

LC/UV 및 질량 선택 검출을 이용한 CBD 험프 오일 내 카나비노이드 프로파일 및 효능의 정성 및 정량 분석



저자

Mike Adams¹, Annette Roth¹,
Sue D'Antonio², Guannan Li²,
John Palmer²,
Jamie Dougherty², Anthony
Macherone^{2,3}

¹ CWC Labs, Cedar Creek, TX

² Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

³ The Johns Hopkins School
of Medicine, Baltimore, MD

개요

미국에서 기호용(recreational) 또는 의약용 마리화나(*Cannabis sativa*) 사용을 합법화하려는 최근 법안과 관련해, 소매 제품의 품질과 효능을 측정하는 분석 서비스에 대한 수요가 기하급수적으로 증가하고 있습니다. 본 응용 자료에서는 Agilent Mass Selective Detector(MSD) 단일 사중극자 시스템과 Agilent 1290 Infinity II UHPLC를 사용하여 Δ^9 -tetrahydrocannabinol 및 Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid(THCA)를 포함한 대표적인 *C. sativa*(대마) 종 카나비노이드 10가지를 분석해 전체적인 효능 측정과 품질 프로파일링을 진행하였습니다.

소개

대마초의 안전성 및 공중보건을 확보하기 위한 미연방 가이드라인은 아직 없습니다. 성인에게 의약용 또는 기호용 대마초의 사용을 합법화한 각 주에서 자체적으로 규정을 정합니다. 해당 주에서는 일반적으로 식물 *C. sativa* 또는 식물 추출 카나비노이드를 함유한 제품 내 카나비노이드 프로파일의 정량 및 특성 규명을 요구합니다. 이 시험은 이들 상품의 효능을 분석하고 품질과 안전성을 확보하는데 필수적입니다.

C. sativa 종들은 일반적으로 고농도의 향정신성 Δ^9 -tetrahydrocannabinol(THC) 함량(중량백분율)과 함께 60여 종 이상의 카나비노이드¹를 가지고 있습니다. 그러나 험프 오일 추출물과 같은 험프 제품의 경우 (환각을 일으키는) THC의 함량은 상대적으로 낮으며, cannabinol(CBN)과 cannabidiol(CBD)과 같은 카나비노이드를 높은 농도로 함유하고 있습니다. 본 연구를 위해 시중에 판매되는 험프 오일 시료를 구매해 특성을 규명했습니다. 시료는 견고하고 신뢰성 있는 자동 희석 장치를 사용해 준비하였습니다. Agilent LC/MSD 단일 사증극자 기반 시스템과 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템을 사용해 CBD 오일 내 카나비노이드의 특성을 규명하고 정량 했습니다. 여기에 질량 정보를 더해 카나비노이드에 대한 확실한 확인정보를 제공했습니다. 또한 질량 분석 정량 결과를 질량 분석기의 Multimode 이온화원(MMI)에서 전자분무 이온화(ESI) 모드로 검출한 결과와 비교 분석하였습니다. 통계적 재현성을 입증하기 위해, 해당 시료들을 반복 분석(n=6) 하였습니다.

실험

분석 플랫폼은 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템으로, 다음을 포함하고 있습니다.

- Quaternary 펌프
- Multisampler(세척 포함)
- 다중 컬럼 온도 조절 장치
- 다이오드 어레이 검출기(DAD)

UHPLC 조건

파라미터	값
컬럼	Agilent ZORBAX Poroshell Bonus-RP 18, 3.0 × 50mm, 2.7µm
이동상	A) 고순도 HPLC grade water* B) 고순도 HPLC grade methanol C) 고순도 HPLC grade water(포름산 1mL 및 포름산 암모늄 2.2mL 혼합)
유량	1.0mL/분
분석 시간	6.25분
Post run	2분
컬럼 온도	50°C 등온
주입량	0.5µL
자동시료주입기 온도	25°C
니들 세척	Flush port에서 3.5초 간, 25:25:50, H2O:IPA:MeOH
DAD	230nm

* 참고: Binary HPLC 시스템의 경우, 이동상 A를 위에서 언급한 포름산 및 포름산 암모늄 혼합 수용액으로 사용하며, 100% 메탄올을 사용한 컬럼 세척 시간이 정의되어야 합니다.

LC/MSD 조건

파라미터	값
이온화 모드	ESI 양이온
분무 가스	질소, 30psi
건조 가스	질소, 5L/분
건조 가스 온도	350°C
캐필러리 전압	70V
스캔 범위	150m/z~700m/z
SIM 이온	315.2m/z, 287.0m/z, 311.0m/z, 359.0m/z, 317.0m/z 및 361.0m/z
측정 시간(Dwell time)	70ms

표 1. HPLC 이동상 그레디언트

시간(분)	% B	% C
0	60	5
6.25	95	5

애질런트 LC/MSD 단일 사중극자 시스템은 그림 1과 같이 Multimode 이온화원(MMI)과 함께 작동했습니다.

표적 카나비노이드

표 2는 Cerilliant (Round Rock, TX)에서 미국 마약단속국 면제(DEA-exempt) 용액으로 구매한 표적 카나비노이드 용액의 목록입니다.

결과 및 토의

UV 및 DAD

모든 분석 물질은 5분 내에 크로마토그래피에서 분리되었습니다. 0.05 μ g/mL~100 μ g/mL 범위에 걸쳐 7가지 농도의 검량용액으로 검량선을 작성한 결과, 모든 표적 카나비노이드의 선형회귀계수 (R^2)는 0.999 이상이었으며(표3), 정량 한계 (LOQ)는 최저 1.0ng/mL이었습니다.

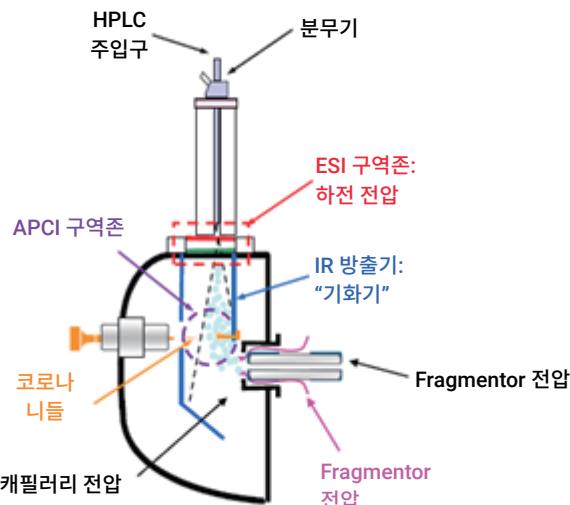


그림 1. Agilent Multimode 이온화원(MMI)은 ESI 및 APCI 모드를 동시에 작동하여 극성 및 비극성 화합물을 함께 분석할 수 있습니다. 자세한 내용은 애질런트 기술 개요 5989-2935를 참조하시기 바랍니다.

표 2. Cerilliant사의 DEA 마약단속국 면제(DEA-exempt) 표준물질

화합물
Cannabidivarin (CBDV)
Tetrahydrocannabivarin (THCV)
($-$)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)
Cannabidiol (CBD)
Cannabigerol (CBG)
Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic acid (THCA)
Cannabidiolic acid (CBDA)
Cannabinol (CBN)
Cannabigerolic acid (CBGA)
Cannabichromene (CBC)

표 3. 선형회귀계수

약어	R^2
CBDV	0.9997
THCV	0.9992
CBC	0.9998
CBG	0.9997
CBN	0.9999
CBD	0.9995
CBDA	0.9999
Δ^9 -THC	0.9999
CBGA	0.9998
THCA	0.9994

MSD 표준물질

LC/MSD에서 표준 검량 혼합물을 분석한 후 OpenLAB CDS 소프트웨어로 전체 농도 범위에서 검량선을 작성했습니다. 그림 2는 10개 화합물을 포함한 혼합물의 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 보여줍니다.

각 화합물의 단일 이온 모니터링(SIM)
기록은 각기 다른 색으로 표시하였습니다.
질량 선택 검출 및 Bonus RP 컬럼의
뛰어난 크로마토그래피 분리 성능으로 각
분석물질을 명확하게 식별하였습니다.

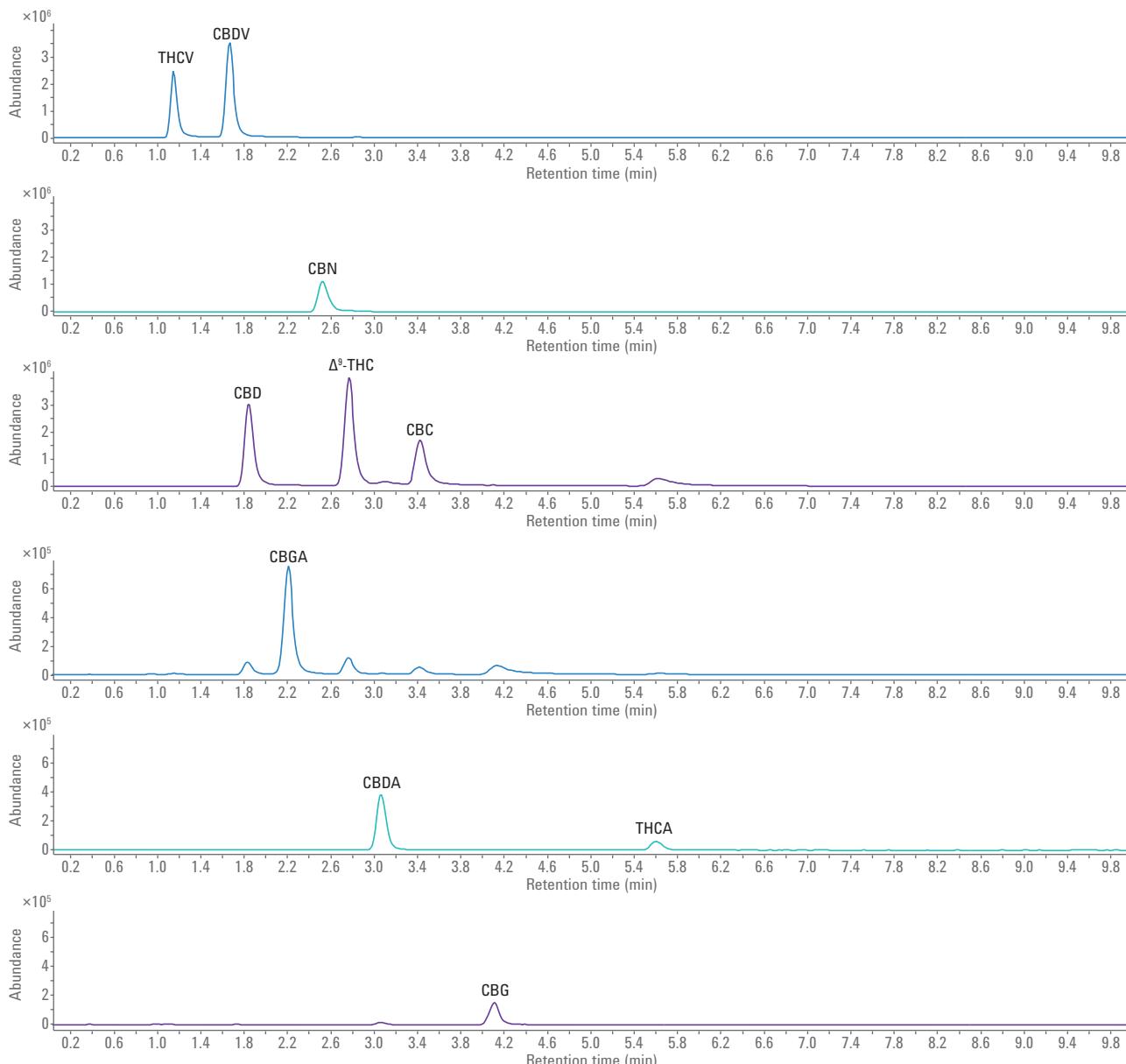


그림 2. 화합물 식별 정보를 보여주는 SIM 이온의 EIC 오버레이

그림 3에서 THC, CBD 및 CBC의 SIM 이온이 315.2 m/z에서 머무름 시간 2.779분, 1.843분 및 3.427분을 가지며 각각 추출되었습니다. Δ^8 -THC의 315.2 m/z SIM 이온 또한 3.099분의 머무름 시간에서 나타났습니다. Δ^8 -THC의 알려진 참조 표준용액으로부터 표준 검량선을 만들고 이 화합물을 표적 목록에 첨부하여 표 2에 나열된 10가지 카나비노이드 모두를 위한 분석법을 만들었습니다. 게다가, Δ^8 -THC의 스펙트럼 및 머무름 시간 정보를 카나비노이드 스펙트럼 라이브러리에 추가했습니다. 스펙트럼 라이브러리에서 미지 시료를 검색 및 식별할 수 있습니다.

헴프 오일 추출물의 MSD 연구

천연 헴프를 바탕시료로, 시판되는 6가지 헴프 오일 유래의 CBD 제품을 분석하였습니다. 표 4는 이들의 분석 결과를 나타냅니다. 시판되는 모든 제품에서 CBD는 제품 표시사항과 일치하는 수준으로 검출되었으며, THC 농도는 헴프 오일 유래의 제품에 대해 예상했던 바와 같이 매우

낮았습니다. CBDA 또한 시료 1 ~ 6에서 검출되었으며, 그 중 CBD는 적정 수준으로 검출되었습니다. CBDA는 자연적으로 발생하는 카르복실화된 CBD 전구체로, 건조, 가열, 또는 여타 처리 조건에 따라 쉽게 탈카르복실화됩니다. CBG는 또한 시료 1과 2에서 검출되었습니다.

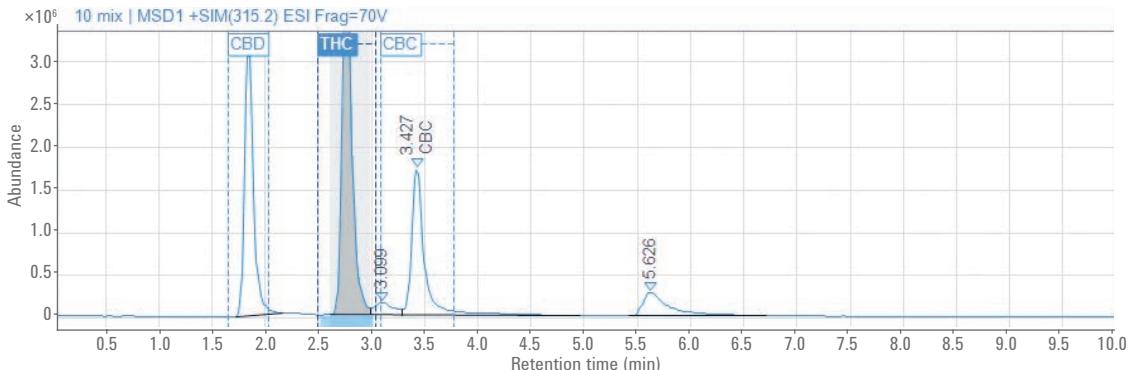


그림 3. CBD, Δ^9 -THC 및 CBC로 구성된 표준 혼합물의 SIM EIC Δ^8 -THC는 3.099분에 관찰됨

표 4. 헴프 오일 제품 시험 결과(단위: mg/mL)

시료	CBD	CBN	Δ^8 -THC	Δ^9 -THC	CBC	CBDV	CBDA	THCA	THCV	CBG	CBN
헴프	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1	25.0	n. d.	n. d.	0.06	n. d.	n. d.	1.5	n. d.	n. d.	6.0	n. d.
2	24.9	n. d.	n. d.	0.06	n. d.	n. d.	1.5	n. d.	n. d.	5.0	n. d.
3	16.0	n. d.	n. d.	0.12	n. d.	n. d.	3.0	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
4	8.0	n. d.	n. d.	0.04	n. d.	n. d.	4.0	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
5	8.0	n. d.	n. d.	0.04	n. d.	n. d.	4.0	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
6	17.0	n. d.	n. d.	0.07	n. d.	n. d.	2.7	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

결론

본 응용 자료는 Agilent OpenLAB CDS 소프트웨어, Agilent InfinityLab LC/MSD 시스템과 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 를 사용한 분석법을 기술합니다. 이 플랫폼은 대마초와 카나비노이드 함유 제품에서 가장 일반적으로 분석되는 10가지 카나비노이드를 신뢰성 있고 안정적으로 식별하고 정량합니다. LC/MSD를 사용한 질량 선택 검출 및 Agilent Bonus RP 컬럼의 뛰어난 크로마토그래피 재현성이 더해져 LC/UV만을 사용한 광학적 검출보다 뛰어난 표적 카나비노이드 식별 능력과 신뢰성 있는 분석 결과를 제공합니다. 이 분석법은 효능, 안전성 및 품질의 확인을 위한 견고한 도구로서, 시판되는 CBD 오일 내 카나비노이드의 특성을 간단하게 규명하고 정량합니다.

참고 문헌

1. Huestis, M. A. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chem. Biodivers.* **2007**, 4, 8, 1770-1804.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하실 수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 2월 6일, 한국에서 인쇄
5991-8313KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

