析計 (GC/MS) で同定し、キャピラリー GC により定量することができたので報告する。

実験方法

1. 試料²⁾ 下記の方法により搾油した試料 1.8 l を宇都宮大学教育学部見目明継教授より譲り受けた。

大麻油の搾油方法：昭和 58 年に大麻種子 (昭和 57 年産) 21 kg を鉄製煎釜で 5 分間煤煎した。それをエキスペラー型搾油機にかけて絞った油を 80°C に

加熱して、6枚のフィルターでろ過し、油かすを除き試料油4.5 kgを得た(大麻油1 gは種子4.7 gに相当する)。

なお、搾油後の大麻油は褐色びんに入れ、直射日光を避け、室内に放置しておいた。

2. 試薬 CN標準品及び添加CNエキス：著者ら⁵⁾の方法によって精製されたものを使用した。添加用CNエキス溶液：各エキスのガスクロマトグラムのピーク面積百分率法(%)により、THCエキス、Cannabidiol (CBD)エキス及びCBNエキス中には各々THC 90.0, CBD 79.8及びCBN 99.8%が主に含まれていた。各エキス20.0 mgを各々取り、ヘキサン20.0 mlに溶かした(これらの溶液1 mlはエキス1 mgを含む)。大豆油：和光純薬一級を使用した(CNが含まれていないことをHPTLC及びGCにて確認済み)。コレスタン溶液(内部標準溶液)：5 α -コレスタン (Sigma社製) 0.1 gを少量のヘキサンに溶かして、アセトンで100 mlとした(この溶液1 ml中にコレスタン1 mgを含む)。

3. 大豆油からのCNの回収率の方法 操作⁶⁾——添加用CNエキス溶液を各々3 mlずつ、50 mlビーカーにとり、N₂気流中で溶媒を除いた後、大豆油3 gを正確に加えた。ヘキサン15 mlで100 ml分液ロートに流し込み、ヘキサン飽和アセトニトリル30 mlと共に10分間激しく振とうした。ヘキサン層はさらに2回同様の操作を繰り返した。アセトニトリル抽出液を2%塩化ナトリウム溶液600 mlで希釈後、ヘキサン100 mlを加え、激しく振とうした。ヘキサン層は水100 mlで2回洗い、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去し、さらにN₂気流中で30分間乾燥し、残存する油脂量を求めた。次に、内部標準物質であるコレスタン溶液(1 mg/ml) 3 mlを加えてエキスを溶かし、2 μ lをGCへ注入した。得られたクロマトグラムより各CNとコレスタンとの面積比を求め、下記の基準液で求めた面積比と比較した。

添加回収率の基準液の調製——添加用CNエキス溶液を各々3 mlずつを共栓つき試験管にとり、N₂気流中で溶媒を除いた後、コレスタン溶液(1 mg/ml) 3 mlを加えて各エキスを溶かし、2 μ lをGCへ注入した。得られたクロマトグラムより各CNとコレスタンとの面積比を求め、回収率100%として、添加回収率の基準とした。

4. 大麻油からのCNの抽出及び定性、定量方法 50 mlビーカーに大麻油1 gを正確にとり、3.と同様に操作し、コレスタン溶液(0.2 mg/ml) 1 mlに溶

かした。この溶液の一部をHPTLC, GC-MSによる同定に使用した。さらに、定量には、この溶液2 μ lをGCへ注入し、得られたクロマトグラムよりCNとコレスタンとの面積比を、さらに、検量線よりコレスタンとの重量比を求め、次式に従い試料中のCN濃度を求めた。

$$\text{CN 濃度}(\mu\text{g/g}) = \frac{0.2 \times W \times V}{M} \times 1000$$

W：検量線より求めたコレスタンとの重量比

V：4.でのコレスタン溶液の量 (ml)

M：試料の重量 (g)

5. HPTLCの条件 著者ら⁵⁾の方法により、展開溶媒：アセトニトリル, HPTLCプレート：RP-18 (Merk 15037), 発色試薬：Echtblausalz B (Merk) を0.1 N-NaOH溶液に懸濁したものを使用した。

6. GC-MSの条件 GC部：Hewlett Packard社製のHP-5890 A, カラム：Ultra 1, 25 m length, 0.2 mm i.d., 0.33 μ m film thickness, カラム温度：注入口：250°C, カラム：200°C-20°C/min-250°C (10 min)-20°C/min-280°C (21 min), キャリアガス(He)：0.55 ml/min, 注入：split(1/50), 2 μ l, MS部：HP-5970 B, Transfer Line 温度：280°C, イオン化電圧：70 eV。

7. キャピラリーGCの条件 装置：HP-5890 A, カラム：6.と同様, カラム温度：注入口及び検出器：250°C, カラム：6.と同様, キャリアガス(He)：0.55 ml/min, H₂：30 ml/min, air：400 ml/min, メイクアップガス(N₂)：30 ml/min, 注入：split(1/50), 2 μ l, Range：5, インテグレーター：日立D-2500。

8. CNの検量線の作成 CN濃度0.075-0.6 mg/mlの溶液を作成し、これに等量のコレスタン溶液を加えた(コレスタン濃度は0.2 mg/ml)。この溶液2 μ lをGCへ供し、得られたクロマトグラムより各CNとコレスタンとの面積比を横軸に、重量比を縦軸にとり検量線を作成した。なお、ピーク面積はインテグレーターD-2500のBase Line補正後の値を使用した。CBDの検量線は原点を通りY=1.19 Xであった。

結果と考察

1. 大豆油からのCNの回収率の検討

ヘキサン-アセトニトリル分配法による油脂の除去率は、油脂3 gを用いた場合、約97%であった。

本来の添加回収実験では既知濃度の試料を使用す

TABLE I. Recoveries of Cannabinoids in Extracts Added to Soybean Oil

Cannabinoid Extracts				
	(A) CBD peak ^{a)}	(B) Cholestane peak ^{a)}	A/B	Recovery (%) ^{b)}
CBD Extract	14 276	37 617	0.380	100.0
CBD Extract+Soybean Oil ①	14 130	38 835	0.364	95.8
CBD Extract+Soybean Oil ②	15 234	41 332	0.369	97.1
	(A) THC peak ^{a)}	(B) Cholestane peak ^{a)}	A/B	Recovery (%) ^{b)}
THC Extract	22 649	40 127	0.564	100.0
THC Extract+Soybean Oil ①	21 454	42 571	0.504	89.4
THC Extract+Soybean Oil ②	20 880	41 014	0.509	90.2
	(A) CBN peak ^{a)}	(B) Cholestane peak ^{a)}	A/B	Recovery (%) ^{b)}
CBN Extract	31 482	38 530	0.817	100.0
CBN Extract+Soybean Oil ①	29 816	39 406	0.757	92.7
CBN Extract+Soybean Oil ②	29 879	39 485	0.757	92.7

a) Peak areas calculated with a Hitachi D-2500 chromatointegrator.

b) The calculation method was given in Materials and Methods.

るが、今回は、添加用の標準試料の量が十分得られなかったことから、各CNを主成分とするエキスを添加することにし、各々のエキス中のCNの回収率を求めた。その結果をTable Iに示した。

CBDエキス中のCBD回収率は平均96.5%，THCエキス中のTHC回収率は平均89.8%，CBNエキス中のCBN回収率は92.7%であった。

2. HPTLCによる定性

R_f 値 0.62 の位置に橙色のスポットを認めた。標準品との比較によりCBDとCannabidiolic acid (CBDA) の2成分が考えられるが、搾油過程で80℃に加熱していることからCBDAは脱炭酸してCBDに変換したと考えられた。また、この反応は保存期間中にも進行することが知られている。⁷⁾ この

Fig. 1. Mass Chromatogram of CBD, THC, CBN and I.S. (A), Mass Chromatogram of Cannabis Oil (B), Mass Spectrum of CBD in Cannabis Oil (C)

I.S.; internal standard.

ため、このスポットは CBD と推定した。これ以外の CN のスポットは認められなかった。

3. GC-MS による定性

標準物質 (CBD, THC, CBN) のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 1A に、大麻油のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 1B に、Fig. 1B のスキャン 8.166 min のマススペクトルを Fig. 1C に示した。GC-MS におけるスキャン 8.166 min のマススペクトルが標品と一致したことから、大麻油中に含まれるスキャン 8.166 min の CN は CBD と確認された。大麻油抽出物のトータルイオンクロマトグラム (Fig. 1B) 上では THC, CBN に相当する CN のピークは検出されなかった。

4. 大麻油中の CN の定量法の検討

① GC 条件 当所で通常使用しているパックドカラム SE-30 を使用して大麻油中の CN を分析したが、CBN のピーク近くに未知ピークが出現することから、キャピラリーカラムについて検討することにした。既に、キャピラリーGC 法による CN の検討は HP-1 カラム (長さ 12 m) で実施しているが、⁹⁾ 今回は多少の油脂成分を含むためカラムの長さを 25 m とし、また、昇温方法も油脂成分が溶出し終わるまでとしたため、分析時間が 35 分と長くなった。

② 試料量の検討 試料 1, 2 及び 3 g をとり、実験方法 3. に従い油脂成分の除去を行った。油脂除去

率は試料 1, 2 及び 3 g で 91, 92 及び 93% であった。いずれも、大豆油の油脂除去率よりやや低かった。これは大麻油が大豆油に比べて十分精製されていないことや油脂組成が多少異なることが考えられた。しかし、試料が多くなるにつれてエマルジョンが形成され、水層と有機層との分離時間が長くなってきた。このため、抽出時間を考慮すると試料量は 1 g とした。

③ CN の定量 キャピラリーGC のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。保持時間 8.55 分のピークが CBD に相当する。同一試料を 3 回測定した結果を Table II に示した。CBD の平均濃度 $121 \pm 17 \mu\text{g/g}$ であった。実験方法 1. より大麻油 1 g は種子 4.7 g に相当することから、種子中の濃度に換算すると $26 \pm 4 \mu\text{g/g}$ となる。Matsunaga らは⁹⁾ 小鳥のエサ (麻の実) から THC ; $18 \pm 4 \mu\text{g/g}$, CBN ; $14 \pm 3 \mu\text{g/g}$ を検出している。CBN は THC の酸化生成物とし

TABLE II. CBD Contents in Cannabis Oil and Seeds

Samle No.	Cannabis Oil $\mu\text{g/g}$	Cannabis Seed ^{a)} $\mu\text{g/g}$
1	105	22
2	121	26
3	138	29
Mean $\pm$ S. E.	121 ± 17	26 ± 4

a) The calculation method was given in Materials and Methods.

Fig. 2. Gas Chromatogram of Cannabis Oil

I.S.; internal standard.

て考え合わせると、種子採取直後の THC 含量はおよそ 30 $\mu\text{g/g}$ 前後と推定され、大麻油中の CBD 含量の結果とほぼ同程度の値を示した。今後は大麻油中の CN の経年変化等を測定することにより、大麻油製造直後の濃度を推定し、CN の消長を検討したい。

なお、今回使用した大麻油は、CBDA 種アサの種

子を原料にして製造し、搾油後、約 8 年経過しているため、主成分の CBD 以外の微量 CN は検出できなかった。

謝辞 本研究を行うにあたり貴重な大麻油試料を供与されました宇都宮大学教育学部見目明継教授に深謝致します。

引用文献

- 1) T. Matsunaga, H. Nagatomo, I. Yamamoto, H. Yoshimura, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **36**, 545 (1990).
- 2) 山本 健, 小林暁弘, 斉藤圭子, 高山尚志, 長門克明, 中村 修, 野中英夫, 石塚忠男, “昭和 58 年度自主研究講座研究報告書 (栃木県特産あさの振興について),” 栃木県自治研修所編, p.1.
- 3) 大野昌子, 島峰望彦, 高橋一徳, 衛生試験所報告, **90**, 1 (1972).
- 4) 松永民秀, 永友英雄, 山本郁男, 吉村英敏, 法中毒, **8**, 88 (1990).
- 5) 世取山守, 鈴木秀夫, 衛生化学, **34**, 237 (1988).
- 6) “衛生試験法注解,” 日本薬学会編, 南山堂, 東京, 1990, p.621.
- 7) 世取山守, 衛生化学, **26**, 50 (1980).
- 8) 世取山守, 八島里美, 大森亮一, 谷田部秀夫, 鈴木秀夫, 第 27 回栃木県公衆衛生学会, 宇都宮, 1989 年 9 月, p.43.