

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 developing 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 - dimensional 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

後, Gaoni ら¹¹⁾及び Fowler ら¹²⁾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づいて直ちに同定できることを知った。

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

薄層プレートの下端 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, 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グラフィー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, 帯状の分離層を搔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。

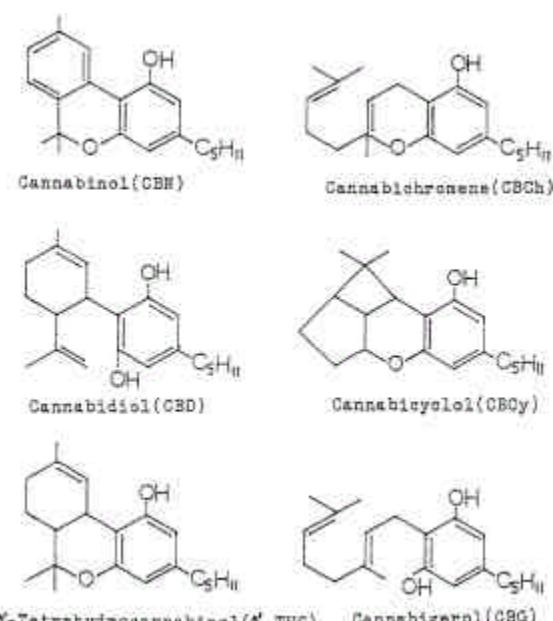


Fig. 1 Structural chemical formulae of cannabinoids

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 Sieper³⁾は, 荒巻らの報告した試薬のほか, Gibbs reagent, Ghamrawy reagent, Blakie reagent, Diazotized p-nitroaniline 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

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

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、呈色によってこれらを判別する事が可能であるため、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)が少なかつ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⁾の展開溶媒則にベンゼン-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の結果と対照して行った。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パリン)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、Fowler¹³⁾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値のスポッ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。

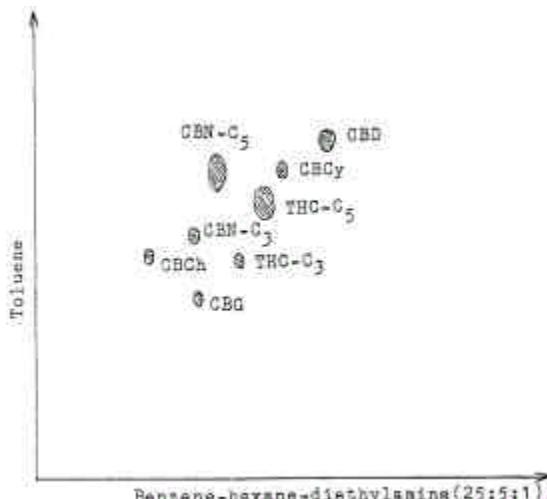


Fig. 2 Two-dimensional thin-layer chromatogram of cannabinoids in cannabis resin

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、近接成分が混在す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パリン(THC-C3)、カンナビパリン(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)平野錦一: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)

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



Photo 1 Thin-layer chromatogram of cannabionoids

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 .

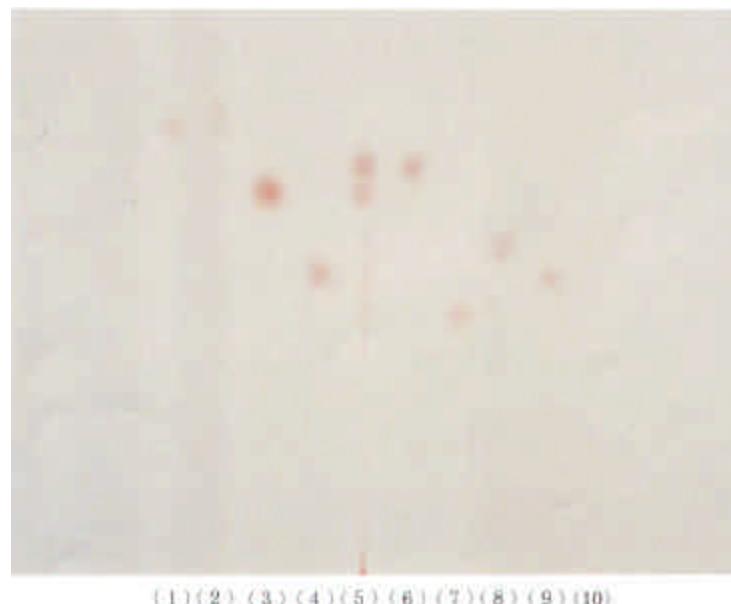


Photo 2 Thin-layer chromatogram of cannabinoids

Solvent system; toluene. Numbers refer Photo 1.

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

- 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)