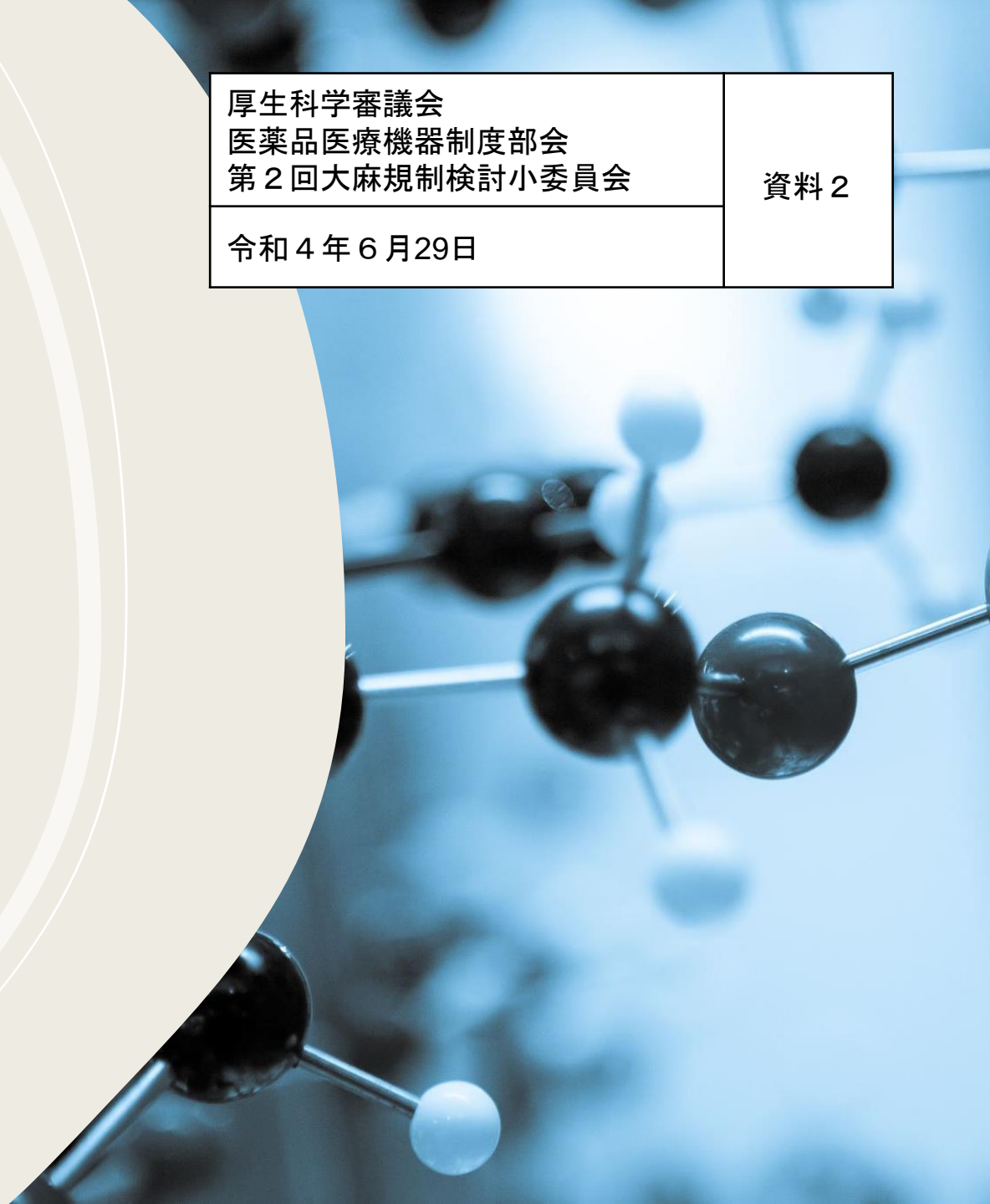
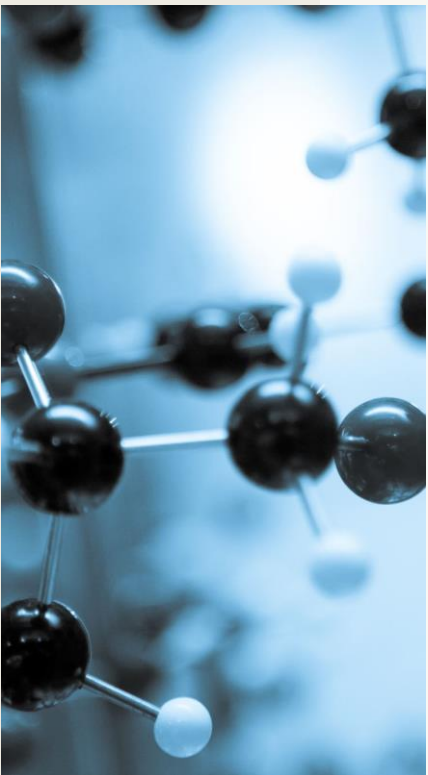


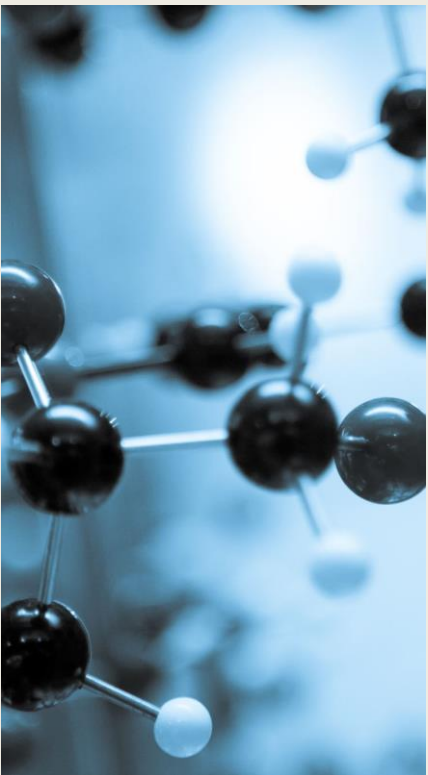
カンナビノイドの化学的性質





本日の内容

1. 大麻草(アサ属植物)とは
2. カンナビノイドについて
3. カンナビノイドの分析



本日の内容

1. 大麻草(アサ属植物)とは
2. カンナビノイドについて
3. カンナビノイドの分析

大麻草 *Cannabis sativa* とは？

科 属 種 亜種 変種

— Cannabaceae アサ科

— *Cannabis* アサ属

— *Cannabis sativa* アサ（大麻草）

— *Cannabis sativa* subsp. *sativa*

— *Cannabis sativa* subsp. *sativa* var. *sativa*

— *Cannabis sativa* subsp. *sativa* var. *spontanea*

— *Cannabis sativa* subsp. *indica* (syn. *C. ruderalis*)

— *Cannabis sativa* subsp. *indica* var. *indica*

— *Cannabis sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica*

- いくつかの実験的に生成された倍数体を除いて、すべてのアサ属は二倍体 ($n=10$) であり、属内での交配に対する障壁はない。
- 現在の変異パターンは主に2つのクラスに識別でき亜種 (subsp. *sativa* と subsp. *indica*) として扱われる。
- 各亜種内は更に2フェーズに分けられ、計4つの識別可能なグループが変種 (var.) として認識される。
- 様々な(栽培)品種が存在する。→医療用途の大麻草, 産業用途の大麻草, 嗜好用途の大麻草

大麻草 *Cannabis sativa* とは？

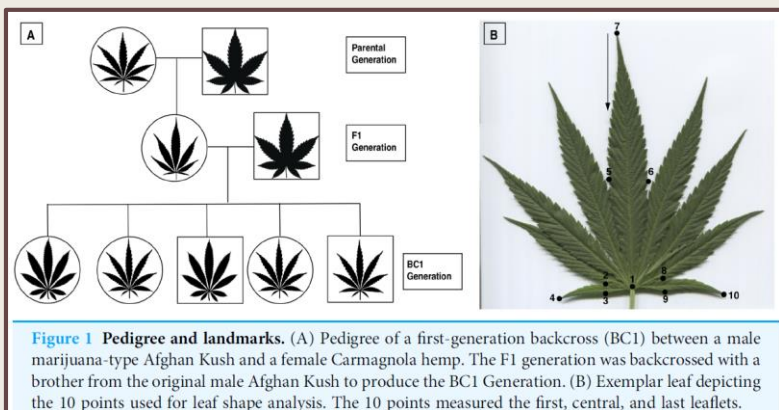
Cannabis sativa L. (大麻草)



- アサ科の一年生草本，雄株と雌株，原産地中央アジア
- 古くから繊維や種子を得るための原料植物として栽培
- カンナビノイドと呼ばれる大麻に特有な化合物の一群として約120種類が報告（構造の特徴により，11種類のサブタイプに分類される）
- 主カンナビノイド成分： 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)
- 植物中ではテトラヒドロカンナビノール酸，カンナビジオール酸として存在，保存や吸煙時の加熱処理によって脱炭酸をうけTHC，CBDになる
- カンナビノイド以外にも，テルペン類，フラボノイド類，アルカロイドなどを含む

THCA種： Δ^9 -THCを含有する(薬物型)

CBDA種： Δ^9 -THCをほとんど含有しない(繊維型)/Hemp



系統が交雑しており，葉の形などの表現型と化学的特性は必ずしも関連していない

- Eisohly MA, Phytochemistry of Cannabis sativa L. pp1-13 (2017)
- Vergara D, Feathers C, Huscher EL, Holmes B, Haas JA, Kane NC
Widely assumed phenotypic associations in *Cannabis sativa* lack a shared genetic basis. PeerJ. 2021 Apr 20;9:e10672.

大麻草の花または果実(種子)のついた枝端



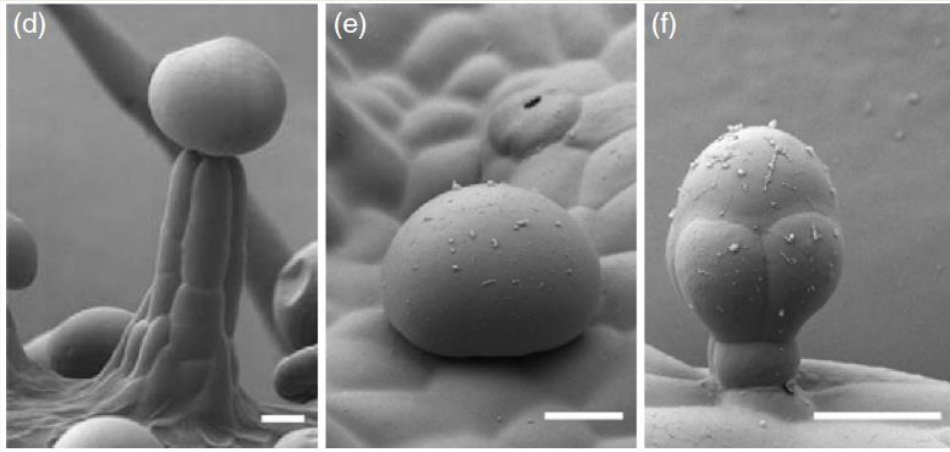
- | | | | |
|---|-----------------------------------------|----|--------------------------------------------------------|
| A | Inflorescence of male (staminate) plant | 7 | Pistillate flower showing ovary (longitudinal section) |
| B | Fruiting female (pistillate) plant | 8 | Seed (achene*) with bract |
| 1 | Staminate flower | 9 | Seed without bract |
| 2 | Stamen (anther and short filament) | 10 | Seed (side view) |
| 3 | Stamen | 11 | Seed (cross section) |
| 4 | Pollen grains | 12 | Seed (longitudinal section) |
| 5 | Pistillate flower with bract | 13 | Seed without pericarp (peeled) |
| 6 | Pistillate flower without bract | | |

- 大麻草は自然条件下では雌雄異株であるが、雌雄同株も存在
- フランスで栽培されているindustrial hemp (繊維や種子収穫用)のほとんどが雌雄同株

Bract 苞葉

United Nations Office on Drugs and Crime, Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products (2009)

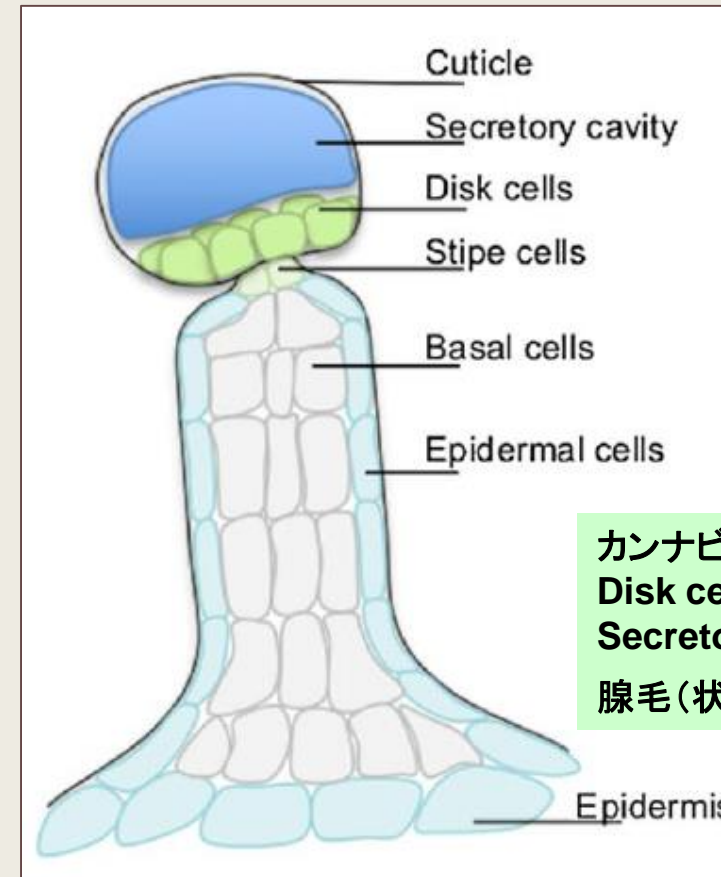
カンナビノイドはどこに存在するか？



Capitate-stalked glandular trichome

Capitate-sessile glandular trichome

Bulbous glandular trichome



カンナビノイドおよびテルペンは
Disk cellの色素体中で合成され、
Secretory cavityに蓄積される。
腺毛(状突起)は、**花葉**や**苞葉**に多く局在

- Conneely LJ, Mauleon R, Mieog J, Barkla BJ, Kretzschmar T, Characterization of the Cannabis sativa glandular trichome proteome. PLoS One. 2021 Apr 1;16(4):e0242633.
- Tanney CAS, Backer R, Geitmann A, Smith DL, Cannabis Glandular Trichomes: A Cellular Metabolite Factory. Front Plant Sci. 2021 Sep 20;12:721986.

大麻草の部位ごとのカンナビノイド含有量

- カンナビノイドが多く含まれる部位は花穂, 苞葉, 葉
- 植物体における位置によって葉のカンナビノイド含量は異なる
- カンナビノイドが少ない, またはほとんど検出されない部位としては根, 成熟した茎, 種子
- Δ^9 -THC (THCA)について, 大麻草における各部位での含量は花穂で10—12 %, 葉で1—2 %, 茎(stalks)で0.1—0.3 %程度

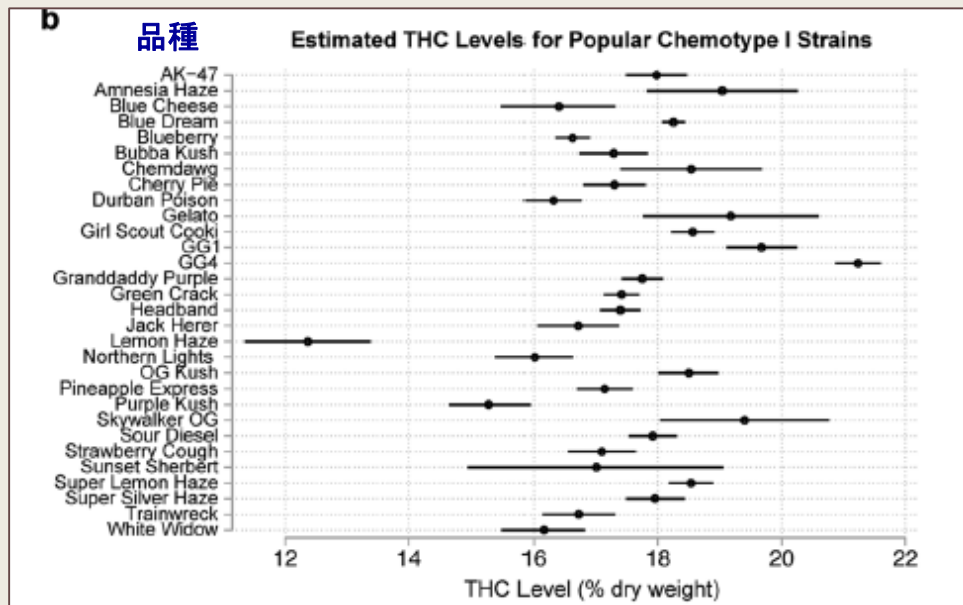
大麻草の成長過程におけるカンナビノイド含有量

- 発芽直後はほとんどカンナビノイドが生成しない
- 成長過程でのカンナビノイド含量の増減はカンナビノイドの種類によって異なる
- Chemotypeによっても生長段階における各カンナビノイド含量の増減は異なる
- 暗所で栽培した場合は明所と比較して Δ^9 -THCなどの含量値が低くなる

- United Nations Office on Drugs and Crime, Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products (2009)
- Andre CM *et al.*, Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. Front Plant Sci. (2016)

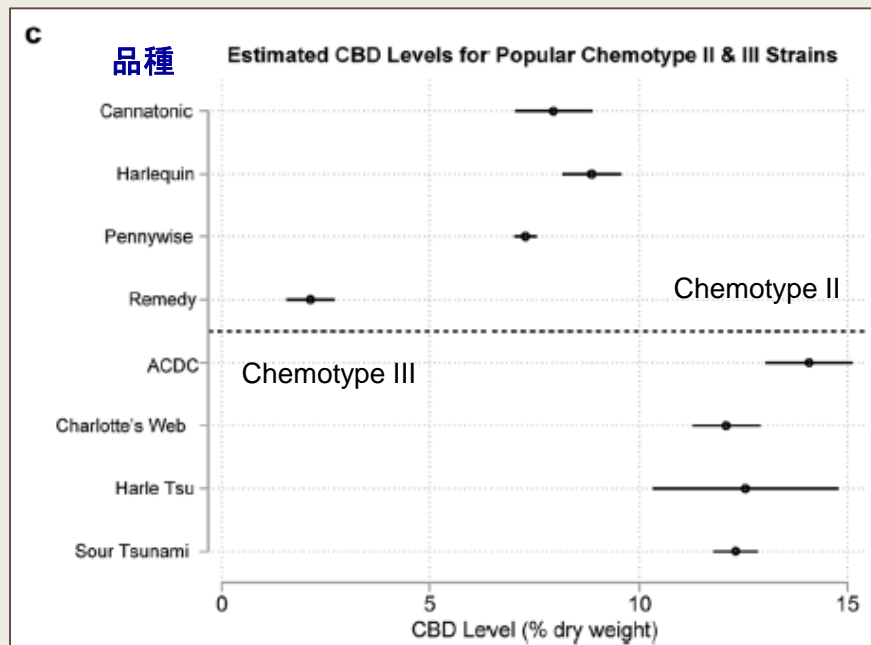
栽培品種によるカンナビノイド含有量について

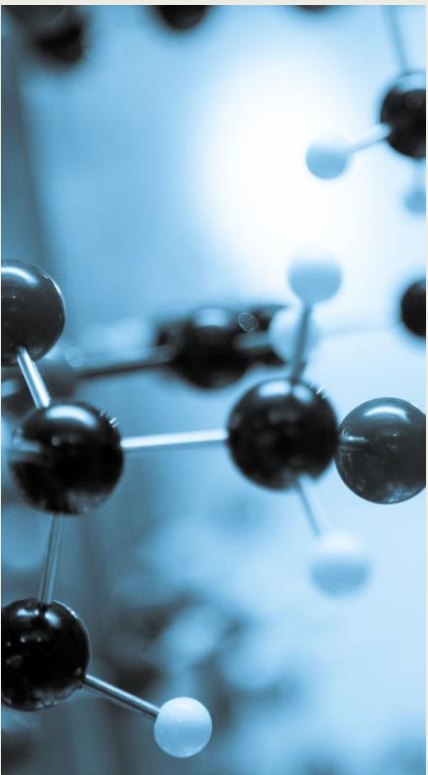
Chemotype IIに分類される栽培品種のTHC含量



Test date for 304,123 test results from June 2014 through May 2017 in Washington State, USA

Chemotype II, IIIに分類される栽培品種のCBD含量



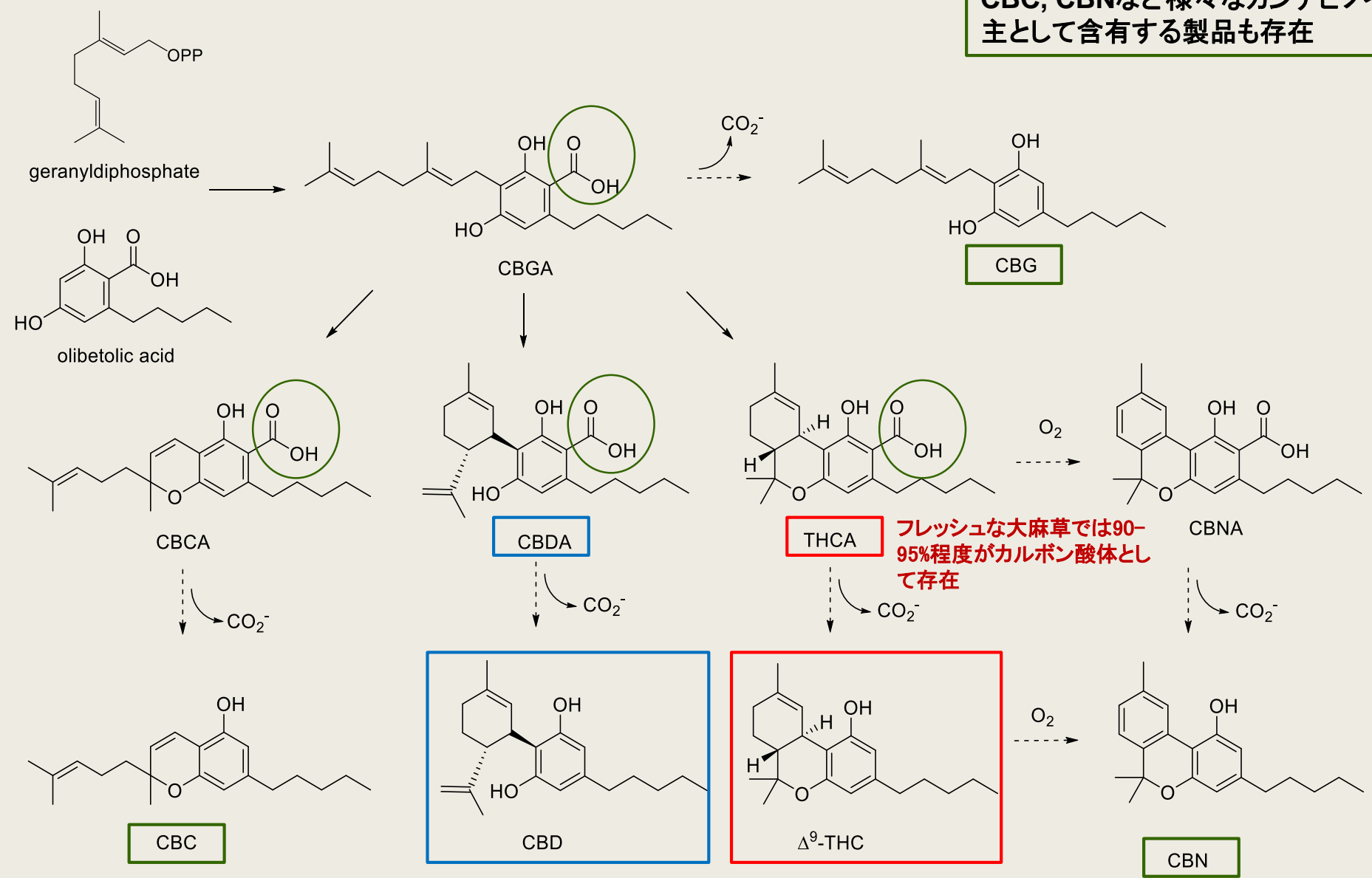


本日の内容

1. 大麻草(アサ属植物)とは
2. カンナビノイドについて
3. カンナビノイドの分析

大麻草におけるカンナビノイドの生合成(抜粋)

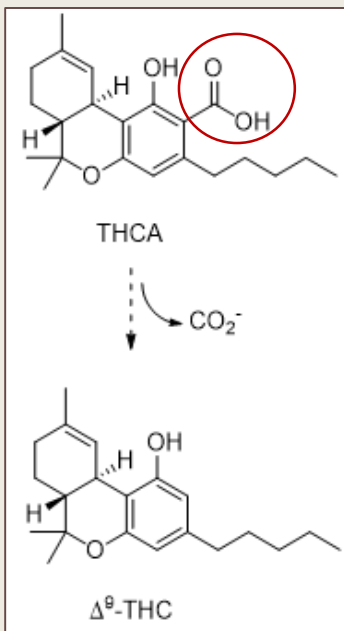
近年では、CBD, THC以外にも、CBG, CBC, CBNなど様々なカンナビノイドを主として含有する製品も存在



THCAを摂取すると生体試料中からTHCが検出されるか？

➤ Δ^9 -THCAは喫煙時には主に Δ^9 -THCとして吸引されるが、大麻/大麻抽出物を摂取したヒトの血清や尿中から Δ^9 -THCAが検出された報告がある

➡ Δ^9 -THCAそのものを摂取した場合、生体内で Δ^9 -THCになるか？



Δ^9 -THCA(単離精製物, >95%)を15 mg/kgラットに単回経口投与して、尿中に排泄される代謝物を分析

- 12種類の代謝物が検出されたが、 Δ^9 -THC及びその代謝物は検出されなかった
- Δ^9 -THCA, 11-OH- Δ^9 -THCA, Δ^9 -THCA-COOH及びそれらのグルクロン酸抱合体を主代謝物として検出

ラットの結果では,

- Δ^9 -THCAそのものを経口投与した場合、生体内で Δ^9 -THCには変換しないと考えられる

Jung J *et al.*, Studies on the metabolism of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol precursor Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) in rat using LC-MS/MS, LC-QTOFMS and GC-MS techniques *Journal of Mass Spectrometry.*, 44(10), 1423-1433 (2009).

CBDから Δ^9 -THC, Δ^8 -THC等への変換の可能性(加熱条件下)

- CBDを加熱装置により250-400°Cに瞬時に昇温し5分間加熱することにより生成した化合物を検討
 - Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, cannabinol (CBN), cannabichromene (CBC)が, 不活性条件下(ヘリウム中)でも酸化的条件下(9%酸素/ 91%窒素中)でも生成した

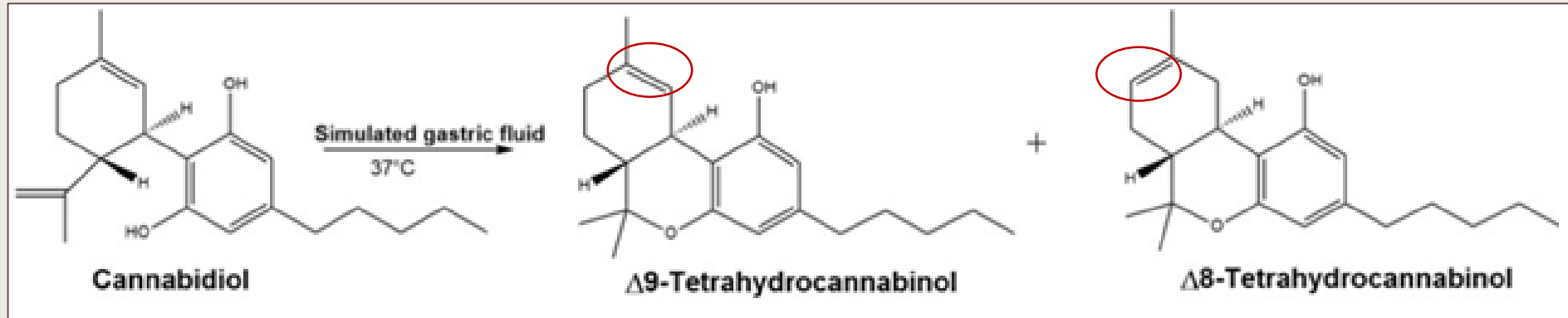
Zsuzsanna Czegeny *et al.*, CBD, a precursor of THC in e-cigarettes. *Scientific Reports*, 11, 8951 (2021)

- 市販の電子タバコデバイスを使用して, CBD含有プロピレングリコール/グリセロール溶液を加熱し, 気化した成分を室温下で凝縮物とし, 凝縮物中の化合物を分析
 - 凝縮物中において Δ^9 -THCの新たな生成は認められなかった
- 低THC含有大麻についてsmoking machineを使用してフィルターに捕集された化合物を分析
 - 検出された Δ^9 -THCは植物片に最初に含まれていた量の約1~48%であった

Hindelang P *et al.*, Absence of relevant thermal conversion of cannabidiol (CBD) to tetrahydrocannabinol (THC) in E-cigarette vapor and low-THC cannabis smoke. *ChemRxiv* (2022)

*ChemRxivはプレプリントサーバーの文献(査読前文献)

CBDから Δ^9 -THC, Δ^8 -THC等への変換の可能性(酸性条件下)



CBDを37°Cの人工胃液中 (pH1.2) において攪拌したところ,

- 2時間後にはCBDはほぼ消失
- 主に Δ^9 -THC, Δ^8 -THC及びその他の化合物が生成

Merrick J *et al.*, Identification of Psychoactive Degradants of Cannabidiol in simulated Gastric and Physiological Fluid. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1.1, 102-112 (2016).

CBDを経口摂取すると生体試料中からTHCが検出されるか？

- ミニブタ(n=3)に, CBDを1日2回, 15mg/kg, 5日間経口投与
1, 5日目の投与前及び投与後1,2,4,6時間後に血液を採取, 5日目の投与6時間後に胃内容物を採取
 - 血漿中 最高CBD濃度 1日目 328 ng/mL, 2日目 259 ng/mL
THC及び代謝物11-OH-THC, 検出されず
 - 胃内容物 胃内 CBD濃度 84,500 ng/mL 小腸内 CBD濃度 43,900 ng/mL
THC及び代謝物11-OH-THC, 検出されず

Louise Wray *et al.*, Cannabidiol dose not convert to 9-tetrahydrocannabinol in and in and in vivo animal model. *Cannabis and Cannabis Research*, 2:1, 282-287 (2017)

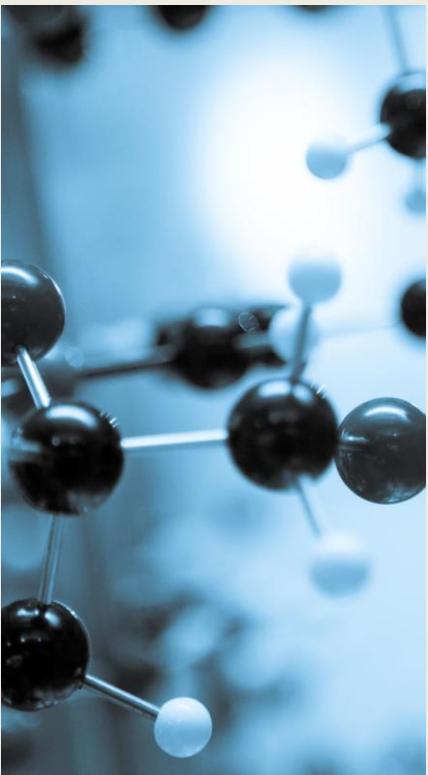
- ヒトに600 mgのCBD を経口投与した結果, THCとその代謝物は生体試料中から検出されなかった.

R. Martin-Santos *et al.*, Acute effects of a single, oral dose of d9- tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Curr Pharm Des*, 2012. 18(32) p. 4966-79 (2021).

- ハンチントン病の患者にCBD を10 mg/kg/day(約700 mg/day)6週間経口投与した結果, CBDの平均血漿中濃度は5.9-11.2 ng/mLであったが, Δ^9 -THCは検出されなかった.

P. Consroe *et al.*, Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 40(3) 701-708 (1991).

There is no evidence of that oral CBD administration in humans results in clinically relevant THC-like subjective or physiological effects, or appreciable plasma concentrations of THC or its metabolites.



本日の内容

1. 大麻草(アサ属植物)とは
2. カンナビノイドについて
3. カンナビノイドの分析

米国と欧州におけるhempの取り扱い 1

米国

- **2018 Federal Farm Bill**

2018年米国のFarm Bill (AIA)はHempをControlled Substances Act (CSA) のSchedule Iから除外し、農産物としてhempを栽培することを合法化した。

Hemp; the plant **Cannabis sativa L.** and any part of that plant, including the seeds thereof and **all derivatives, extracts, cannabinoids, isomers, acids, salts and salts of isomers, whether growing or not, with a delta-9 tetrahydrocannabinol concentration of not more than 0.3 percent on a dry weight basis.**

- **Oct. 2019, USDA Interim Final Rule for the Establishment of a Domestic Hemp Production Program**

Testing will be conducted **using post-decarboxylation** or **other similarly reliable methods** where the total THC concentration level measured includes the potential to **convert delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) into THC**. Further, test results should be determined and reported on a **dry weight basis**, meaning the percentage of THC, by weight, in a cannabis sample, after excluding moisture from the sample. The moisture content is expressed as the ratio of the amount of moisture in the sample to the amount of dry solid in the sample.

米国と欧州におけるhempの取り扱い 2

EU Regulation 1307/2013 (EU regulation on agricultural products)

(28) As regards hemp, specific measures should be kept to ensure that illegal crops cannot be hidden among the crops eligible for the basic payment, thereby adversely affecting the market for hemp. Hence, payments should continue to be granted only for areas sown with varieties of hemp offering certain guarantees with regard to its psychotropic substance content.

(31) In order to preserve public health, the power to adopt certain acts should be delegated to the Commission in respect of laying down rules making the granting of payments conditional upon the use of certified seeds of certain hemp varieties and defining the procedure for the determination of hemp varieties and the verification of their tetrahydrocannabinol content.

Article 32

6. Areas used for the production of hemp shall only be eligible hectares **if the varieties used have a tetrahydrocannabinol content not exceeding 0.2 %.**

Article 35

3. In order to preserve public health, the Commission shall be empowered to adopt delegated acts in accordance with Article 70 laying down rules making the granting of payments conditional upon the use of certified seeds of certain hemp varieties and the procedure for the determination of hemp varieties and the verification of their tetrahydrocannabinol content referred to in Article 32(6).

欧州における最終産物の許容値の例(2018年時点)

国	最終製品中に許容される Δ^9 -THCレベル
ドイツ	0.005 mg/kg(ドリンク) 5 mg/kg(オイル) 0.15 mg/kg(その他)
フランス	0 %
イタリア	2 mg/kg(サプリメント) 5 mg/kg(種子由来のオイル)
チェコ	0.3 %(産業用)

- Hemp栽培で許容される Δ^9 -THCレベルと最終製品中に許容される Δ^9 -THCレベルが異なることもある

大麻草 (marijuana, hemp) の分析法について

通常は

- 試料の乾燥操作をしてから測定
- エタノール等の溶媒抽出や超臨界抽出

機器分析として

- GC-FID with/without derivatization
- GC-MS with/without derivatization
- LC-UV
- LC-MS(/MS)

基本的にはいずれの手法でも
0.2 weigh% THCLレベルは測定可能

注意点

- GCにおけるTHCAの脱炭酸の変換効率
- CBDからTHCへの変換の可能性
- 異性体との分離
- 試料の調製法の違い(どの部分を採取しどのように調製するか?)
 - ✓ プロトコールにより, 分析に用いる大麻草の分析対象部位が異なる場合がある. 例えば, 花のみ, 花または果実(種子)のついた枝端, 果実(種子)を含む枝の上部1/3(葉を含む)など
 - ✓ 大麻草の乾燥操作

	主な分析対象	利点	欠点
GC-FID/ GC-MS without derivatization	total delta9-THC, CBD等	Rapid Simple sample preparation Measures total THC directly Fully quantitative or decision point	Must safe gard against CBD-THC conversion Not complete conversion from THCA to THC
GC-FID/ GC-MS with derivatization	THCA, delta9-THC, CBDA, CBD等	No CBD-THC conversion Fully quantitative or decision point Measures THCA separately	Longer sample preparation
HPLC UV	THCA, delta9-THC, CBDA, CBD等	No CBD-THC conversion Fully quantitative or decision point	Limited specificity Risk of interference
LC-MS(/MS)	THCA, delta9-THC, CBDA, CBD等	No CBD-THC conversion Fully quantitative or decision point Specificity	Ion suppression/enhancement Overkill for sensitivity Cost

$$\text{Total THC} = (0.877 \times \text{THCA}) + \text{THC}$$

$$\text{Total CBD} = (0.877 \times \text{CBDA}) + \text{CBD}$$

Micalizzi G. *et al.*, Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 164864 (2021). 19

大麻草 (marijuana, hemp) 及び関連製品の分析法の例

- United Nations Office on Drugs and Crime **UNODC 国連薬物犯罪事務所**
Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products
(Revised and updated) https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook_1.pdf
- EU official method since 1986 (with update since) **EU**
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31986R0421&from=FR>
- Drug Enforcement Administration (review) **DEA 米国麻薬取締局**
Analysis of “Marijuana Edibles” – Food Products Containing Marijuana or Marijuana Extracts – An Overview, Review, and Literature Survey. Microgram Journal 2017, Volume 14; Numbers 1-4
- Canada Industrial Hemp Technical Manual **カナダ産業用hempテクニカルマニュアル**
- Standard Operating Procedures for Sampling, Testing and Processing Methodology
https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/hc-ps/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/precurs/hemp-indus-chanvre/tech-man/hemp-tech-manual-eng.pdf
- Association of Official Analytical Chemists **AOAC**
2020.10 Cannabinoids in Dried Flowers and Oil
Determination of Cannabinoids in Cannabis sativa Dried Flowers and Oils by LC-UV: Single-Laboratory Validation, First Action 2018.10
Journal of AOAC International 103, No. 2, 2020 489

2018.11 Quantitation of Cannabinoids in Cannabis Dried Plant Materials, Concentrates, and Oils
Quantitation of Cannabinoids in Cannabis Dried Plant Materials, Concentrates, and Oils Using Liquid Chromatography–Diode Array
Detection Technique with Optional Mass Spectrometric Detection: Single-Laboratory Validation Study, First Action 2018.11.
Journal of AOAC International 102, No.6, 2019 1822