

李俊生, 王学峰, 姜冰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测工业大麻中 8 种大麻酚的含量[J]. 环境化学, 2023, 42(1): 337-340.
LI Junsheng, WANG Xuefeng, JIANG Bing, et al. Simultaneous determination of 8 cannabinols in industrial hemp by ULTRA performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (1): 337-340.

超高效液相色谱-串联质谱法同时检测工业大麻中 8 种大麻酚的含量

李俊生¹ 王学峰^{1,2} 姜冰² 张盼盼² 王派丽²
王妍³ 周春卫³ 吴岩²

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 哈尔滨, 150028; 2. 哈尔滨海关技术中心, 哈尔滨, 150028; 3. 岛津企业管理(中国)有限公司, 沈阳, 110016)

摘要 本文建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定工业大麻中 8 种大麻酚的检测方法. 样品经烘干后用无水乙醇超声提取, 采用 QuEChERS 方式净化, 经 Luna Omega 1.6 μm Polar C18 (100 mm \times 2.1 mm) 色谱柱分离, 以 5 mmol 乙酸铵和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾负离子模式进行离子扫描, 多反应监测模式下测定 8 种大麻酚, 内标法定量. 在 0—10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 内, 线性相关系数 (R^2) 均大于 0.999, 方法检出限为 0.02—0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 定量限为 0.08—0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 在添加水平为 1 LOQ、5 LOQ 和 10 LOQ 时的回收率在 89.9%—104.7%, 相对标准偏差 (RSD) 在 0.9%—4.1%.

关键词 工业大麻, 大麻二酚 (CBD), 四氢大麻酚 (THC), 超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS).

Simultaneous determination of 8 cannabinols in industrial hemp by ULTRA performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry

LI Junsheng¹ WANG Xuefeng^{1,2} JIANG Bing² ZHANG Panpan² WANG Paili²
WANG Yan³ ZHOU Chunwei³ WU Yan²

(1. School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin, 150028, China; 2. Harbin Customs Technical Center, Harbin, 150028, China; 3. Shimadzu (China) Co., LTD., Shenyang, 110016, China)

Abstract A method for the determination of 8 cannabinol in industrial hemp by ULTRA-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established. After drying, the samples were extracted by ultrasonic extraction with anhydrous ethanol, purified by QuEChERS method, and separated on a Luna Omega 1.6 μm Polar C18 (100 mm \times 2.1 mm) column. Gradient elution was performed with 5 mmol ammonium acetate and acetonitrile as mobile phase, and ion scanning was performed in electrospray negative ion mode. Determination of 8 cannabinol under multiple response monitoring mode. THC-D3 was used as internal standard and quantified by internal standard method. The linear correlation coefficients (R^2) of the method were greater than 0.999 in the range of 0—10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, the limits of detection were 0.02—0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the limits of quantification were 0.08—0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The recoveries at 1 LOQ, 5 LOQ and 10 LOQ levels ranged from 89.9% to 104.7%, and the relative standard deviations (RSD) ranged from 0.9% to 4.1%.

Keywords industrial hemp, cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC), Ultra High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

工业大麻是指四氢大麻酚(THC)含量低于 0.3% 的大麻, 大麻酚是工业大麻中最重要的化学成分, 其中包括大麻酚(CBN)、大麻二酚(CBD)、四氢大麻酚(THC)及其异构体等. 目前, 对植物大麻酚的分析方法主要有气相色谱法

(GC)^[1-2]、高效液相色谱法(HPLC)^[3-4]、高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS),其他技术包括薄层色谱(TLC)、核磁共振(NMR)和近红外光谱(NIR),这些方法都有其优点和缺点.GC是分析大麻提取物中植物大麻酚最常用的方法,但是,GC分析所需的高温触发了植物大麻酚的酸形式的脱羧,这种分解阻碍了新鲜样品中主要化合物的检测,且存在化合物相关动力学,从而影响了定量.此外,高温还可引发其他反应,如氧化和异构化.HPLC灵敏度低、受基质干扰较大,如果使用紫外检测,色谱必须考虑选择性,以避免其他吸收紫外线的化合物的干扰.TLC技术具有快速、简便、廉价等优点,但灵敏度和选择性不如主流技术.NMR具有灵敏、适合定量分析的特点,但价格昂贵.NIR是快速鉴别的方法,不适合定量分析的方法.高效液相色谱法-串联质谱(LC-MS/MS)法分析范围广、选择性好、灵敏度高、分析结果可靠,因此,本实验采用高效液相色谱法-串联质谱法同时检测8种大麻酚,检测时间仅为5 min,有效提高检测效率和适用范围,为我国工业大麻的监管提供了重要的技术手段.

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

UPLC-MS/MS液相色谱-串联质谱仪(Nexera XR液相色谱仪LC-30A由日本岛津公司生产,AB6500+质谱仪由美国ABI公司生产),飞诺美Luna Omega 1.6 μm Polar C18(100 mm \times 2.1 mm)色谱柱,Thermo Fisher高速冷冻离心机,EYELA分液漏斗振荡器,KQ-500DB型数控超声波清洗器.

大麻酚标准品:四氢大麻酚(THC)、大麻二酚(CBD)、大麻萜酚(CBG)、大麻酚(CBN)、四氢大麻酚-D3(THC-D3)、大麻二酚酸(CBDA)、四氢大麻酚酸(THCA)、四氢次大麻酚酸(THCVA)、大麻萜酚酸(CBGA),9种大麻酚标准品均来自于阿尔塔公司(天津).质谱级甲酸(赛默飞,美国),质谱级乙腈、甲醇(Fisher),乙酸铵,色谱级正己烷.QuEChERS净化管(Waters公司):含150 mg N-丙基乙二胺(PSA)和900 mg无水硫酸镁.工业大麻样品:工业大麻的花、叶、茎秆和种子均来自于黑龙江省.

1.2 标准溶液配制

精密称取THC、CBD、CBG、CBN、THC-D3、CBDA、THCA、THCVA、CBGA标准品溶液,用甲醇分别稀释成10 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 单标储备液,置于棕色储液瓶中,-18 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻避光保存.用甲醇稀释得到浓度为0—10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准工作液,内标物THC-D3浓度为5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.3 前处理方法

将工业大麻样品在55 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥12 h后进行研磨,研磨后称取样品1.0 g(精确到0.01 g)于50 mL离心管中,准确加入50 μL 内标中间液THC-D3,10 mL无水乙醇,涡旋混合5 min后,超声处理30 min,10000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,提取上清液5 mL待净化.

将5 mL提取液置于装有N-丙基乙二胺(PSA)填料150 mg、无水硫酸镁900 mg的净化管中,用手剧烈震荡提取1 min,10000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,取上清液1 mL过0.22 μm 有机系滤膜过滤,供UPLC-MS/MS测定.

1.4 分析条件

色谱条件:Luna Omega 1.6 μm Polar C18(100 mm \times 2.1 mm)色谱柱,柱温40 $^{\circ}\text{C}$;流速0.25 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积5 μL .流动相A:5 mmol乙酸铵;流动相B:乙腈.洗脱梯度:0—0.5 min,50%B;0.5—0.8 min,50%—10%B;0.8—4 min,10%B;4.0—4.1 min,10%—50%B;4.1—5.0 min,50%B.

质谱条件:电喷雾负离子模式(ESI $^{-}$);毛细管电压2.5 kV;锥孔电压65 V;脱溶剂气温度150 $^{\circ}\text{C}$;源温度150 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气流量500 L $\cdot\text{h}^{-1}$;气帘气流量50 L $\cdot\text{h}^{-1}$.8种大麻酚及内标物采集方式进行分段采集,0—2.2 min检测采集THCVA、CBDA、THCA、CBGA;2.2—5 min检测采集CBN、THC、CBD、CBG、THC-D3.8种大麻酚及内标物MRM检测参数信息见表1.

表1 8种大麻酚及内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of 8 cannabinol and one internal standard

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
THCVA	329.30	217.20*, 285.20	-35	-30	1.37
CBDA	357.20	107.00*, 339.20	-40	-25	1.82
THCA	357.30	245.10*, 313.20	-25	-30	1.67
CBGA	359.40	315.40*, 341.30	-50	-20	1.59
CBN	309.30	222.00*, 279.20	-20	-45	3.01
THC	313.26	191.20*, 245.10	-65	-25	3.27
CBD	313.34	179.10*, 245.10	-55	-20	2.64
CBG	315.30	136.03*, 191.08	-60	-25	2.57
THC-D3	316.20	194.10*, 248.10	-70	-28	3.26

*表示定量离子对

2 结果与讨论

2.1 方法优化

2.1.1 样品前处理方法优化

提取液选择乙腈、无水乙醇、乙酸乙酯、正己烷进行比较。由于大麻酚的化学极性相对较强,无水乙醇和乙腈极性强于乙酸乙酯和正己烷,但由于乙腈经济成本较无水乙醇高,综合考虑选用无水乙醇作为提取溶剂。比较了震荡和超声提取方式,超声 30 min 时,大麻酚提取效率最高,因此,提取方式选择超声 30 min。

2.1.2 色谱柱的选择

比较了 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm (2.1 mm \times 50 mm)、Waters Atantis™ T3 3 μm (2.1 mm \times 50 mm)和飞诺美 Luna Omega 1.6 μm Polar C18(100 mm \times 2.1 mm)。Waters C18 色谱柱对于酸性类大麻酚响应值较好(CBDA、CBGA、THCA、THCVA),但其他大麻酚响应值较低(CBD、CBN、THC、THC-D3),CBG 未有响应。Waters Atantis™ T3 色谱柱可以较好的分离 9 种大麻酚,但 THC-D3 响应值较低。飞诺美 Luna Omega 1.6 μm Polar C18 色谱柱能够全部分离出 9 种大麻酚,且响应值较高,因此色谱柱选择飞诺美 Luna Omega 1.6 μm Polar C18。

2.1.3 流动相优化

流动相比对了乙腈-5 mmol 乙酸铵、乙腈-水、甲醇-水和甲醇-5 mmol 乙酸铵,结果发现,乙腈-水带羧基团的大麻酚峰展宽,峰型拖尾;甲醇-水带羧基团的灵敏度提高,但其他大麻酚灵敏度下降;甲醇-0.5 mmol 乙酸铵所有大麻酚灵敏度整体下降,综合考虑响应值,选取乙腈-0.5 mmol 乙酸铵。

2.2 净化方法的确定

工业大麻样品基质复杂,其中含有较多的叶绿素、糖类和脂类。提取液中干扰杂质较多,因此需要对提取液进行净化。选用了 C18、HLB、Carb-NH₂ SPE 和 QuEChERS 四种净化方式,C18 对于烃类、油脂吸附效果较为明显,对于复杂基质净化效果一般。HLB 能够对油脂、蛋白、磷脂有较好的吸附效果,但对于颜色较深的色素复杂基质效果一般。Carb-NH₂ SPE 和 QuEChERS 两种净化方法能够取得较好的回收率,对于色素、糖类等较好的吸附效果,但 Carb-NH₂ SPE 需要活化、淋洗固相萃取柱等前处理过程,样品处理时间较长,因此选择 QuEChERS 净化方式。

2.3 标准曲线与检出限

配制 8 种大麻酚质量浓度分别为 0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列混合标准液,进样体积 5 μL ,5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ THC-D3 为内标物。以 8 种大麻酚与 THC-D3 的质量浓度比为横坐标,8 种大麻酚与 THC-D3 的色谱峰面积的比作为纵坐标建立标准曲线。以 3 倍信噪比(S/N)和 10 倍信噪比(S/N)计算检出限(LOD)及定量限(LOQ),结果表明,8 种大麻酚在线性范围 0—10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 均有良好的线性关系,相关系数(R^2)均大于 0.999(表 2)。

表 2 8 种大麻酚线性范围、检出限、定量限和相关系数

Table 2 Linear equations, linear ranges, LODs, LOQs and correlation coefficients of eight cannabinol

化合物	检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	相关系数
THCVA	0.02	0.08	0.9995
THCA	0.02	0.08	0.9997
THC	0.10	0.30	0.9990
CBG	0.15	0.50	0.9998
CBGA	0.02	0.08	0.9998
CBN	0.07	0.25	0.9996
CBD	0.13	0.43	0.9993
CBDA	0.13	0.42	0.9994

2.4 方法的回收率及精密度

对已知 8 种大麻酚含量的工业大麻样品中添加标准物质浓度为 1 倍定量限、5 倍定量限、10 倍定量限的标准溶液中间液,按照 1.3 节前处理过程进行加标回收实验,每个样品分为花叶、茎秆、种子做 6 次水平。扣除样品本底值得到每种大麻酚回收率及相对标准偏差,如表 3 所示,其中 THCVA 的平均回收率为 92.4%—102.3%,精密密度为 1.3%—3.5%。THCA 的平均回收率为 91.7%—103.3%,精密密度为 0.9%—3.9%。THC 的平均回收率为 92.1%—100.2%,精密密度为 1.1%—4.1%。CBG 的平均回收率为 91.0%—104.9%,精密密度为 1.9%—3.5%。CBGA 的平均回收率为 90.6%—98.5%,精密密度为 1.8%—4.0%。CBN 的平均回收率为 93.4%—98.6%,精密密度为 1.1%—3.7%。CBD 的平均回收率为 91.1%—104.7%,精密密度为 1.4%—3.1%。CBDA 的平均回收率为 89.9%—98.5%,精密密度为 0.9%—4.1%。结果表明方法精密密度良好。

2.5 实际样品检测

采用本方法对同一产地的 6 个不同地块的工业大麻样品进行检测,其中 CBDA 含量为 3.1422%—4.5512%,CBD 含量为 0.0474%—0.1053%,THC 含量为 0.0021%—0.0067%,THCA 含量为 0.0838%—0.1243%,CBG 含量为 0.0067%—0.0112%,CBGA 含量为 0.0923%—0.1783%,CBN 含量为 0.0014%—0.0043%,THCVA 含量为 0.0072%—0.0212%,其中 THC 含量 $<$ 0.3%,符合工业大麻 THC 含量标准。

表 3 8 种大麻酚在花叶、茎秆、种子种的平均回收率和相对标准偏差

Table 3 Average recoveries and relative standard deviations of eight cannabinol in Mosaic, stem and seed (RSD, n=6)

化合物	添加量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	花、叶		茎秆		种子	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
THCVA	0.1	96.8	3.1	102.3	2.1	97.8	3.2
	0.5	92.4	2.9	95.6	3.5	96.4	1.3
	1.0	95.4	2.4	93.4	3.1	95.3	2.1
THCA	0.1	93.3	2.6	96.1	1.4	93.9	3.9
	0.5	91.9	1.9	98.2	0.9	92.0	2.9
	1.0	103.3	2.3	93.7	2.0	91.7	2.6
THC	0.5	98.3	2.2	97.7	1.8	94.6	3.3
	2.5	97.7	1.9	96.3	2.1	97.3	4.1
	5.0	100.2	1.1	99.6	1.7	92.1	2.6
CBG	0.5	96.8	2.7	99.6	2.0	91.4	2.1
	2.5	97.0	3.5	94.7	3.1	97.4	2.4
	5.0	94.3	2.9	104.9	2.8	91.0	1.9
CBGA	0.1	92.2	3.7	98.5	2.4	92.4	1.8
	0.5	93.3	4.0	92.4	3.1	90.6	3.4
	1.0	91.9	2.9	93.6	2.9	92.0	2.5
CBN	0.1	95.1	3.1	95.6	3.7	98.3	2.7
	0.5	98.6	2.2	93.4	2.6	94.4	1.9
	1.0	93.8	2.7	94.1	2.4	94.1	1.1
CBD	0.5	99.1	2.3	93.5	2.7	92.4	3.0
	2.5	104.7	1.9	94.3	3.1	91.1	2.1
	5.0	102.2	1.4	99.1	1.8	91.9	1.6
CBDA	0.5	89.9	4.1	91.5	2.9	94.4	0.9
	2.5	93.4	3.4	93.2	3.1	98.5	3.1
	5.0	92.1	3.0	94.1	2.2	91.2	1.8

3 结论

本文建立了一种超高效液相色谱-三重四级杆质谱法同时检测工业大麻样品中四氢大麻酚、大麻二酚、大麻萜酚、大麻酚、大麻二酚酸、四氢大麻酚酸、四氢次大麻酚酸、大麻萜酚酸的检测方法,检测时长仅为 5 min. 该方法具有检测大麻酚种类多、检测时间短,能够准确的对大麻酚进行定性、定量的优点. 对于方法学考察研究具有良好的准确性、精密度和稳定性,为我国工业大麻的研究提供了有力的技术支撑.

参考文献 (References)

- [1] CIOLINO L A, RANIERI T L, TAYLOR A M. Commercial cannabis consumer products part 1: GC-MS qualitative analysis of cannabis cannabinoids [J]. *Forensic science international*, 2018, 289: 429-437.
- [2] BARANAUSKAITE J, MARKSA M, IVANAUSKAS L, et al. Development of extraction technique and GC/FID method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. spp. santicha (hemp) [J]. *Phytochemical Analysis*, 2020, 31(4): 516-521.
- [3] BRIGHENTI V, PELLATI F, STEINBACH M, et al. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp) [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 143: 228-236.
- [4] CHANG C W, TUNG C W, TSAI C C, et al. Determination of cannabinoids in hemp nut products in Taiwan by HPLC - MS/MS coupled with chemometric analysis: quality evaluation and a pilot human study [J]. *Drug Testing and Analysis*, 2017, 9(6): 888-897.