薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (6) 611-614 (1980)

アサの品種改良に関する研究 高速液体クロマトグラフィー によるカンナビノイドの検討

世取山守, 伊藤 功,^{1a)} 高島大典,^{1b)} 正山征洋, 西岡五夫^{1c)}
栃木県衛生研究所,^{1a)} 栃木県農業試験場鹿沼分場,^{1b)} 九州大学薬学部^{1c)}

Plant Breeding of Cannabis. Determination of Cannabinoids by High-Pressure Liquid Chromatography

MAMORU YOTORIYAMA, ISAO ITO,^{1a)} DAISHUKE TAKASHIMA,^{1b)}
YUKIHIRO SHOYAMA and ITSUO NISHIOKA^{1c)}

Tochigi Prefectural Institute of Public Health,^{1a)} Tochigi Agricultural Experiment Station,
Kanuma Branch^{1b)} and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University^{1c)}

(Received December 24, 1979)

Cannabinoids (CN) of CBDA stock, Tochishi No. 1 stock and crossed stock were determined on a high-pressure liquid chromatograph equipped with a LiChrosorb RP-18 column (25 cm × 4 mm) by elution with a mixture of methanol and 0.02 N sulphuric acid (4: 1).

The CBDA stock was found to contain cannabidiolic acid (CBDA) and cannabichromenic acid (CBCA). Tochishi No. 1 stock was detected to have tetrahydrocannabinolic acid (THCA), CBCA and a small amount of CBDA. F₁ was obtained by crossing CBDA stock (female) and Tochishi No. 1 stock (male). All 79 F₁ specimens were found to contain CBDA, THCA and CBCA. Therefore F₁ was designated the median type. F₂ was then obtained by crossing F₁ and out of 199 F₂ specimens, 58, 40 and 101 stocks were designated as CBDA stock type, Tochishi No. 1 stock type and the median type by CN analysis, respectively. F₃ was also gained by crossing CBDA stock type of F₂ and all 166 F₃ specimens were CBDA stock type. F₄, which was obtained by crossing F₃, was also CBDA stock type.

In addition, the fibers of F₄ were found to be better than those of the original CBDA stock, and F₄ contained a negligible amount of THCA.

Keywords—cannabis; CBDA stock; Tochishi No. 1 stock; crossing; F₁; F₂; F₃; F₄; high-pressure liquid chromatography

1971 年より幻覚成分・tetrahydrocannabinolic acid (THCA)²⁾ をほとんど含まない CBDA 種と称される アサ³⁾ の試験栽培が行なわれ, 成分チェック試験とともに, 繊維作物としての品種改良が進められている。⁴⁾ しかしながら CBDA 種は繊維作物としての品質が在来種のアサ (THCA 種) に比べて, やや劣り, かつ採取などになお難点が残されており, 実用栽培にまでは至っていない。著者らは先に CBDA 種と在来種のアサとを交配し, その雑種 F₂ の中から, cannabidiolic acid (CBDA) を主カンナビノイドとし, THCA 含量の極めて少ないアサの育成について報告した。⁵⁾

今回, アサの形態学および成分の両面から雑種 F₄ までの交配実験を行なった結果, THCA 含量が極めて微量で, しかも在来種の形状を備えた, 繊維用作物に適した系統を育成することに成功した。この新しい系統の育成にあたり, カンナビノイドの検定にガスクロマトグラフィー (GC) と薄層クロマトグラフィー (TLC) を用い,

1) Location: a) 4-9-7, Yonan, Utsunomiya, Tochigi; b) 388, Iso-machi, Kanuma, Tochigi; c) 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka.

2) T. Yamauchi, Y. Shoyama, H. Aramaki, T. Azuma, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1075 (1967).

3) 西岡五夫, 第 11 回植物化学シンポジウム要旨集, 名古屋, 1975 年, p. 11.

4) 高島大典, 農業および園芸, **50**, 214 (1975).

5) 世取山守, 沼尾公道, 衛生化学, **25**, 166 (1979).

一部の検定に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を応用した。HPLC による大麻の分析報告例はあるが⁶⁾ アサの品種改良に HPLC を用いることにより、試料中のカンナビノイドの検出が極めて正確に、かつ迅速になされた。また、今回検討した試料は新鮮なアサのため、中性カンナビノイド (NC) は検出されず、アサの生植物中にはカンナビノイドはすべてフェノールカルボン酸の形・カンナビノイド酸 (CA) として存在することを再確認したので合せて報告する。

実験の部

交配 当農業試験場の温室内で、日照時間の調節を行ない、CBDA 種の雌株と栃試 1 号種 (THCA 種、最も優れた繊維作物のアサ) の雄株とを交配して F_1 を、次に $F_1 \times F_1$ により F_2 を、同様にして F_3 , F_4 を得た。

試料 F_1 — F_4 の葉の採取年月日 F_1 —1979 年 2 月 1 日,⁷⁾ F_2 —1978 年 6 月 5 日, F_3 —1978 年 10 月 12 日, F_4 —1979 年 7 月 24 日, CBDA 種, 栃試 1 号種—1979 年 7 月 24 日。

試験溶液の調製 GC および TLC の試験溶液は前報⁵⁾ と同様にして調製した。HPLC の試験溶液は前報と同様にして得た試験溶液の溶媒を留去し、残留物に少量のメタノールを加えその上澄液を試験溶液とした。

GC および TLC の条件 前報⁵⁾ に同じ。

HPLC の条件 装置: HITACHI 635 A 型, カラム: メルク社製の LiChrosorb RP-18 (10 μ m) を平衡スラリー法で 4.0 mm $\times$ 25 cm のステンレスカラムに充てんした。検出器: UV モニター (波長 254 nm), 移動相: メタノール: 0.02 N 硫酸 (4: 1), 流量 3.0 ml/min, カラム温度: 室温。

結果と考察

CBDA 種および栃試 1 号種のカンナビノイドの高速液体クロマトグラムの一例を Fig. 1 に示す。CBDA 種では CBDA が主カンナビノイドであり、他に通常の GC では CBD (A) と分離できない cannabichromenic acid (CBCA)⁸⁾ が明確に分離され、また極微量の THCA が検出された。なお CBCA は UV モニターのため、他のカンナビノイドより約 5 倍の感度で検出される。栃試 1 号種では THCA が主カンナビノイドであり、他

Fig. 1. High-Pressure Liquid Chromatograms of CBDA Stock and Tochishi No. 1 Stock (THCA Stock)

A: CBDA Stock, B: Tochishi No. 1 Stock (THCA Stock).

- 6) J.A. Schmit, R.A. Henry, R.C. Williams, J.F. Diekmann, *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 71 (1971); B.B. Wheals, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **13**, 164 (1976); R.N. Smith, *J. Chromatogr.*, **115**, 101 (1975); B.B. Wheals, *ibid.*, **122**, 85 (1976).
- 7) F_1 の成分確認をしないで、 F_2 を育成したため、 F_3 を得たのち、成分の再確認のため再度交配して F_1 の成分をチェックした。
- 8) Y. Shoyama, T. Fujita, T. Yamauchi, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1175 (1968).

に CBCA および微量の CBDA, cannabinolic acid (CBNA)⁹⁾ が検出された. CBNA は本来, 新鮮なアサの成分ではなく, 貯蔵中に THCA から脱水素して生成したものである. また長期間保存したアサ葉では tetrahydrocannabinol (THC), cannabinichromen (CBC) および cannabinol (CBN) が検出されるが,¹⁰⁾ 今回実験に用いた新鮮なアサ葉では NC は検出されず, すべてが CA であった.

79 株の F₁ のガスクロマトグラムは前報の中間型⁵⁾ と一致していた. その標準的 F₁ の高速液体クロマトグラムを Fig. 2 に示す. 主カンナビノイドが CBDA と THCA であり, 他に CBCA が検出された.

つぎに 199 株の F₂ について, ガスクロマトグラムによりそれらを分類すると,⁵⁾ CBDA 種型 (A) が 58 株, 栃試 1 号種型 (B) が 40 株および両種の中間型 (C と D, 前報⁵⁾ の分類による中間型 I と中間型 II を含む) が 101 株であった. 各型の高速液体クロマトグラムを Fig. 3 に示す. 図中の B, C および D では CBNA が検出された. これはエキスを -20° の冷凍庫に長時間保存したため, THCA より脱水素して生成したものと考えられる. 図中の A は CBDA 種型であり, CBDA 種の高速液体クロマトグラムと一致していた. B は栃試 1 号種型であるが, CBDA のピークも微量ながら検出された. C と D はガスクロマトグラムでは差があるが, 高速液体クロマトグラムでは差はあまり認められない.

F₂ を形態学的に観察すると, CBDA 種型は繊維作物として栽培されているアサと外部形態が一致する. したがって, この型・F₂ (A) は THCA 含量が極めて少なく, しかも繊維用に適した系統のアサと考えられる. そこでこの CBDA 種型 F₂ 間の F₃ の 166 株について GC および TLC で分析したところ, そのカンナビノイドパターンはすべてが CBDA 種型で, しかも繊維用に適した形状を備えていた. F₃ の高速液体クロマトグラムは CBDA 種と同様のパターンであった.

F₄ の高速液体クロマトグラムは CBDA 種とまったく同様のカンナビノイドパターンを示している. また F₄ の外部形態は栃試 1 号種のそれを備えており, カンナビノイドおよび外部形態もほぼ固定され, 繊維用に適した系統と考えられる.

現在まで試験栽培されてきた CBDA 種 (通称名: 無毒大麻) は繊維作物として在来種 (栃試 1 号種または南押原 1 号種)

より劣るため, 実用化までには至っていない. しかし今回著者らが CBDA 種と栃試 1 号種の交配により育成した新しい系統のアサは THCA の含量が極めて微量であり, しかも栃試 1 号種の形状を備え, 繊維作物として優れた系統のアサである. 本系統については現在, 収量および品質等を検討中で,¹¹⁾ 今後普及される新しいアサの系統と考えられる.

Fig. 2. High-Pressure Liquid Chromatogram of F₁

9) Y. Shoyama, T. Yamauchi, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1327 (1970).

10) 世取山守, 昭和 53 年度栃木県麻薬取締費による研究報告書, 1979 年 2 月.

11) 無毒大麻品質検討会, 栃木県農業試験場鹿沼分場, 1979 年 9 月.

Fig. 3. High-Pressure Liquid Chromatograms of F_2

A: CBDA stock type B: Tochishi No. 1 Stock type
C: the median type I D: the median type II

謝辞 御校閲をいただいた自治医大衛生学教室 野見山一生 教授に深謝します。本研究は昭和 53 年度 文部省科学研究費および栃木県麻薬取締費によるものである。