

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業:H-29-医薬-指定-009)
分 担 研 究 報 告 書

分担研究課題:危険ドラッグ等の濫用防止のより効果的な普及啓発に関する研究
大麻草の成分分析, 海外の規制情報の把握
研究分担者: 花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

— 大麻の識別のための分析手法(文献情報) —

研究協力者: 田中理恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:大麻草(*Cannabis sativa* L.)の成分について文献調査を行なった. 情報検索ツールとして SciFinder を主に用い, PubMed および Google Scholar も併用して検索を行なった. 検索語として, *Cannabis sativa*, component, constituent 等を用いた. また必要に応じ化合物検索も行なった. SciFinder による検索の結果, 「*Cannabis sativa*」で 9722 件がヒットした. このうちカテゴリー「Analytical chemistry」で 7490 件, このうち「Analysis」で 189 件がヒットした. その結果をもとに大麻の化学分析による識別法について文献調査を行なった. その結果大麻の分析には GC-FID および GC-MS, HPLC, UPLC, LC-MS がよく使われていることがわかった. また大麻草は混合物なので, 質量分析や PDA などの検出器と組み合わされた GC や LC などのクロマトグラフィー分離法が多く用いられていると考えられる. 大麻草について最近でも様々な研究がされており, また新たな分析法も開発され大麻草の分析に適用されている. よって今後も引き続き調査していく必要があると考えられる.

A. 研究目的

大麻は大麻草(*Cannabis sativa* L.)及びその製品のことをいう. 大麻草はアサ科(*Cannabaceae*)の雌雄異株の一年生草本であり, 西アジア〜エジプト原産と言われている. 紀元前より人類に利用されており, 大麻草の茎よりとれる繊維は衣服などに, 種子は麻の実, ヘンプシードオイルとして食用に, また生薬の麻子仁としても利用される. また大麻草は繁殖力が非常に強いという特徴もある[1-8].

大麻草にはカンナビノイドと総称される炭素, 水素, 酸素のみからなる固有の化合物群が含まれている(Fig.1). Turner らは 1980 年に大麻草に

423 種の化合物が含まれ, そのうち 61 種がカンナビノイドであると報告している[9]. Elsohly らは 2005 年に 493 種の化合物, うち 70 種がカンナビノイドであると報告し, さらに 2017 年に Elsohly らは 565 種の化合物, うち 120 種がカンナビノイドと報告している[10-11]. カンナビノイドの中には幻覚作用などの中枢作用を持つ化合物があり, そのため大麻草は古くから乱用されてきた. カンナビノイドのうち Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)が最も中枢作用が強く大麻草の活性本体である. Δ^9 -THC は生の植物体中ではフェノールカルボン酸体である Tetrahydrocannabinolic acid (THCA)の状態 で存在する. THCA 自体は活性を持たない

が、収穫後や保存中の乾燥や、光や熱にさらされることによって脱炭酸がおこり活性体である Δ^9 -THC へと変化する (Fig.1) [1]. 大麻草は chemotype として主カンナビノイドが THCA, Δ^9 -THC である drug-type, 主カンナビノイドが Cannabidiolic acid (CBDA), Cannabidiol (CBD) である fiber-type, 中間型 intermediate-type に分けられる. また、大麻草にはカンナビノイド以外の成分として、二次代謝物ではテルペノイド、フラボノイド、リグナン、アルカロイド等が、一次代謝物ではアミノ酸、脂肪酸、糖、炭化水素等が含まれている.

我が国における大麻の鑑定において、植物体の顕微鏡試験いわゆる検鏡が行われる. これは生薬学的 手法であり、顕微鏡を用いて大麻草の植物形態上の特徴を観察し、葉や苞葉に存在する剛毛の有無を確認する. その他に大麻草に含有される成分を分析する化学反応として呈色試験がある. その他に大麻に含有されるカンナビノイドの含量を調べるのが重要となる. このカンナビノイドの定量には主に機器分析が用いられる. カンナビノイドの分析手法について、これまでにいくつかの総説中で報告されている[12-13]. また UNODC も Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. (2009)でまとめている[8]. それらによると、大麻草及び大麻草由来製品のカンナビノイドの成分について、gas chromatography flame ionization detection (GC-FID), gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), ultra pressure liquid chromatography (UPLC), thin layer chromatography (TLC), high performance thin layer chromatography (HPTLC), nuclear magnetic resonance (NMR), fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), near infrared spectroscopy (NIR), coherent anti-Stokes Raman

scattering spectroscopy (CARS), などによって分析されている. また大麻草中に含まれるカンナビノイドのうち drug-type の主カンナビノイドである THCA, Δ^9 -THC, fiber-type の主カンナビノイドである CBDA, CBD の他に、Cannabinol (CBN), Cannabigerolic acid (CBGA), Cannabigerol (CBG), Cannabichromene (CBC), Δ^8 -Tetrahydrocannabidiol (Δ^8 -THC), Cannabidivarin (CBDV), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabigerolic acid monomethyl ether (CBGAM) (Fig.1)の分析についてこれまでによく報告されている.

今回、文献検索を行ない大麻草および大麻草由来製品に含有されるカンナビノイドの分析手法について調べたので以下に述べる.

B. 研究方法

大麻草 (*Cannabis sativa* L.)の成分について文献調査を行なった. 情報検索ツールとして SciFinder を主に用い、PubMed および Google Scholar も併用して検索を行なった. 検索語として、Cannabis sativa, component, constituent 等を用いた.

C. 研究結果

SciFinder による検索の結果、「Cannabis sativa」で 9722 件がヒットした. このうち「component」で and 検索をかけた結果 1008 件、「constituent」で and 検索をかけた結果 641 件がヒットし、さらに「cannabinoid」で and 検索をかけるとそれぞれ 367 件、388 件がヒットした. このうち文献検索において、REFERENCES のカテゴリー「Analytical Chemistry」のうち「Analysis」で検索した結果 189 件の index terms がヒットした. このうち 3 件以上ヒットした index terms について Table 1 にまとめた (2019 年 10 月時点). これらの検索結果をもとに、大麻草および大麻草由来製品に含有されるカンナビノイドの分析手法について、以下に述べる.

1. GC-FID, GC-MS

GC-FID と GC-MS は大麻草およびその製品の分析において最も一般的で最も確立されている手法である。Table 1 では”Gas chromatography”で 120 件, ”Gas chromatography-mass spectrometry”で 26 件と多くの報告がされている。GC は移動相に気体を使用する。気体は液体よりも分子密度がはるかに低く、試料物質のカラム内での拡散速度が速くて試料物質の分配平衡が速やかに達成されるので流速を大きく設定できるとともに高いカラム効率を得ることができる。試料中の各成分が気化する必要があり試料注入部およびカラムは高温となっている。GC による分析では迅速かつ感度よく総カンナビノイド量を求めることができる。総カンナビノイド含量を測定する場合は GC での誘導体化は必要ではない。しかしカンナビノイドのフェノールカルボン酸体の分析にはトリメチルシリルエーテルなどによる誘導体化が必要である。GC-MS は大麻草のプロファイルや特徴、いわゆる“化学フィンガープリント”を作るのによく用いられる。Bertol は 114 サンプルの大麻草を drug-type と fiber-type それぞれの adult と young で分類し、GC-FID によって茎を除いた部位の CBD, Δ^9 -THC, CBN の含量を調べた結果を報告している[14]。

2. HPLC, UPLC, LC-MS

HPLC は医薬品や食品、生体成分などの分析等に広く用いられている分析手法である。Table 1 より index terms が”Liquid chromatography”で 46 件, ”HPLC”で 83 件, ”Reversed-phase HPLC”で 12 件, ”Liquid chromatography-tandem mass spectrometry”で 11 件, ”HPLC-tandem mass spectrometry”で 6 件, ”Ultra-performance liquid chromatography”で 5 件, ”High-performance liquid chromatography-mass spectrometry”で 3 件報告されている。HPLC の移動相は液体のため、移動相の溶媒に溶解する物質であれば GC のよ

うに試料を気化させる必要はない。よって GC 分析では熱で変性する化合物もそのままの形で検出することができる。つまり HPLC は誘導体化なしでフェノールカルボン酸体と脱炭酸体したカンナビノイドの中性物質を同時に定量することができる。

UPLC は法中毒分野で広く使われている。UPLC は充填剤の球径が 2μ 以下のカラムを用いることで感度と分解能が向上し、分析時間が短縮できる。UPLC によるカンナビノイドの定量と、血液、尿、唾液などの生体試料中のカンナビノイド代謝物の定量が報告されている。HPLC, UPLC, LC-MS による分析のデメリットとして、一回の分析で大麻草に含まれるすべてのカンナビノイドを分けて検出するのは難しいことが挙げられる。Aizpurua-Olaizola らは drug-type, fiber-type, intermediate-type の葉と花について、7 種のカンナビノイド、CBD, CBDA, Δ^9 -THC, THCA, CBC, CBGA, CBN の含量を HPLC によって調べた結果を報告している[15]。

3. TLC, HPTLC

Table 1 より”TLC (thin layer chromatography)”で 33 件報告されている。TLC はガラス板等にシリカゲル、アルミナ、ポリアミド樹脂などを薄く張ったものを用いて、混合物を分離する方法である。この方法は古くから行われている手法で、視覚的に分離を確認することが可能である。よって、天然物や未知の物質の分離、多種類の物質の同時分析、また有機合成において反応の進行状況の確認やカラムの分離条件の検討に用いられる。

大麻草中のカンナビノイドのプロファイルには順相、逆相の TLC プレートが使われ、一次元及び二次元の TLC 分析が行われる。発色試薬として Fast blue salt B 等が用いられている。我が国の大麻の鑑定における TLC 分析では、メタノール抽出物について、シリカゲルプレートを用いて行われている。TLC はシンプルでコストが安い分析手法であるが、外的要因を受けやすいため再現性

が取りにくく定量分析には向かないとされることが多い。そこで粒径の小さく、粒度分布の狭い高分解能のプレートである HPTLC (高性能薄層クロマトグラフィー) が用いられる。HPTLC プレートは、従来の TLC プレートと比較して 5-10 倍の高感度で高い分離力と再現性を有し、シャープなバンドが得られるため定量分析が可能である。Fischedick らは大麻中の THC の定量に HPTLC が再現性があり正確であると報告している[16]。

4. NMR

Table 1 より”NMR spectroscopy”で 12 件報告されている。NMR はこれまで主にカンナビノイドをはじめとする大麻草中に含まれる化合物の構造決定に使われている。最近でも NMR により新規カンナビノイドの構造決定が報告されている[17-18]。近年それに加えて Hazekamp らにより ^1H -NMR を用いた大麻草中のカンナビノイドの定量法が報告されている[19]。GC や LC はクロロフィルや脂質などの不純物にも敏感であり、LC-PDA では UV 吸収がないものは検出できないというデメリットがある。さらにこれらのクロマト法では検量線作成のため対象とする化合物の標準品が必要である。 ^1H -NMR では、シグナル強度比は分子中の個々のプロトン数に比例するとともに、一プロトン当たりのシグナル強度は、同じモル濃度であれば化合物の種類によらず一定であることが知られている。従って濃度が既知の物質と濃度未知の試料の ^1H -NMR を同時に測定することによってそのシグナル強度比から未知試料の定量が可能になる。標準品が入手困難な場合、もしくは標準品自体がその時点で存在しない場合に標準品なしで正確な定量が可能である qNMR 法は、大麻中の成分の分析においても非常に有効な手法だといえる。しかしながら他の分析機器と比較すると装置自体が非常に高価であり、MS などと比較すると感度が高くないというデメリットもある。

5. その他

Table 1 より, “Raman spectroscopy”が 3 件, “IR spectroscopy” が 9 件, “Fourier-transform IR spectroscopy” が 8 件, “UV-visible spectroscopy” が 8 件, “Near-IR spectroscopy”が 6 件, “DART mass spectrometry” が 2 件, “Size exclusion chromatography”が 3 件など報告されている。このうち Ebersbach らは顕微分光法であるコヒーレント反ストークスラマン散乱 (CARS: Coherent anti-Stokes Raman scattering) による大麻草の毛状突起(腺毛)中の THCA, CBDA の分析を報告している[20]。また, リアルタイム質量分析 (DART mass spectrometry: Direct Analysis in Real Time mass spectrometry) は大気圧下で非接触に試料をイオン化できる方法のためサンプル調製やクロマトグラフィー分離なしで大麻の直接分析が可能である。Dong らは大麻草の品種の分類のスクリーニングツールとして DART を用いて検討した結果を報告している[21]。

D. 考察

大麻草および大麻草由来製品に含有されるカンナビノイドの分析手法について文献調査した結果, GC-FID および GC-MS, HPLC, UPLC, LC-MS がよく使われていることがわかった。大麻草は混合物なので, 質量分析や PDA などの検出器と組み合わせられた GC や LC などのクロマトグラフィー分離法が多く用いられていると考えられる。また近年でも大麻中の成分の分析において, 様々な分析手法が報告されている[11-13, 19-21]。

E. 結論

以上, 大麻草の成分について文献調査を行ない, 大麻草および大麻草由来製品に含有されるカンナビノイドの分析手法についてまとめた。大麻草について最近でも様々な研究がなされている。また今後の科学技術の進歩や研究の進展により, 新規の分析機器や分析手法が開発されることが

予測される。よって、今後も引き続き調査していく必要があると考えられる。

F. 参考文献

- 1) 山本郁男, 大麻の文化と科学 ―この乱用薬物を考える―, 廣川書店, 東京(2001)
- 2) 厚生省 依存性薬物情報研究班編, 依存性薬物情報シリーズ No.1 大麻, (1987)
- 3) 厚生労働省, 「大麻取扱者免許申請に関するパンフレット」, 東京(2016)
- 4) Handbook of Cannabis, Pertwee, R. ed., Oxford(2014)
- 5) 厚生労働省, 大麻・けしの見分け方, 東京(2016)
- 6) 船山信次, ファルマシア, 52(9), 827-831(2016)
- 7) 森元聡, ファルマシア, 52(9), 832-836(2016)
- 8) United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. (2009)
- 9) Turner, C. E., ElSohly, M. A., Boeren, E. G., J. Nat. Prod, 43, 169-234 (1980)
- 10) ElSohly, M. A., Slade D., Life Sciences, 78, 539-548 (2005)
- 11) ElSohly, M., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., Galal A., Progress in the chemistry of organic natural products Series, Phytocannabinoids. pp.1-36 (2017)
- 12) Shah, I., Al-Dabbagh, B., Salem, A. E., Hamid, S. A. A., Muhammad, N., Naughton, D. P., BMC Chem., 13:106, (2019)
<https://doi.org/10.1186/s13065-019-0627-2>
- 13) Declan P. Naughton M. A., Progress in the chemistry of organic natural products., 1-36 (2017)

- 14) Radwan, M. M. et al. Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology, pp 161-182 (2017)
- 15) E. Bertol, Bulletin on Narcotics, 32, 55-60 (1980)
- 16) Aizpurua-Olaizola, Oier Journal of Natural Products (2016), 79(2), 324-331, 79(2), 324-331 (2016)
- 17) Fishedick, J. T., Glas, R., Hazekamp, A., Verpoorte, R., Phytochem. Anal., 20, 421-426 (2009)
- 18) Ahmed, S. A., Phytochemistry, 117, 194-199 (2015)
- 19) Radwan, M. M., ElSohly, M. A., El-Alfy, A.T., Ahmed, S. A., Slade, D., Husni, A.S., Manly, S. P., Wilson, L., Seale, S., Cutler, S. J., Ross, S. A., J. Nat. Prod., 78, 1271-1276 (2015)
- 20) Hazekamp, A., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Chem. Pharm. Bull., 52(6), 718-721 (2004)
- 21) Ebersbach, P., Stehle, F., Kayser, O., Freier, E., BMC Plant Biol., 18, 275 (2018)
- 22) Dong, W., Liang, J., Barnett, I., Kline, P. C., Altman, E., Zhang, M., Anal. Bioanal. Chem., 411, 8133-8142 (2019)

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

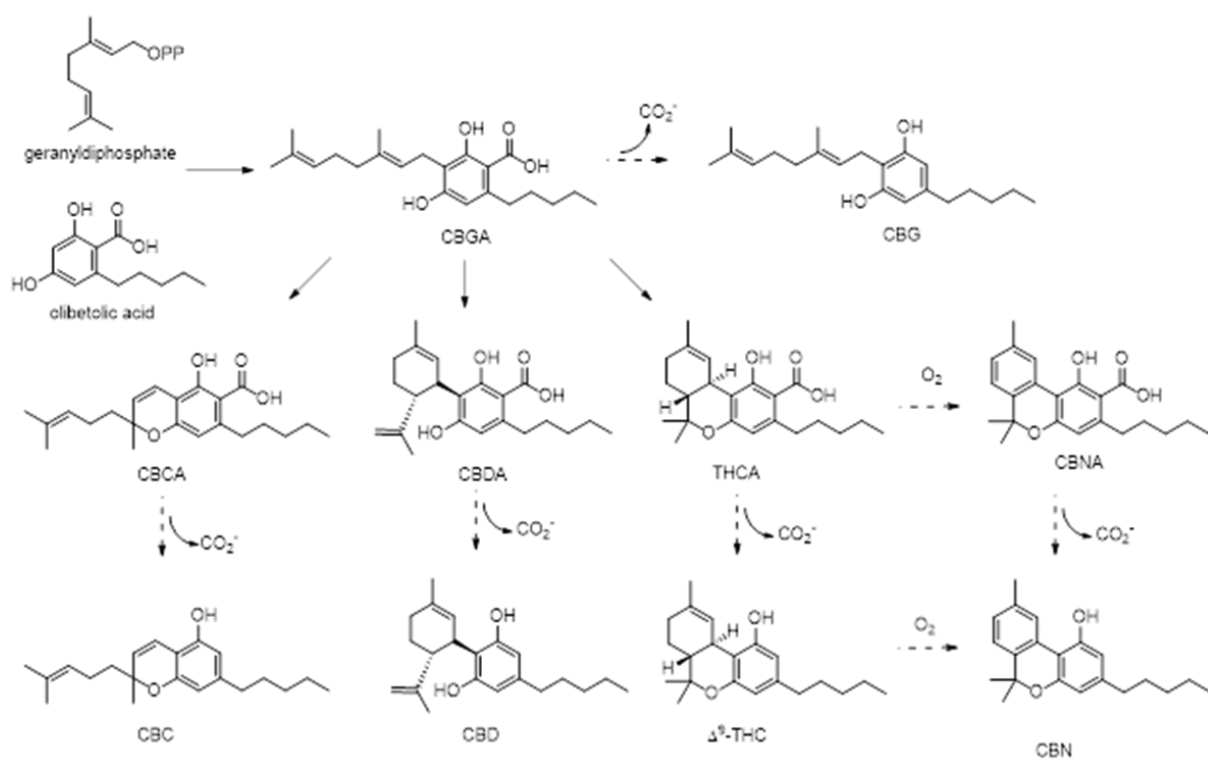


Fig. 1 Biosynthesis of cannabinoids

Table 1 The result of reference search by SciFinder

Ranking	index terms	No.	Rank	index terms	No.
1	Forensic analysis	176	23	Sample preparation	6
2	Urine analysis	134	23	Spectroscopy	6
3	Gas chromatography	120	23	Statistical analysis	6
4	Mass spectrometry	98	24	Analysis	5
5	HPLC	83	24	Bioassay	5
6	Immunoassay	59	24	Bioinformatics	5
7	Blood analysis	53	24	Chemical ionization mass spectrometry	5
8	Pharmaceutical analysis	52	24	DNA sequence analysis	5
9	Liquid chromatography	46	24	Environmental analysis	5
10	Food analysis	42	24	Liquid chromatography-mass spectrometry	5
11	Forensic pharmaceutical analysis	39	24	Next-generation DNA sequence analysis	5
12	Biomarkers	34	24	RNA sequence analysis	5
12	Plant analysis	34	24	Two-dimensional gel electrophoresis	5
13	TLC (thin layer chromatography)	33	24	Ultra-performance liquid chromatography	5
14	Gas chromatography-mass spectrometry	26	25	Electrophoresis	4
15	Chromatography	21	25	Electrospray ionization mass spectrometry	4
16	Principal component analysis	16	25	Electrospray ionization tandem mass spectrometry	4
17	NMR spectroscopy	12	25	High-resolution mass spectrometry	4
17	Radioimmunoassay	12	25	Liquid partition chromatography	4
17	Reversed-phase HPLC	12	25	Spectrophotometry	4
18	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	11	25	Supercritical fluid chromatography	4
19	Metabolomics	10	25	Thermogravimetric analysis	4
19	Proteomics	10	26	Atomic absorption spectroscopy	3
20	Enzyme immunoassay	9	26	Capillary gas chromatography	3
20	Enzyme-multiplied immunoassay technique	9	26	Clinical analysis	3
20	IR spectroscopy	9	26	Diagnostic biomarkers	3
20	Tandem mass spectrometry	9	26	Discriminant analysis	3
21	Capillary electrophoresis	8	26	Electron ionization mass spectrometry	3
21	Enzyme-linked immunosorbent assay	8	26	Environmental pollution monitoring	3
21	Fourier-transform IR spectroscopy	8	26	Feed analysis	3
21	UV-visible spectroscopy	8	26	Flame atomic absorption spectroscopy	3
22	Fluorescence immunoassay	7	26	Fluorescence-polarization immunoassay	3
22	Therapy monitoring	7	26	High-performance liquid chromatography-mass spectrometry	3
23	Air analysis	6	26	Immunohistochemistry	3
23	Centrifugal countercurrent chromatography	6	26	Ion trap mass spectrometry	3
23	Cluster analysis	6	26	Molecular sequence annotation	3
23	Colorimetry	6	26	Named reagents and solutions	3
23	Fluorescence spectroscopy	6	26	Preparative chromatography	3
23	HPLC-tandem mass spectrometry	6	26	Protein sequence analysis	3
23	Ion mobility spectrometry	6	26	Raman spectroscopy	3
23	Multivariate analysis	6	26	Reagents	3
23	Near-IR spectroscopy	6	26	Reversed phase chromatography	3
23	Radiochemical analysis	6	26	Size exclusion chromatography	3
23	Response surface methodology	6	26	Transcriptomics	3