

資 料

ガスクロマトグラフィーによる大麻草の分析方法に関する検討

岩木孝晴, 神山恵理奈, 中村成寿

要 旨

岐阜県では、伝統的な祭時に使用する等の目的に限り、その目的から妥当な面積の大麻草栽培を許可している。平成 13 年から当所において、県内で栽培されている大麻草の成分含量を検査し、その結果を基に Δ^9 -THC が高濃度の雌株を種子採取前に処分し、翌年栽培用の種子への混入を排除している。当所で実施しているガスクロマトグラフィーによる分析法は、1 検体あたり約 50 分の分析時間がかかり、検体数も多いことから、正確性を損なうことなく、分析時間の短縮を図ることとした。現行の分析法を基に、内標準物質及び昇温条件を変更することにより、1 検体あたり約 10 分の分析時間の短縮となった。変更した条件での直線性を確認したところ、 Δ^9 -THC 濃度が 16.875~540 mg/L の範囲で非常に良好な直線性を示した。また、現行の分析法による定量値と変更した条件での定量値を比較したところ、概ね同等の定量結果が得られた。

キーワード：大麻, ガスクロマトグラフィー

1 はじめに

大麻草はアサ科に属する雌雄異株の一年生草本で、古くから繊維や種子を得るための原料植物として栽培されている。大麻草は、カンナビノイドと呼ばれる約 120 種類に及ぶ一群の化合物を生産し、主なカンナビノイド成分として、 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC)、カンナビジオール (CBD) 等を含む。CBD は中枢神経作用がないとされる一方、 Δ^9 -THC は脳内のカンナビノイド受容体に結合することで神経作用を発現する。大麻を長期間乱用することにより、記憶や認知に障害を及ぼし、精神障害を発症するなどの健康被害を生じる危険性がある¹⁾。

令和 5 年 12 月に「大麻取締法」が「大麻草の栽培の規制に関する法律」に改正され、「大麻草の栽培の規制に関する法律施行令」第 1 条には、大麻草中の Δ^9 -THC 含量の上限が規定された。令和 6 年 10 月、大麻草中の Δ^9 -THC の標準的な分析法 (案) として、大麻草試料のサンプリング手法、分析手法、及び人工光下での栽培が示され、パブリックコメントが実施された。標準的な大麻草中の Δ^9 -THC 分析法として、液体クロマトグラフ質量分析計や液体クロマトグラフトリプル四重極質量分析計を用いた方法が一例として示されたが、これまでに文献等では分析機器や分析条件が異なる様々な分析法が報告されている。国連薬物犯罪事務

所 (UNODC) は、形態学的検査の他、化学的分析法として、呈色反応、薄層クロマトグラフィー (TLC)、水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフィー (GC-FID)、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS)、液体クロマトグラフィー (LC) 及び液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS または LC-MS/MS) を示しており、DNA に基づく大麻の識別法についても触れている²⁾。

Δ^9 -THC は、新鮮な大麻草中ではカルボン酸体である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール酸 (Δ^9 -THCA) の形で存在する。 Δ^9 -THCA は、大麻草の乾燥や光への暴露、加熱により脱炭酸を起こし、 Δ^9 -THC を生成する³⁾。そのため、ガスクロマトグラフィー (GC) による大麻草の分析では、 Δ^9 -THCA は熱変換されて生成した Δ^9 -THC として検出される。GC により Δ^9 -THCA を個別に定量する場合は、誘導体化を行う必要がある⁴⁾。一方、誘導体化により実験誤差を生じる可能性があることや、前処理時間が長くなることから、誘導体化することなく、GC により大麻草中のカンナビノイドを測定する方法も報告されている^{23,5)}。

岐阜県では、伝統的な祭時に使用する等の目的に限り、その目的から妥当な面積の大麻草栽培を許可している。大麻の乱用による保健衛生上の危害を防止するため、平成 13 年から、当所において、県内で栽培され

ている大麻草の成分含量の検査を行い、その結果を基に、 Δ^9 -THC が高濃度の雌株を処分し、翌年栽培用の種子への混入を排除している。大麻草の収去は、大麻草が開花して、雌株と雄株の区別が可能となる 9 月頃に行い、種子採取時期である 10 月末頃までに分析結果を報告する必要がある。当所における大麻草の検査では、雌株 1 株毎に葉を採取し、小葉から抽出した成分を GC-FID により測定している。収去から種子採取までの限られた期間内に多検体を検査しなければならないが、GC-FID による現行の分析法（以下、「現行法」という。）では、分析時間が 1 検体あたり約 50 分と長いいため、全検体の検査完了に時間を要している。そこで、現行法を基に分析条件を変更した方法（以下、「検討法」という。）を用いることにより、正確性を損なうことなく、分析時間の短縮を図った。

2 材料と方法

2.1 試料

岐阜県内において許可を受けて栽培された大麻草（雌株）の頭頂部小葉を用いた。

2.2 標準品及び試薬

Δ^9 -THC 溶液（27000 mg/L in エタノール）は Sigma-Aldrich 製を用いた。アセトンは、富士フイルム和光純薬工業製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。5- α -コレスタンは、関東化学製の純度 98%以上のものを用いた。スクワラン及びアンドロスタ-4-エン-3,17-ジオンは、東京化成工業製の純度 98%以上のものを用いた。テトラコサン及びトリベンジルアミンは、東京化成工業製の純度 99%以上のものを用いた。

2.3 標準溶液及び試料溶液の調製

2.3.1 標準溶液の調製

27000 mg/L Δ^9 -THC 溶液をエタノールで、5400 mg/L Δ^9 -THC 溶液に希釈した後、内標準物質を含んだアセトン溶液で順次希釈し、最終濃度 16.875~540 mg/L となるように調製した。

2.3.2 試料溶液の調製

小葉 1 枚をサンプル管に入れ、シリカゲルを乾燥剤として遮光したデシケーター内で減圧乾燥した。乾燥した小葉を粉碎し、300 mg/L 内標準物質アセトン溶液 1 mL を加え、10 分間超音波処理した後、0.2 μ m のメンブランフィルターでろ過して得たろ液を試料溶液とした。

2.4 測定条件

GC による分析は、以下の条件で行った。

装置：Agilent7890B (Agilent Technologies)

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：DB-5MS+DG, 30 m, 0.25 mmID, 0.25 μ m film

(J&W)

昇温条件（現行法）：50℃ (2 min) — 20℃/min — 200℃ (0 min) — 5℃/min — 300℃ (15 min)

昇温条件（検討法）：80℃ (1 min) — 20℃/min — 200℃ (0 min) — 5℃/min — 265℃ (0 min) — 35℃/min — 300℃ (13.5 min)

キャリアガス及び流量：He 1.0 mL/min, コンスタントフロー

注入口：250℃, スプリット比：20 : 1

検出器温度：250℃

注入量：1.0 μ L

3 結果及び考察

3.1 内標準物質の検討

当所で実施している現行法は、薬毒物試験法と注解 2006⁶⁾に記載された、GC による内標準法を基に分析条件の改良を加えたものであり、内標準物質として 5- α -コレスタンを用いている。この条件で試料溶液を測定した時、測定対象物質である Δ^9 -THC 及び CBD の保持時間は、それぞれ 21.2 分、19.9 分に対して、5- α -コレスタンの保持時間は 25.7 分であり、測定対象物質に比べて保持時間が長い。そこで、分析時間の短縮を図るため内標準物質の検討を行った。内標準物質は既報を参考に、スクワラン⁵⁾、アンドロスタ-4-エン-3,17-ジオン³⁾、テトラコサン⁷⁾、トリベンジルアミン²⁾を比較対象とした。当所で実施している現行法の条件において、これらの内標準物質を測定し、保持時間及び試料溶液中の成分ピークとの重なりを比較を行った結果を表 1 に示す。

表 1 現行法での内標準物質の比較

内標準物質	保持時間 (分)	試料溶液中の成分ピークとの重なり
5- α -コレスタン	25.7	なし
スクワラン	22.8	あり
アンドロスタ-4-エン-3,17-ジオン	22.2	あり
テトラコサン	19.3	あり
トリベンジルアミン	18.2	なし

まず、保持時間の比較を行った。スクワラン及びアンドロスタ-4-エン-3,17-ジオンの保持時間は、それぞれ 22.8 分及び 22.2 分であり、5- α -コレスタンと同様に、 Δ^9 -THC の保持時間である 21.2 分より長かった。一方、テトラコサン及びトリベンジルアミンの保持時間は、それぞれ 19.3 分及び 18.2 分であり、CBD の保持時間である 19.9 分より短かった。

次に、試料溶液中の成分ピークとの重なりを確認した。試料溶液を測定した時、測定対象物質以外にもカンナビノイド等の複数の夾雑成分ピークが見られる。各内標準物質を含む試料溶液のクロマトグラムを比較した時、スクワラン、アンドロスタ-4-エン-3,17-ジオン

及びテトラコサンの各ピークは、それぞれ試料溶液中の成分ピークと重なりが見られた。一方、トリベンジルアミンのピークは、試料溶液中の成分ピークと完全に分離した。

これらの結果から、内標準物質は、試料溶液中のピークとの重なりがなく、測定対象物質である Δ^9 -THC 及び CBD の保持時間より短い、トリベンジルアミンとした。内標準物質をトリベンジルアミンに変更したことにより、溶出順はトリベンジルアミン、CBD、 Δ^9 -THC の順になった (図 1)。

3.2 昇温条件の検討

正確性を損なうことなく分析時間の短縮を図るため、内標準物質の検討に続き、昇温条件の検討を行った。

変更可能な条件として、まず、初期温度及びその保持する時間の検討を行った。現行法では、50℃で2分間保持した後、200℃まで毎分 20℃で昇温している。初期温度を高くする程、また、200℃までの昇温速度を上げる程、CBD のピークと隣接するピークの分離が悪くなったが、初期温度を 80℃に上げて、これらのピークを分離することが可能であった。また、初期温度で保持する時間を検討したところ、2 分間保持から 1 分間保持に変更しても、両ピークは現行法と同等に分離した (図 2)。よって、200℃までの昇温速度は変更せず、初期温度を 80℃、それを保持する時間を 1 分間に変更した。

次に、測定対象物質が溶出する時間帯での昇温条件の検討を行った。測定対象物質の各ピークを分離するため、200℃から 300℃まで毎分 5℃の昇温速度としている。この昇温速度を上げるにより、測定対象物質の各ピークの分離が悪化したため、毎分 5℃の昇温速度は変更しないこととした。内標準物質が 5- α -コレスタンの場合は、CBD、 Δ^9 -THC、5- α -コレスタンの順に溶出するため、5- α -コレスタンの溶出まで昇温速

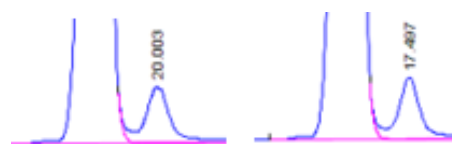


図 2 CBD のピークとその隣接するピーク
(左：現行法，右：検討法)

度を上げることが出来ず、時間の短縮は難しかった。内標準物質をトリベンジルアミンに変更したことにより、溶出順がトリベンジルアミン、CBD、 Δ^9 -THC の順になり、 Δ^9 -THC の溶出後、300℃まで一気に昇温が可能となった。そのため、200℃ (0 min) - 5℃/min - 300℃であった条件を 200℃ (0 min) - 5℃/min - 265℃ (0 min) - 35℃/min - 300℃に変更した。

最後に、300℃で保持する時間の検討を行った。試料溶液では、測定対象物質が溶出した後にも、保持時間の長い夾雑成分ピークが複数溶出する。これらを全て溶出させるため 300℃で 15 分間保持としているが、保持する時間を 1.5 分短縮しても試料溶液中の夾雑成分は全て溶出したことから、300℃で保持する時間を 13.5 分とした。

検討後の昇温条件にて、内標準物質をトリベンジルアミンとして試料溶液を測定したところ、トリベンジルアミン、CBD 及び Δ^9 -THC の保持時間は、それぞれ 15.7 分、17.3 分及び 18.7 分であった (図 3)。トリベンジルアミンは試料溶液中の夾雑成分ピークと完全に分離した。

現行法を基に、内標準物質及び昇温条件を変更した検討法を用いることにより、1 検体あたり約 10 分の分析時間の短縮となった。

3.3 検討法における分析法の妥当性確認

検討法の条件における Δ^9 -THC の検量線を図 4 に示す。トリベンジルアミンに対する Δ^9 -THC のピーク面

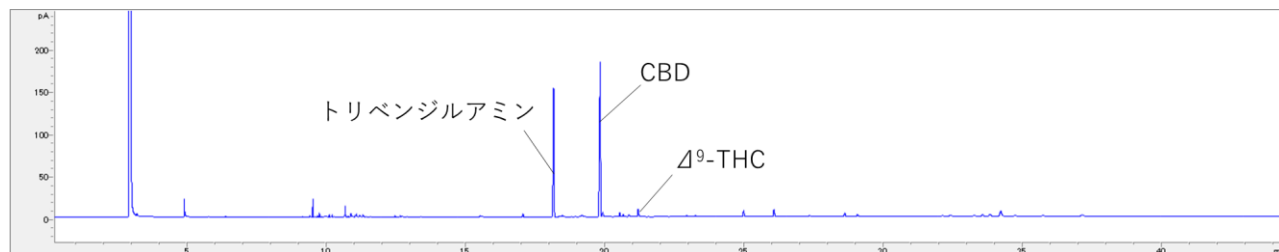


図 1 現行法による試料溶液のクロマトグラム (測定時間 44.5 分)

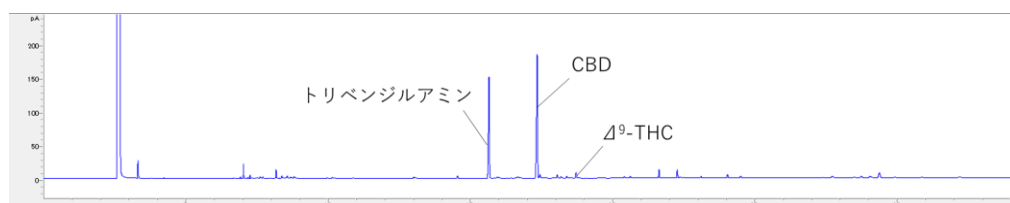


図 3 検討法による試料溶液のクロマトグラム (測定時間 34.5 分)

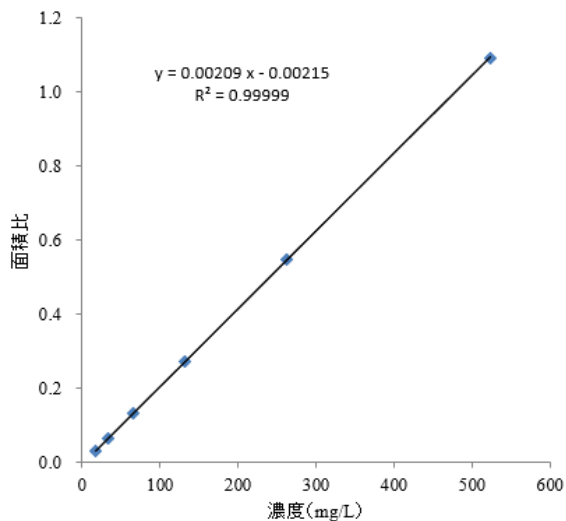


図4 Δ⁹-THC 検量線 (内標準法)

積比は、濃度比 0.05625～1.8, すなわち Δ⁹-THC 濃度 16.875～540 mg/L の範囲で非常に良好な直線性 ($r^2=0.99999$) を示した。

また、Δ⁹-THC 標準溶液 (135 mg/L) を 6 回繰り返して注入し測定した時、ピーク面積比の変動係数は 0.01 % と良好であった。

検討法と現行法における Δ⁹-THC 定量値を比較するため、同一の葉から得られた小葉 1 枚ずつを試料とし、それぞれ 10 検体について、抽出及び測定を行った (表 2)。現行法による定量値に対する検討法による定量値の誤差は平均 7.7 % であり、現行法と検討法は概ね同等の定量結果であった。

表2 検討法と現行法の定量値の比較

	Δ⁹-THC 含量(mg/g)										平均
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
検討法	0.77	0.72	0.80	0.52	1.48	0.48	0.52	0.46	0.28	1.41	
現行法	0.77	0.76	0.79	0.54	1.40	0.44	0.51	0.42	0.23	1.70	
誤差 (%)	0.2	5.8	1.2	4.2	6.1	8.6	2.3	11.0	20.7	17.1	7.7

以上の結果から、検討法は現行法に対して、正確性を損なうことなく分析時間を短縮することが可能であった。

本研究では、GC-FID による大麻草の分析条件の検討を行った。GC-FID は、汎用性の高い分析手法であり、分解能や検出感度が高く、頑健性に優れている。GC-FID による本法は、時間的及び経済的な面から、特に多検体の大麻草をスクリーニング的に定量する場合に有用である。各機関において本法を実施する場合には、大麻草中の Δ⁹-THC 総量を正確に定量していることを担保するため、分析実施前に適切なバリデーションを実施する必要がある。

一方、令和 6 年 10 月に示された大麻草中の Δ⁹-THC の標準的な分析法 (案) では、Δ⁹-THC 含量の上限への適合性を確認する分析法として、液体クロマトグラフ質量分析計や液体クロマトグラフトリプル四重極質量分析計を用いた標準的な分析法が一例として示された。今後、大麻草中の Δ⁹-THC の標準的な分析法を踏まえ、当所において、条件検討や検査に必要な体制を整えていく必要がある。

4 まとめ

当所で実施している GC-FID を用いた大麻草の分析条件を検討した。現行の分析法を基に、内標準物質及び昇温条件を変更することにより、1 検体あたり約 10 分の分析時間の短縮となった。検討法において、直線性、繰り返し性、現行法との Δ⁹-THC 定量値の比較において、良好な結果が得られた。これらの結果から、正確性を損なうことなく分析時間を短縮することが可能であった。本法は、特に多検体の大麻草をスクリーニング的に定量する場合に有用である。

今後、大麻草中の Δ⁹-THC の標準的な分析法を踏まえ、当所において、検査に必要な体制を整えていく必要がある。

文 献

- 1) 厚生労働行政推進調査補助金 (医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業) 「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」研究班, 大麻問題の現状, 7-50, 真興交易(株)医書出版部, 2020.
- 2) United Nations Office on Drugs and Crime, Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products, 2022.
https://www.unodc.org/documents/scientific/Recommended_methods_for_the_Identification_and_Analysis_of_Cannabis_and_Cannabis_products.pdf
- 3) 日本薬学会編, 薬毒物試験法と注解 2017, 155-174 東京化学同人, 2017.
- 4) Cardenia V, Toschi T.G, Scappini S, Rubino R.C, Rodriguez-Estrada M.T: Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. J. Food Drug Anal. 26, 1283-1292, 2018.
- 5) Zekic J, Krizman M: Development of Gas-Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Cannabinoids and Terpenes in Hemp, Molecules, 25, 5872, 2020.

- 6) 日本薬学会編, 薬毒物試験法と注解 2006, 175-185
東京化学同人, 2006. Tomicek P: The main cannabinoids content in hashish
samples seized in Israel and Czech Republic, Isr. J.
Plant Sci., 63(3), 182-190, 2016.
- 7) Hanus L.O, Levy R, Vega D.D.L, Katz L, Roman M,

Study on an analytical method for cannabis by gas chromatography

Takaharu IWAKI, Erina KOHYAMA, Shigehisa NAKAMURA

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan*