ノート

大麻樹脂中のカンナビノイドの薄層クロマトグラフィーによる分離

川　端　省　三，出　来　三　男*

Separation of Cannabinoids by Thin-Layer Chromatography

Shozo KAWABATA and Mitsuo DEKI*
*Central Customs Laboratory Ministry of Finance
531, Iwase, Matsudo-sh, Chiba-ken, 271 JAPAN

Separation of cannabinoids was investigated by thin－layer chromatography. Fast blue B salt was used as developping reagent. Toluene and benzene － hexane － diethylamine (25：5：1) were used as solvent system.

Separated and identified cannabinoids were as follows；△1－tetrahydrocannabinol (△1－THC), cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabivarin (THC－C3), cannabivarin (CBN－C3), cannabicyclol (CBCy) and cannabichromene (CBCh). Two－dimentional thin-layer chromatography (2D－TLC) showed good separation using above two solvent systems and proved useful for rapid and simultaneous screening of samples prior to other high technical analyses.

－Received April, 1988－

1　緒　　言

カンナビノイドは，大麻の特有成分であり，その確認は嫌疑物件の鑑定上極めて重要である。筆者らは先にカンナビノイドのガスクロマトグラフィー（GC），GC と直結した質量分析（GC－MS）及びシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおける溶出挙動について報告した[1]。

カンナビノイドには，△1－テトラヒドロカンナビノール（△1－THC），カンナビノール（CBN）及びカンナビジオール（CBD）の主要 3 成分の他，少量成分として，カンナビゲロール（CBG），カンナビシクロール（CBCy），カンナビクロメン（CBCh），更に，ベンゼン環のアルキル側鎖の炭素数が異なる同族体，ベンゼン環にカルボキシル基のついたカンナビノイド酸等がある。カンナビノイドの少量成分が明らかになり，多くの研究者により総合的にカンナビノイドの検討が加えられるようになったのは比較的新しい[11,12]。

薄層クロマトグラフィー（TLC）によるカンナビノイドの分離についても，1970 年以前は，少量成分が十分明らかでなかったため，△1－THC，CBN 及び CBD の相互分離に関する報告が主となっている[3－10]。その

*大蔵省税関中央分析所　271 千葉県松戸市岩瀬 531

後，Gaoni ら[11]及び Fowler ら[13]は7種類のカンナビノイドの TLC 分離について報告している。また，最近 Oroszlan ら[14]は，TLC の一種である OPLC (over-pressured layer chromatography) 法を用いて，3種のカンナビノイド酸を含む10種のカンナビノイドの分離について報告している。しかし，分離対象とされたカンナビノイドは報告者によって様々であり，筆者らは，今回の実験に用いた試料の TLC によって検出されたスポットを，これらの報告にもとずいて直ちに同定できないことを知った。

カンナビノイドの少量成分の解明は，GC，GC－MS 等の機器に負うところが大きいが，TLC は操作が簡単で目的物を容易に分取できる利点がある。また，TLC は，組成既知の試料と同時に分析を行うことによって，未知試料のスクリーニングを行うことができる。

ここでは，TLC によるカンナビノイドの分離条件を検討し，TLC におけるカンナビノイドの各成分を分離して再び TLC で分離し，カンナビノイドの少量成分についても同定を行ったので報告する。

2　実　　験

2．1　試料及び試薬

試料は，厚生省から研究用に譲り受けた大麻樹脂で，特有の臭気を有する緑褐色のやや固い不規則な板状物である。GC 及び GC－MS による試料中のカンナビノイドの分離及び確認については既に報告した[1]。

TLC プレートは Merck 社の Kieselgel 60 で厚さ 0.25mm，大きさ 20cm×20cm のものを用いた。

TLC における展開溶媒は，ジエチルアミンを除き，和光純薬社製の試薬特級を用いた。ジエチルアミンは和光純薬社製の試薬を蒸留し，無水硫酸ナトリウムで脱水したものを用いた。

Fast blue B salt (FBB or Tetrazotized o－dianisidine chloride) は Sigma 社製のものを用いた。

2．2　TLC

簿層プレートの下端 2cm の位置に試料をスポットし，通常の上昇法により溶媒を展開させ，溶媒が約 15cm 上昇したところで薄層プレートを展開槽から取り出して乾燥したあと，FBB の 1%水溶液を噴霧して発色させた。

2．3　試料の処理及びカンナビノイドの分取

大麻樹脂 1g を石油エーテルで抽出，ろ過したものを，シリカゲルカラムクロマトグラフィー[1]及びセファーデックス LH－20 固定層としたゲルクロマトフラフィー[2]で抽出物中のカンナビノイドを分画した。成分の分取は分画物を TLC プレート上に線状にスポットして展開後，帯状の分離層を掻き取ってアセトンで抽出し，減圧下でアセトンを除去した。

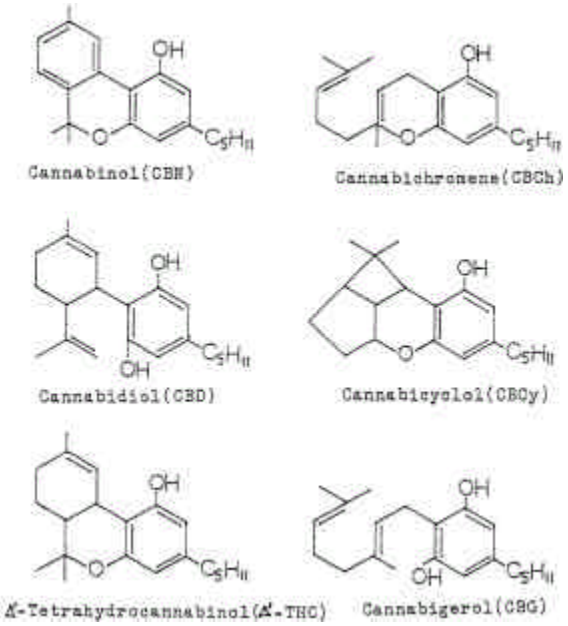

Fig. 1 Structural chemical formulae of cannabinoids

3　結果及び考察

3．1　発色剤

カンナビノイドの発色剤については，初期の研究者によって種々の検討が加えられた。

荒巻ら[15]は，FBB のほか，Diazotized benzidine, Diazotized sulfonic acid, Beam reagent 及び Duque－nois reagent を用いた場合の CBN, THC 及び CBD の呈色について報告している。また,Korte 及び Sieper[3]は，荒巻らの報告した試薬のほか，Gibbs reagent, Ghamrawy reagent, Blakie reagent, Diazotized p－nitroanilline 及び 2, 6－Dichloroquinonechlorimide による呈色を報告している。

FBB による発色は，カンナビノイドのフェノール

性水酸基とのカップリング反応を利用したものであるが，CBD はオレンジ色，CBN は紫色及び THC は赤紅色を呈し，呈色によってもこれらを判別することが可能であるため，最近の研究における発色には専ら FBB が用いられており[11−14]，今回の実験においても FBB の 0.1%水溶液を発色剤とした。なお，FBB は一般に希アルカリ溶液とするか，水溶液をスプレイしたあとアンモニア蒸気に曝すことが行われているが[10]，Sigma 社の FBB を用いた場合，水溶液をスプレイすると直ちに発色したので，アルカリ溶液又はアンモニア蒸気は用いなかった。

３．２　TLC

カンナビノイドの TLC 分離には，各種の展開溶媒が報告されている。

ジメチルホルムアミド含浸シリカゲルプレートを用い，シクロヘキサンを展開溶媒とする Korte 及び Sieper の方法[3, 9]は分離が良いが，含浸プレートを常に一定の状態とすることが難しく，含浸の程度でスポットがテーリングを起こしたり，移動距離（Rf）が少なかったりすることが指摘されている[5−8]。

荒巻ら[5]は，（A）メタノール−ヘキサン（1：15），（B）アセトン−ヘキサン（1：15），（C）酢酸エチル−ヘキサン（1：10），（D）クロロホルム−ヘキサン（1：2），（E）ベンゼン−ヘキサン（5：1））及び（F）ベンゼン−ヘキサン−ジエチルアミン（25：10：1）を展開溶媒として，CBD，CBN 及び△1−THC の相互分離を検討した結果，（F）が最も良いことを示した。また，Fowler ら[13]は，ジエチルアミンをスプレイした TLC プレートを用い，キシレン−ジオキサン（19：1）で展開したときのカンナビノイドの Rf を報告している。そのほか．ベンゼン，トルエン等の単一溶媒を用いた場合の報告も行われている[10, 14]。

ベンゼン−ヘキサン−ジエチルアミン（25：5：1）を展開溶媒とした場合の分離図を Photo 1 に示した。

この溶媒は，荒巻ら[5]の展開溶媒則ちベンゼン−ヘキサン−ジエチルアミン（25：10：1）を用いた場合，全体の移動距離が少ない（△1−THC で Rf＝約 0.3）ため，ヘキサンの割合を減らした。各カンナビノイドの相対的移動関係は，荒巻らの場合と同様である。各カンナビノイドの確認は，先に報告した GC 及び GC−MS の結果と対査して行った。△1−THC 及び CBCy は赤紅色，CBD 及び CBG は黄燈色，CBN 及び CBCh は紫色を呈している。なお，CBCh はスプレイ直後は紫色を示したが，徐々に赤褐色に変色した。

大麻樹脂の抽出物を直接分離した場合，Photo 1 に示したように，試料中の主要成分である△1−THC，CBN 及び THC−C3（テトラヒドロカンナビバリン）のスポットは比較的明瞭である。しかし，その他の少量成分である CBCy，CBD，CBCh 等については，他の主要成分と近接しているため明確でない。

Gaoni ら[11]は，TLC における展開溶媒として，石油エーテル−メチルエーテル（4：1）を用いているが，この条件で分離したところ，△1−THC と THC−C3 とがほぼ同じ Rf 値を示した。また，この条件では CBCh と CBG の分離も明確でなかった。

Oroszlan ら[14]は，キシレン，トルエン，ベンゼン，クロロホルム及びジクロルメタンの単一溶媒を用いた場合の分離状況を報告している。また，Chiesa ら[10]は，ベンゼンを展開溶媒とした場合の，CBD，CBN 及び△1−THC の Rf 値について報告している。これらの単一の溶媒を比較したところ，カンナビノイドの相対的な移動関係はあまり変らないが，トルエンを用いた場合が比較的良好であった。

トルエンによる分離図を Photo 2 に示した。△1−THC と CBN の Rf 値が Photo 1 と異なり逆転している。また，CBD と CBCy，CBG と CBCh の移動距離も逆転している。

なお，Oroszlan ら[14]は，CBCh は CBD の次に高い Rf 値を示すと報告している。一方，Fowler[13]は，CBCy については報告していないが，最も低い Rf 値のものを CBCh とし，Gaoni ら[11]も，CBCy の Rf 値も高く，CBCh は最も低い Rf 値を示すとしている。

CBCh は FBB により紫色を呈した後赤褐色に変化することが Fowler らによって示されており，Photo 1 で最も低い Rf 値のスポヅトが同様な色の変化を示すことから，これを CBCh と確認した。

３．３　２次元展開（2D−TLC）

Fowler ら[13]は，クロロホルム−1，1−ジクロルエタン（15：10）及びジエチルアミンをスプレイした TLC プレートを用い，キシレン−1，4−ジオキサン（19：1）で展開して場合のカンナビノイドの Rf

値を報告し，両者で 2 次元展開する方法を述べている。

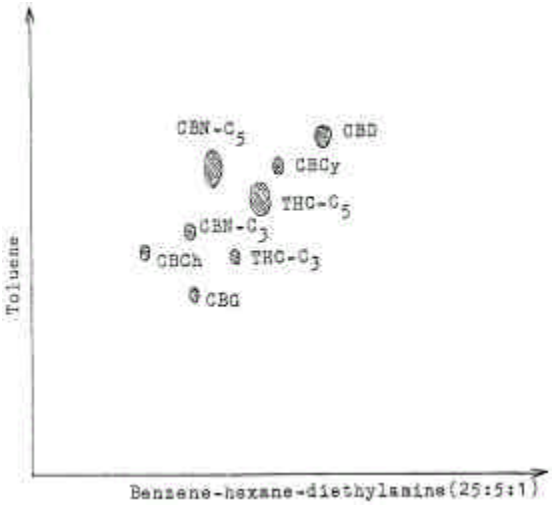

Fig. 2　Two-dimentional thin-layer chromatogram of cannabinoids m cannabis resin

トルエンで 1 次展開し，2 次展開をベンゼン－ヘキサン－ジエチルアミン（25：5：1）で行った場合の分離図を Fig. 2 に示した。2D－TLC により，1D－TLC では明確でなかったカンナビノイドのスポットが明瞭となり，各成分が容易に確認できる。この方法は，嫌疑物件のスクリーニングに有用であると考えられる。

3．4　カンナビノイドの単離

本実験に用いた大麻は，各種のカンナビノイドを含むため，TLC の分離層を掻き取って分取した場合，近接成分が混在してくることは避けられない。各成分を単離するには，カラムクロマトグラフィー[1, 2]を行ってカンナビノイドを粗分画したあと，異なった Rf 値を示す溶媒則ちベンゼン－ヘキサン－ジエチルアミン（25：5：1）で展開後，分取したスポットをトルエンを展開溶媒として再び分離してスポットを掻き取ることによって純粋な成分が得られた。Photo 1 及び Photo 2 で示した各カンナビノイドはこのようにして分取したものである。

要　約

薄層クロマトグラフィーによる大麻樹脂中のカンナビノイドの分離条件を検討した。発色にはファストブルーB（FBB）を用い，展開溶媒としてトルエン及びベンゼン－ヘキサン－ジエチルアミン（25：5：1）を用いた場合の△1－テトラヒドロカンナビノール（△1－THC），カンナビノール（CBN），カンナビジオール（CBD），テトラヒドロカンナビバリン（THC－C3），カンナビバリン（CBN－C3），カンナビシクロール（CBCy）及びカンナビクロメン（CBCh）の分離結果および呈色状況を示した。上記 2 種の展開溶媒では，カンナビノイドの相対的移動距離が異なっており，2 次元展開を行うことによって，各カンナビノイドが迅速に確認でき，嫌疑物件のスクリーニングに有用であることを示した。

文　献

1）出来三男：本誌，21，49（1980）；川端省三，杉本成子，熊沢勉：ibid，27，91（1987）
2）川端省三：未発表
3）F. Korte and H. Sieper：J. Chromatogr., 13，90（1964）
4）F. Korte and H. Sieper：ibid，14，178（1964）
5）H. Aramaki,N. Tomiyasu.H. Yoshimura and H. Tsukamoto：Chem.Pharm . Bull，16，822（1968）
6）朝比奈晴世，大野昌子，高橋一徳，大野幸雄：衛生試験所報告 85，123（1967）
7）大野幸雄：本誌，6，123（1968）
8）平野錞一：ibid，8，65（1969）
9）H. V. Street：J. Chromatogr., 48，291（1970）
10）E. P. Chiesa, R. V. D. Rondina and J. D. Cousio：ibid，87，298（1973）

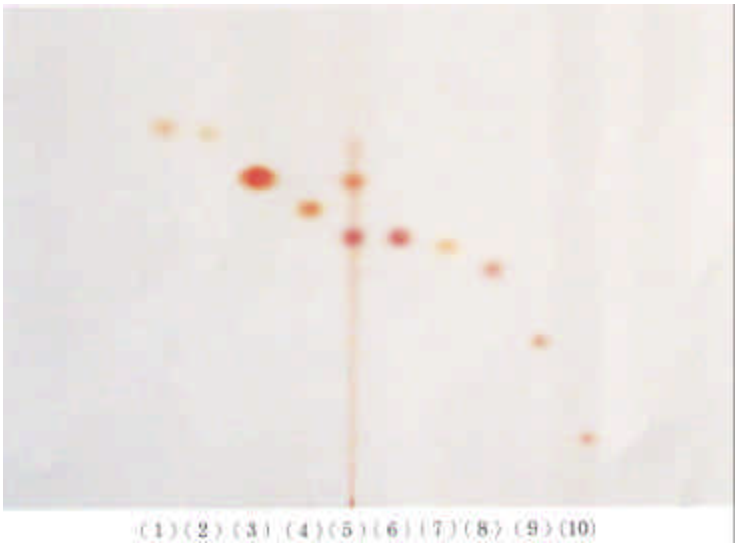

Photo 1　Thin-layer chromatogram of cannablnoids
Solvent system；benzene-hexane-diethylamine (25：5：1)。

(1)CBCy，(2)CBD，(3)△1-THC，(4)THC-C3，(5)extract of cannabis，(6)CBN，(7)CBG，(8)CBN-C3，(9)CBCh and (10)unidentified.

Photo 2　Thin-layer chromatogram of cannabinoids
Solvent system; toluene. Numbers refer Photo 1.

11）Y. Gaoni and R. Mechoulam：J. Am. Chem. Soc., 93，217（1971）
12）T. B. Vree, D. D. Breimer, C. A. M. van Ginneken and J. M. van Rossum：J. Chromatogr., 74, 209 (1972)
13）R. Fowler, R, A, Gilhooley and P. B. Baker：ibid，171，509（1979）
14）P. Oroszlan, G, Vergar－Petrl, E. Mincsovics and T. Szekely：ibid，388，217（1987）