

報 文

カンナビノイドのダンシル誘導体の高速液体 クロマトグラフィーによる分離及び蛍光検出

川 端 省 三*

Fluorometric Detection of Cannabinoids with Pre-column Dansyl
Derivatization and High Performance Liquid Chromatography

Shozo KAWABATA*

Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531, Iwase, Matsudo-shi Chiba-ken, 271 Japan

Cannabinoids in marijuana and cannabis resin were derived with dansyl chloride at 60°C in presence of Na₂CO₃ for 10 min. The products were extracted with hexane and separated by HPLC using a column (25cm×4.6mm) of Zorbax SIL with mobile phase of 5%-ethyl acetate in hexane and fluorometric detection at 475nm (excitation 350nm). The detection limit was 0.1 ng/injection for tetrahydrocannabinol.

Mass spectra of dansylated cannabinoids were also measured.

- Received April 28 1988 -

1 緒 言

カンナビノイドの高感度検出法として、分析機器の高度化により、各種の報告がなされている。これらには、EC (electron capture) 検出器を用いたガスクロマトグラフィー^{1,2)} (GC), GC - 質量分析法^{3,4)}, 電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{5,6)}などがあり、尿などの生体試料中の微量検出に適用されている。また、IMS (ion mobility spectroscopy) により、手に付着したテトラヒドロカンナビノール (THC) の直接検出⁷⁾が行われた。

蛍光測定も比較的高感度な検出方法である。一方、最近高感度検出法として化学発光法が注目されている。特に、過しゅう酸エステルと過酸化水素を用いたシス

テムは、HPLCのポストカラム検出法として広い応用が可能と考えられる⁸⁾。カンナビノイドはフェノール性化合物であり、それ自身紫外部に蛍光を持つと考えられるが⁹⁾、紫外部に蛍光性を有する化合物は、このシステムではほとんど発光しない¹⁰⁾。したがって、カンナビノイドを化学発光により高感度検出を行うには誘導体化が必要である。蛍光誘導体としてダンシル化が考えられる。野島ら¹¹⁾は、THC及びカンナビノール (CBN) のダンシル (DNS) 誘導体を合成し薄層クロマトグラフィー (TLC) により分離した。Forestら¹²⁾もTLCにより尿中のカンナビノイドをDNS誘導体として検出した。しかし、カンナビノイドのDNS誘導体のHPLC分離についての報告は見当たらない。われわれは、先にカンナビノイドのGC-MS及びTLC

* 大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬 531

について報告した¹³⁾¹⁴⁾。今回、カンナビノイドのDNS誘導体を合成し、HPLCで分離、蛍光検出を行ったので報告する。

2 実験

2.1 試料、試薬及び器具

大麻及びこれから単離したカンナビノイドは、前報¹⁴⁾のものを用いた。ダンシルクロリド (DNS - Cl, 5 -ジメチルアミノナフタレン - 1 - スルホニルクロリド) は、東京化成 (1%アセトン溶液として使用)、HPLCにおける溶出溶媒のヘキサン及び酢酸エチルは和光純薬のHPLC用溶剤、その他通常の試薬類は和光純薬の試薬特級を用いた。

ガラス器具は、トリメチルクロルシランの1%溶液 (クロロホルム)液中に約1時間おいてトリメチルシリル化したあとアルコール及び水で洗浄、130°で約3時間乾燥したものを使用した。

2.2 装置

マススペクトルの測定は、日立M - 80B型二重収束質量分析計 (データ処理装置 M - 0101) を用い、イオン化エネルギーは70eV、イオン化電圧は100 μA、試料の導入はインピームで行った¹⁵⁾。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) は島津製作所製で、ポンプはLC - 3AまたはLC - 6A、蛍光検出器はRF - 535を用いた。分離用カラムはDu Pont社のZorbax SIL (2.5cm × 4.6mm) を用いた。溶出溶媒はヘキサン - 酢酸エチル (95: 5) で、流速は2ml/minとした。

分光蛍光度計は、日本分光のFP - 550型を用いた。

2.3 カンナビノイドのダンシル化

テトラヒドロカンナビノール (THC) 等の単離したカンナビノイドについては、100 μg相当量 (ヘキサン溶液)をダンシル (DNS) 化反応に供した。また、100mgの大麻をヘキサンで繰り返し抽出し、ろ過した。ろ過を濃縮して10mlとしたものの1 μlをDNS化反応用試料とした。

反応は、内径5mmのガラス管を封じた小型試験管で行った。試料を小型試験管に取り、DNS - Clの1%アセトン溶液100 μl及び1% - 炭酸ナトリウム100

μlを加えてよく混合した。これを60°の湯浴に10分間保ってダンシル化を行った。窒素を吹き込んでアセトンを除いた後、0.1N 水酸化ナトリウム100 μlを加えて過剰のDNS - Clを分解し、DNS化反応物とした。これにヘキサン 0.5mlを加えて混合したあと静置した。上層のヘキサン層の5~10 μlをHPLCに注入した。これらの混合操作は、試験管ミキサーで行った。

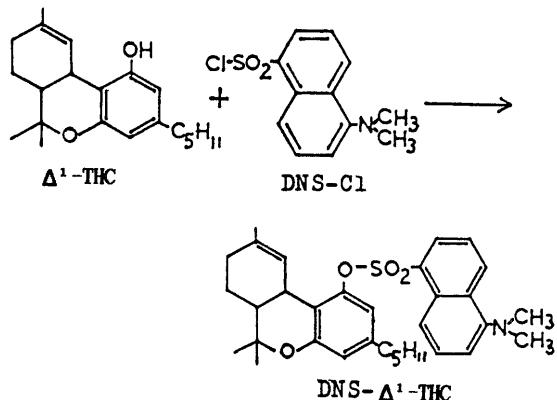


Fig. 1 Dansyl derivatization of Δ¹-THC

2.4 ダンシル誘導体の単離

ヘキサン抽出物をHPLCに注入すると、過剰のDNS - Clの分解物によるピークが強く検出されたので、目的物をマススペクトルで確認するため、カラムクロマトグラフィーにより精製した。ヘキサン抽出物をセファデックス LH - 20 を充填したカラム (25mm × 70cm) 上に移し入れた。クロロホルム - エーテル - エタノール (10: 10: 1) の混合溶媒で溶出し (流速7.2ml/min)、溶出液を5mlずつフラクションコレクターで分取した。分取した溶液に紫外線を照射して蛍光性を示す分画をHPLCで分離して单一成分であることを確認したのち、溶媒を減圧下で除去しマススペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。

3 結果及び考察

3.1 ダンシル誘導体化反応

Garrett¹⁶⁾らによると、THCを0.1 μg/mlの濃度でガラス製のメスフラスコに入れた場合、その50%がガラスに吸着するが、ガラス器具をトリメチルシリル

化すると, THC はほとんど吸着しない。ガラス器具のシリル化にはいくつかの方法があるが¹⁷⁾, 本実験においては, トリメチルクロルシランの 1% クロロホルム溶液を用いた。

蛍光誘導体化試薬には, アミン類を対象とした各種の試薬がある。カンナビノイドのようなフェノール性化合物についてもこれらの試薬が用いられている。Vinson ら¹⁷⁾は, 尿中の THC を 2 - p - chlorosulfonyl - 3 - phenyl indole(DIS)の誘導体とし, 蛍光測定により定量した。この誘導体では, 蛍光測定の際水酸化カリウムを包接したクラウンエーテルを用いる必要があるので HPLC には適用し難い。ダンシリルクロリド(DNS - Cl)はアミンやフェノールと容易に反応して DNS 誘導体が得られる。この実験では, 野島ら¹¹⁾及び Forest ら¹²⁾の報告を参考に条件の設定を行った。

DNS-Cl の添加量は, カンナビノイドに対しモル濃度で約 10 倍とした。Forest らは, 反応終了後, 飽和食塩水を添加して塩析を行っているが, 塩析を行わない場合とほとんど差がなかったので, 以後の実際では塩析を行わなかった。

3.3 DNS 誘導体のマススペクトル

メタンフェタミン, モルヒネ, 生体アミン類のダンシリル誘導体のマススペクトルについて報告されている^{19)~21)}。これらのマススペクトルでは, 分子イオンが認められ, DNS 部に由来する m/z 170 または m/z 171 のフラグメントが強く検出されている。本試験で測定したカンナビノイドの DNS 誘導体のマススペクトルを Fig. 2 に示した。いずれも分子イオン及び m/z 170 または m/z 171 のフラグメントが認められた。¹-THC 及び THC - C₃においては, カンナビノイド部に由来する m/z 313 及び m/z 285 のフラグメントがそれぞれベースピークとなっており, DNS 誘導体と確認した。

カンナビシクロール(CBCy)及びカンナビクロメン(CBCh)のマススペクトルは互いによく類似している。いずれも m/z 464 がベースピークとなっているが, このフラグメントの生成理由については明らかにできなかった。

カンナビジオール(CBD)及びカンナビゲロール(CBG)は 2 つのフェノール性水酸基を持っており, いずれ(あるいは両方)が NDS 化しているのか興味

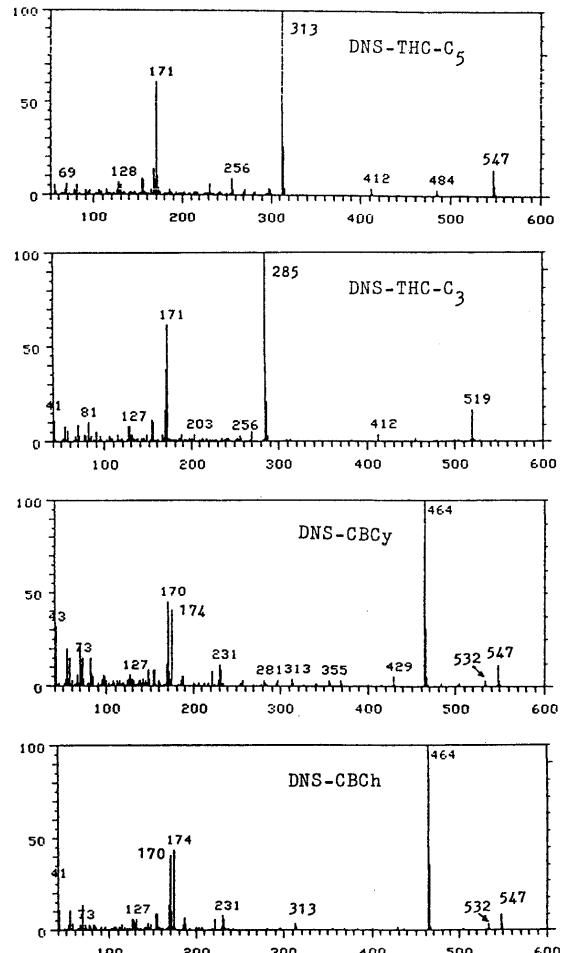
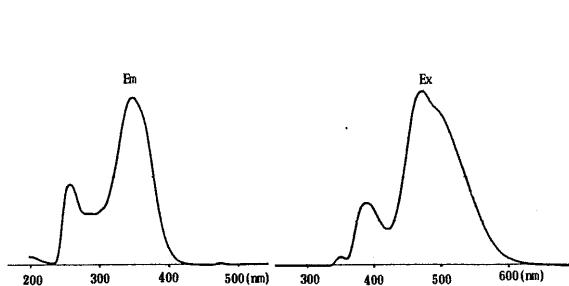


Fig. 2 Mass spectra of dansylated cannabinoids

があるが, これらについては標準品が十分得られなかつたので測定できなかった。

3.4 HPLC

Gennaro ら²²⁾はアミン類の DNS 誘導体をメタノール - 水系の溶媒を用いて逆相条件で分離した。逆相系の条件を用いることも考えられたが, 極性溶媒は DNS 誘導体の蛍光性を弱めるので, ヘキサン - �酢酸エチル(95:5)を用いた。DNS 基は第三アミン基を持つので微量のアンモニアを加えることも考えられるが²⁰⁾, この実験条件で誘導体の保持時間は安定であり, アンモニアの添加は行わなかった。

Fig. 3 Ex and Em spectra of dansyl $^{1}\text{-THC}$

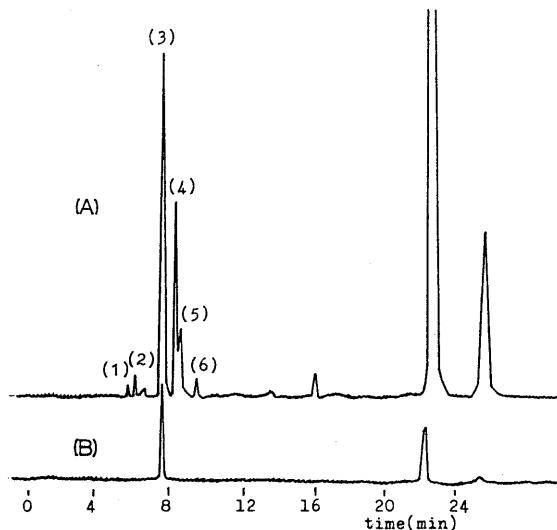
用いた溶媒 ヘキサン - �酢酸エチル (95:5) における最大蛍光波長を確認するため、誘導体の蛍光スペクトルを測定した。 $^{1}\text{-THC}$ では、励起波長 348nm のとき最大蛍光波長 475nm を示した (Fig 3)。以後の実験では励起波長 348nm、蛍光波長 475nm を HPLC の蛍光検出波長とした。なお、ヘキサン - イソプロパノール (98:2) では、 $^{1}\text{-THC}$ は励起波長 384nm の時最大蛍光波長 475nm と著しく異なっていた。

大麻樹脂中のカンナビノイドの DNS 誘導体のクロマトグラムを Fig 4 に示した。THC - C₃ (テトラヒドロカンナビパリン) が CBN (カンナビノール) のショルダーとなったほかは、良好な分離を示した。各成分の保持時間は、CBCy (カンナビシクロール) が 6.0min、THC が 7.6min、CBCh (カンナビクロメン) が 8.5min、THC - C₃ (テトラヒドロカンナビパリン) が 8.7min であった。

保持時間 12 分以降にみられるピークは、ブランクでも検出されるピークで、反応試薬の DNS - Cl の分解物によるものと考えられる。 $^{1}\text{-THC}$ について、S/N を 3 以上とし、注入量より検出限界を求める 0.1ng であった。

この試料は、少量の CBD (カンナビジオール) 及び CBG (カンナビゲロール) を含むが、これらはフェノール性水酸基を二個有しており、DNS 分解物のピークと重なって確認できなかった。

マリファナの抽出物については、DNS 誘導体化後、セファーデックス LH - 20 のカラムを用いて、カンナビノイドの DNS 誘導体のみを分取した。これを HPLC で分離して Fig 5 のクロマトグラムを得た。Fig 4 にみられた保持時間 12 分以降のピークは除かれている。この試料では CBCy 及び THC - C₃ は確認できず、ほとんどの含まれていないものと考えられる。

Fig. 4 HPLC chromatograms of (A) dansylated cannabinoids in cannabis resin extract and (B) dansyl $^{1}\text{-THC}$ (3pM)

Conditions

colum:Zorbax SIL (25cmx 4.6mm)

eluent:5%-ethyl acetate in hexane

flow rate: 2mL/min.

Peaks

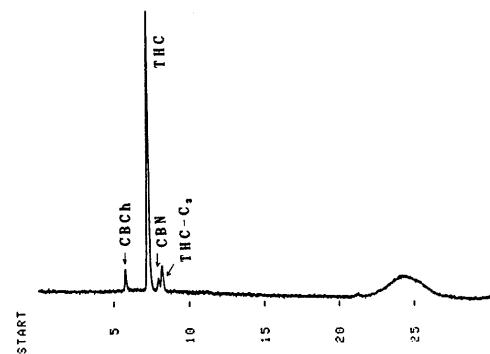
(1) CBCy, (2) CBCh, (3) $^{1}\text{-THC}$ (4) CBN, (5) THC-C₃ and (6) CBN-C₃.

Fig. 5 HPLC chromatograms of dansylated cannabinoids in marihuana extract. Dansylated cannabinoids were purified by column chromatography.

Condition

colum:Zorbax SIL (25cmx 4.6mm)

eluent:5%-ethyl acetate in hexane

flow rate: 2 mL/min.

4 要 約

カンナビノイドのダンシル誘導体化を行い、マススペクトルで確認した。大麻樹脂及びマリファナ中の石油エーテル抽出物のダンシル化物を、カラムにZorbax

SIL (25cm × 4mm), 溶出溶媒に 5%酢酸エチル(ヘキサン)を用いた高速液体クロマトグラフィーで分離して良好な結果を得た。テトラヒドロカンナビノールの検出限界は 0.1ng であった。また、カンナビノイドのダンシル誘導体のマススペクトルを測定した。

文 献

- 1) C. Maseda, K. Hama, Y. Fukui, K. Matubara, S. Takahashi and A. Akane ; *Forensic Sci. Int.*, 32, 2591 (1986)
- 2) A. B. Jones M. A. Elsohly, J. A. Bedford and C. A. Turner ; *J. Chromatogr.*, 226, 99 (1981)
- 3) U. Lemm, J. Tenczer, H. Baudish and W. Krause ; *ibid*, 342, 398 (1985)
- 4) H. H. McCurdy, L. J. Lewellen, L. S. Callahan and P. S. Childs ; *J. Anal. Toxycol.*, 10, 175 (1986)
- 5) Y. Nakahama and H. Sekine ; *ibid*, 8, 121 (1985)
- 6) D. S. Isenschmid and Y. H. Caplan ; *ibid*, 10, 170 (1986)
- 7) A. H. Lawrence ; *Forensic Sci. Int.*, 34, 73 (1987)
- 8) L. J. Kricka and G. H. G. Thrope ; *Analyst*, 108, 1274 (1983)
- 9) K. K. Afghan, P. E. Belliveau, R. H. Larose and J. F. Ryan ; *Anal. Chimica Acta*, 71, 355 (1974)
- 10) K. Honda, K. Miyaguchi and K. Imai ; *ibid*, 177, 111 (1985)
- 11) 野島昭定, 庄山正敏: *分析化学*, 29, 436 (1980)
- 12) I. S. Forest, D. E. Green, S. D. Rose, G. C. Skinner and D. M. Torres ; *Res. Commun. Pathol. Pharm.*, 2, 787 (1971) (*J. Chromatogr. Library*, 7, 182 (1976))
- 13) 川端省三, 杉本成子, 熊沢 勉; *本誌*, 27, 91 (1987)
- 14) 川端省三, 出来三男; *本誌*, 28, 103 (1988)
- 15) 大野幸雄, 川端省三; *本誌*, 27, 7 (1987)
- 16) E.R. Garrett and C.A. Hunt ; *J. Pharm. Sci.*, 63, 1056 (1974)
- 17) D. C. Fenimore, C. H. Davis, J. H. Whitford and C. A. Harrington ; *Anal. Chem.*, 48, 2289 (1976)
- 18) J. A. Vinson and A. H. Patel ; *J. Chromatogr.*, 307, 493 (1984)
- 19) 片岡憲治, 出来三男; *本誌*, 28, 111 (1988)
- 20) F. Tagliaro, A. Frigerio, R. Dorizzi, G. Lubli and M. Marigo ; *J. Chromatogr.*, 330, 323 (1985)
- 21) N. Seiler, H. Schneider and K. D. Sonnengerg ; *Z. Anal. Chem.*, 252, 127 (1970)
- 22) M. C. Gennaro, E. Mentasti, C. Sarzanini and V. Porta ; *Chromatographia*, 25, 117 (1988)