

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 脂质去除产品和 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统简单、准确地定量掺入大麻的巧克力食品中的 THC 和 CBD

作者

Christophe Deckers 和
Jean-François Roy
安捷伦科技有限公司

摘要

准确测量高脂肪含量样品（如巧克力、布朗尼和饼干）中的 $\Delta 9$ -四氢大麻酚 ($\Delta 9$ -THC) 和大麻二酚 (CBD) 是满足不断变化的大麻监管环境（包括在法律允许食用的司法管辖区内用于产品标签、安全和法医目的）的一项重要检测需求。巧克力是一种复杂基质，富含蛋白质、脂肪和可可，因此其分析较为困难。本应用简报将展示一种研磨巧克力、萃取大麻素并利用 LC/UV 对其进行定量的简单优化流程，并将着重介绍简单的样品前处理和极低的单个样品分析成本。数据显示目标分析物在多天内的准确度、精度和线性响应。使用独特的 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤技术，制得清洁的样品。本方法为掺入大麻的牛奶巧克力、黑巧克力和白巧克力的效价测试提供了出色的稳定性、更高的灵敏度和准确度。

主要优势

- 快速样品前处理，提高样品通量
- 经优化的样品净化流程，过滤步骤简单、高效
- 准确、精密的 THC 和 CBD 定量
- 减少 HPLC 维护，提高实验室效率

前言

为满足已制定或不断变化的监管要求，对食品中大麻素的检测需求不断增加。不同国家/地区和州的监管要求有很大差异。每种食品类型都存在与其独特的物理一致性相关的特定挑战，此外它们的不同成分还会对分析仪器产生影响。因此，需要更加稳定可靠的流程来定量分析食品（如巧克力、布朗尼、饼干、糖果和饮料）中的 $\Delta 9$ -THC 和 CBD 等大麻素^[1,2,3]。这种定量分析流程的准确度对于法律考虑因素、安全原因和确保市售产品的适当标签至关重要。Vandrey 等人 (2015) 发现，仅 17% 的食用产品如实标注了 $\Delta 9$ -THC 浓度，而 23% 的食用产品标注过低，60% 的标注过高^[4]。

巧克力分析为何存在挑战？

效价测试通常由配备 UV 检测器的 HPLC 执行，在某些情况下由 LC/MS 或 LC/MS/MS 执行。样品前处理不受分析平台的影响，是准确测定大麻素的关键。如果进样前食品基质未从样品中充分去除，HPLC 系统的背压可能会增加，可能会产生额外的维护和仪器停机时间。色谱柱也可能会更快堵塞，最重要的是，THC 和 CBD 定量分析的准确度可能会随时间变化。

巧克力是一种具有挑战性的待分析食品，因为它的粘性很高，富含脂肪 (30%–40%)、糖 (60%)、蛋白质 (10%) 和类黄酮^[5]。正如文献中记载的那样，这种高含量的基质干扰物会大大降低使用 LC/UV 进行效价测试的准确度和精度^[6]。更具体

地说，脂肪占巧克力干重的 30%–40%，脂肪的存在会直接影响大麻素在适用于 HPLC 分析的溶剂中的溶解度。如果未在进样前充分去除脂肪，THC 和 CBD 可能会与这些脂质结合并发生沉淀。因此，巧克力样品中脂质去除不当和不充分会导致大麻素定量分析不准确^[6]。此外，脂肪还会增加 HPLC 系统的维护，因为它们很容易堵塞反相液相色谱柱，需要更长的液相色谱梯度，才能用有机溶剂彻底冲洗干净色谱柱。额外的运行时间会降低实验室分析效率，并需要额外的流动相，从而增加了环境和废物处理成本。

导致巧克力中大麻素定量分析不佳的另一个原因是，可可中含有丰富的类黄酮，如儿茶素、表儿茶素和没食子儿茶素。这些类黄酮占可可粉干重的 8%，并可通过非共价相互作用与平面芳香大麻素（如大麻酚 (CBN)）相互作用，从而降低 HPLC 上的紫外信号^[6]。因此，为了对掺入大麻的巧克力进行准确的效价测试，去除干扰物至关重要。

样品处理和均质化

在溶剂中萃取大麻素之前，可以使用不同的技术来处理巧克力。其中一些技术耗时费力，需要各种实验室设备。食品样品可以通过商用搅拌机进行机械研磨，也可以通过研钵和研杵将其压碎。这两种方法都不是处理巧克力的理想选择，因为巧克力具有很高的粘性，并且在处理过程中会部分融化。另外，可以将巧克力融化，或者在溶剂萃取之前将其冷冻。冷冻后，巧克力更容易研磨，低温可减少样品降解。如

果未优化样品处理，通常需要长时间超声处理才能确保从巧克力中完全萃取大麻素。针对这些技术，样品通量可能具有挑战性，因为搅拌机、研钵和超声处理设备通常每小时只能处理少量样品，并需要针对每种样品进行清洁。

从食品中回收大麻素的萃取技术

细磨处理巧克力后，可以使用不同的萃取技术来捕获 THC 和 CBD，同时尽可能多地去除干扰物。快速、简便、经济、高效、稳定和安全 (QuEChERS) 技术广泛应用于处理食品样品^[7]。该技术采用两步法，第一步萃取步骤基于使用盐的水分配，第二步基于分散式 SPE (dSPE) 方法去除更多基质组分。然而，对于巧克力和其他富含脂肪的食品，如布朗尼和饼干，不适合使用 QuEChERS，因为大麻素和脂肪都是疏水性的；因此，在水分配步骤后无法去除脂肪。遗憾的是，与非质子溶剂（如乙腈）相比，水也会捕获来自可可的干扰物，如本应用简报所示。此外，QuEChERS 去除了极性干扰物（如糖和盐），但它们通常不会保留在反相色谱中，也不会干扰大麻素，大麻素将很好地保留在 C18 色谱柱上。此外，QuEChERS 第二步中使用的分散剂特异性和容量不足，无法完全捕获巧克力中存在的脂质质量。QuEChERS 分散剂试剂盒可能含有 150–400 mg C18，可以捕获脂质，这对于脂肪含量最高的食品而言，明显不足。不幸的是，分散剂也会捕获大麻素。出于这些原因，QuEChERS 不适用于富含脂质的食品（如巧克力、布朗尼和饼干）的

效价测试，但这种技术适用于硬糖和软糖等其他基质。

作为 QuEChERS 的替代技术，可以在溶剂中萃取巧克力样品并将其放入冰箱中以沉淀脂质。这种温度诱导的脂质沉淀（也称为冬化）具有时间和温度依赖性。通常，样品需要在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置几个小时以进行冬化，才能表现出一定的效率。然而，在某些情况下，脂肪含量需要极低的温度 ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) 和过夜才能使冬化发挥作用。此外，冬化还会降低大麻素的溶解度，可能会导致在测试效价时，回收率、灵敏度和准确度出现巨大损失。

Agilent Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) 是一种独特的吸附剂，可通过体积排阻和化学键合选择性地去除复杂基质和具有挑战性的高脂肪样品中的脂质，同时将目标分析物留在溶液中^{8,9}。如果是大麻食品，EMR 将去除大量脂质，而不会捕获大麻素。Captiva EMR-Lipid 过滤中采用 EMR 以小柱形式装填在两个筛板之间的吸附剂。在使用乙腈萃取的巧克力中添加 20% 水可以充分沉淀蛋白质并处理样品，以便在 Captiva EMR-Lipid 柱上轻松过滤。在一个简单的步骤中，可以捕获蛋白质和脂质，而不会损失任何大麻素。EMR 技术针对脂质的这种特异性首次能够去除几乎 100% 的脂肪，而不会在此过程中损失 THC 和 CBD¹⁰。

总而言之，巧克力的效价测试使实验室面临着不小的挑战，因为其处理过程耗时费力，有大量样品时更是如此。巧克力的特定挑战可归因于存在脂肪和可可基质。除了导致分析柱和系统的维护问题外，脂肪

还会直接干扰大麻素的检测。可可中的黄酮类化合物也是有文件记录的干扰源。

QuEChERS 萃取并不是巧克力中大麻素的最佳萃取方法，因为巧克力含有明显更脏的基质，会干扰检测且需要更多仪器维护。溶剂萃取后进行冬化也不是脂肪食品效价测试的最佳选择，因为它非常耗时，并且大麻素的紫外线信号较低，会对准确度带来不利影响。本文开发的改进流程简化了样品前处理，以最低的成本处理大量巧克力样品，更重要的是，具有极高的准确度和精度。

实验部分

材料和试剂

- 50 mL 聚丙烯 (PP) 离心管 (VWR 货号 89039-660)
- 15 mL 聚丙烯 (PP) 离心管 (VWR 货号 89039-668)
- 安捷伦陶瓷均质子 (货号 5982-9313)
- Agilent InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈 (货号 5191-4496)
- Agilent InfinityLab 超纯 LC/MS 水 (货号 5191-4498)
- Agilent InfinityLab 超纯 LC/MS 甲醇 (货号 5191-4497)
- Agilent Captiva EMR-Lipid, 3 mL (货号 5190-1003)
- 安捷伦螺口样品瓶 (货号 5182-0553)
- 安捷伦甲酸 (货号 G2453-85060)
- THC 有证标准物质, 1.0 mg/mL 甲醇溶液

- CBD 有证标准物质, 1.0 mg/mL 甲醇溶液

自开发本应用以来，安捷伦已推出了大麻素有证标准物质。这些有证标准物质可用于代替本文使用的标准品。

- 大麻素混合物 A — CBD、CBN 和 Δ^9 -THC, 各 1.0 mg/mL (货号 5190-9430)
- 大麻素混合物 B — THCA、CBDA 和 CBG, 各 1.0 mg/mL (货号 5190-9429)
- 大麻素混合物 C — CBDV、CBGA 和 CBC, 各 1.0 mg/mL (货号 5190-9428)
- 大麻素混合物 D — THCV 和 Δ^8 -THC, 各 1.0 mg/mL (货号 5190-9427)

实验室设备

- 安捷伦正压 (PPM) 48 孔处理装置 (货号 5191-4101) (可选, 用于提高通量)
- 安捷伦 3 mL 柱架 (货号 5191-4103)
- 用于安捷伦 PPM-48 的废液支架 (货号 5191-4112)
- 自动化机械均质机 (SPEX SamplePrep Geno/Grinder 1600 MiniG 或同等产品)
- Eppendorf 5804 R 离心机, 带 50 mL 管线转接头
- 剪刀
- 分析天平
- 迷你涡旋仪

仪器条件

HPLC 条件

在本研究中，我们实施了如下所述的安捷伦标准效价分析方法^[1]。

参数	值															
液相色谱模块	Agilent 1260 Infinity II Prime 泵 (G7104C)															
	配备样品盘冷却选件的 Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129C)															
	Agilent InfinityLab 集成式柱温箱 (G7130A)															
	Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR															
MS	Agilent 6545 LC/Q-TOF															
运行时间	9.5 min															
后运行时间	1.5 min															
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 μm															
保护柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 5 mm, 2.7 μm															
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液															
流动相 B	0.05% 甲酸的甲醇溶液															
进样量	5 μL															
Multisampler 温度	20 °C															
柱温	50 °C															
检测	230 nm 处的紫外光，针对所有定量结果															
流速	1 mL/min															
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%A</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>40</td><td>60</td></tr><tr><td>1</td><td>40</td><td>60</td></tr><tr><td>7</td><td>23</td><td>77</td></tr><tr><td>8.2</td><td>5</td><td>95</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%A	%B	0	40	60	1	40	60	7	23	77	8.2	5	95
时间 (min)	%A	%B														
0	40	60														
1	40	60														
7	23	77														
8.2	5	95														
进样针清洗	用 25:25:50 异丙醇:乙腈:甲醇在冲洗口冲洗 3 秒															

质谱条件

参数	值
MS	Agilent 6545 LC/Q-TOF*
采集模式	TOF 扫描, 40 张谱图/秒, m/z 范围为 100–1700
离子源	安捷伦喷射流 ESI
干燥气流速	12 L/min
鞘气温度	350 °C
雾化器压力	40 psi
干燥气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
极性	正离子
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	135 V

* 本研究使用飞行时间 (TOF) 质谱作为定性工具，以评估不同样品前处理流程产生的基质电荷

样品处理和大麻素萃取

掺入大麻的巧克力样品

1. 使用分析天平称量与标示量相关的掺入大麻的巧克力（条状、方形、小块等），并记录数值
2. 用剪刀将巧克力剪成小块或薄片（图 1）；取 1 ± 0.005 g 转移至 50 mL PP 离心管中
3. 向离心管中加入两粒陶瓷均质子，以确保完全、快速均质化；盖上盖子
4. 将离心管放入 -20 °C 的冰箱中冷冻 20 分钟
5. 加入 10 mL 含有 2% 甲酸的冷乙腈（之前已放入 -20 °C 冰箱中）
6. 将试管放在自动化机械均质机上进行剧烈垂直振荡 (1500 rpm) 5 分钟。巧克力应该被完全溶解并混匀
7. 在室温 (20 °C) 下，以 3600–5000 rpm 的转速将离心管离心 5 分钟

8. 将 2 mL 上清液转移至 15 mL PP 离心管中
9. 加入 500 μL Nanopure (1 级) 水，盖上盖子并简单涡旋混合
10. 将 3 mL 柱架（货号 5191-4101）放置在废液架（货号 5191-4112）上方
11. 将 3 mL Captiva EMR-Lipid 净化管置于柱架上，将洁净的 15 mL PP 离心管置于废液架上 EMR 净化管正下方位置处
12. 将步骤 8 中的所有内容物 (2.5 mL) 倒入 3 mL Captiva EMR-Lipid 净化管中。使其通过重力作用流动
13. 初始的 2.5 mL 洗脱完成后，将另外 1.5 mL (4:1 乙腈:Nanopure 水) 溶液加入 Captiva EMR-Lipid 净化管中，同样使其通过重力作用流动
14. 不要忘记将收集管涡旋混合，转移到样品瓶中，并盖上盖子

注：或者，采用重力自流并使 EMR 净化速度提高 4 倍，将上面的 2 个架子和 Captiva EMR-Lipid 净化管放在安捷伦 PPM-48 处理装置（货号 5191-4101）中，压力为 1 psi，流速控制在每 3 到 5 秒最多 1 滴（参见“实验室设备”部分的注释）。

注：含有坚果和水果的非均质烘焙食品和巧克力需要在萃取前完全均质化，以获得具有代表性的样品，并获得完全均质化的乙腈萃取物。为此，在上述流程的第 2 步称量之前，需要在搅拌机/低温研磨机或自动化机械均质机中处理所有这些样品。

用于基质匹配校准品的非掺入巧克力样品

按照上一节中描述的流程进行操作，确保准备足够的基质匹配校准品所需的巧克力基质（非掺入牛奶，深色或白色），方法是在第 8 步至少上样两个 15 mL PP 离心管和 2 mL 等分试样的上清液，然后按照第 9 步及后续步骤的建议处理每个离心管。最后，务必将两种洗脱液合并，并在一个 15 mL PP 离心管中涡旋混合。表 1 显示了用于配制校准品的连续稀释。

结果与讨论

为了获得理想的样品处理和萃取条件，本文测试了几种条件。成功的参数包括通过重量分析和 LC/Q-TOF 确定的清洁度。分析物回收率通过 LC/UV 确定。除了在 0.5–100 µg/mL 浓度范围内（相当于每克巧克力 10–2000 µg CBD 和 THC）的准确度和精度外，还测试了溶液中分析物的稳定性。

样品处理

对于样品处理，未对搅拌机和低温研磨机进行测试，因为它们一次只能处理一个样品，并需要在样品与样品之间进行清洁。此外，也没有使用融化的巧克力，以避免可能影响分析物稳定性的高温。因此，用剪刀将巧克力切碎（图 1）并将这些样品放入带有两粒陶瓷均质子的一次性聚丙烯管中以进行完全均质化更易操作。本文测试了不同的振荡时间以优化大麻素萃取。请注意，在 4 °C 下刚出库时处理巧克力样品更易操作。此外，还观察到在带有陶瓷均质子的 PP 管中于 -20 °C 下冷冻称量的样品 20 分钟，有利于避免巧克力在机械垂直振荡过程中粘附在管壁上。

表 1. 使用连续稀释法制备基质匹配校准标样

校准品水平	浓度 (µg/mL)	连续稀释液配制
6	100	100 µL CBD 标准品 + 100 µL THC 标准品 + 800 µL 巧克力基质
5	50	500 µL 校准品 6 + 500 µL 巧克力基质
4	10	200 µL 校准品 5 + 800 µL 巧克力基质
3	5	500 µL 校准品 4 + 500 µL 巧克力基质
2	1	200 µL 校准品 3 + 800 µL 巧克力基质
1	0.5	500 µL 校准品 2 + 500 µL 巧克力基质
0	0	1000 µL 巧克力基质

*在此前处理之后，校准品 2、4 和 6 的最终体积将为 500 µL。确保调整自动进样器的设置以适应此体积



图 1. 称重前用剪刀剪碎的牛奶巧克力

萃取溶剂

测试了几种萃取溶剂：乙腈、甲醇、80/20 乙腈/乙酸乙酯和 40/60 乙醇/水。虽然与乙腈相比，使用甲醇萃取 CBD 和 THC 的效率略高 (<https://blog.restek.com/medical-marijuana-solvent-extraction-efficiency-%e2%80%93-potency-determinations-with-gc-fid/>)，但是当在 MS 扫描模式下通过 LC/Q-TOF（公认为评估样品清洁度的非特异性但非常灵敏的方法）进行分析时，发现甲醇会产生“更脏的”巧克力萃取物（不利基质含量更高）。简而言之，与“干净”样

品相比，从“脏”样品中获得的 Q-TOF 总离子流图 (TIC) 具有更强的信号（更多峰，更高噪音水平）。从图 2 中可以看到，与黑色曲线（乙腈）相比，红色曲线（甲醇）显示出更高的背景噪音和一些额外的峰。随着时间的推移，进样更脏的样品将导致额外的系统维护、增加成本并降低检测实验室的盈利能力。向乙腈中添加 2% 的甲酸以改善蛋白质沉淀，并减少 THC 和 CBD 与巧克力蛋白质的结合。在一周多的时间内证实了 CBD 和 THC 在这些温和酸性条件下的稳定性。

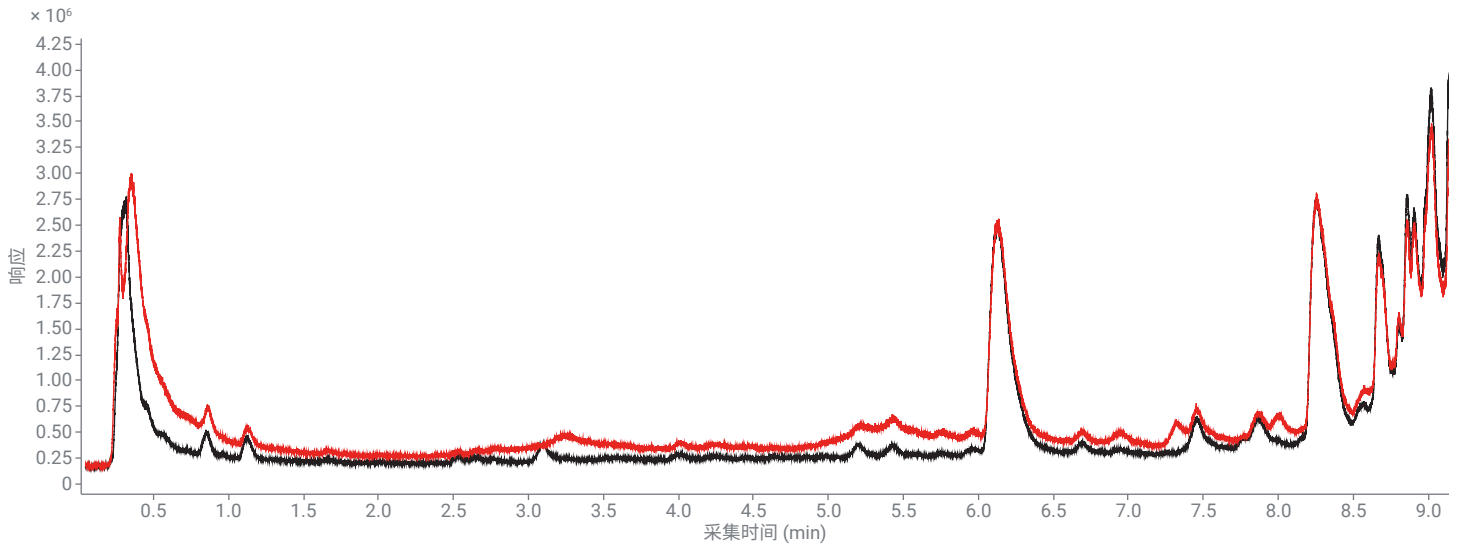


图 2. 通过 LC/Q-TOF TIC 比较添加了 CBD 和 THC 的甲醇 (红色曲线) 和乙醇 (黑色曲线) 的白巧克力萃取物

萃取物净化

多个大麻检测实验室在分析巧克力产品时，均报告了系统反压，这可能是由于脂质积累并最终堵塞反相柱造成的。这表明，这些样品需要在大麻素萃取后彻底去除脂质。本文比较了掺入 THC 的商业牛奶巧克力样品的不同净化流程，包括过滤、使用 QuEChERS 萃取盐和分散剂、冬化 ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的脂质沉淀) 以及在 Captiva EMR-Lipid 上过滤。通过所得萃取物的重量分析以及 LC/Q-TOF 分析对结果进行比较。如图 3 所示，在 Captiva EMR-Lipid 上过滤并进行冬化得到的平均残留重量相同，而未经进一步处理的简单乙醇萃取产生的残留重量最高，未经分散式固相萃取的 QuEChERS 处理为其次。在 QuEChERS 萃取中添加脂肪特异性分散剂的确有助于去除一些巧克力基质成分并降低残留重量，但达不到经 Captiva-EMR-Lipid 和冬化处理的程度 (图 4)。

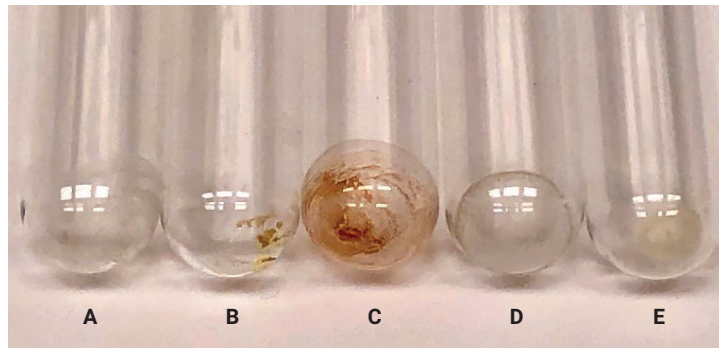


图 3. 样品前处理和干燥后的样品清洁度比较 (括号内为每次处理的残留物平均重量 ($n = 3$), 以 mg 为单位)

- (A) 乙醇萃取 + Captiva EMR-Lipid 净化 (0.4 mg)
- (B) 乙醇萃取 (未处理) (30.3 mg)
- (C) QuEChERS 萃取 (26.7 mg)
- (D) 脂肪样品的 QuEChERS 萃取 + 分散 (8.3 mg)
- (E) 乙醇萃取 + 冷稳定 (冬化流程) (0.4 mg)

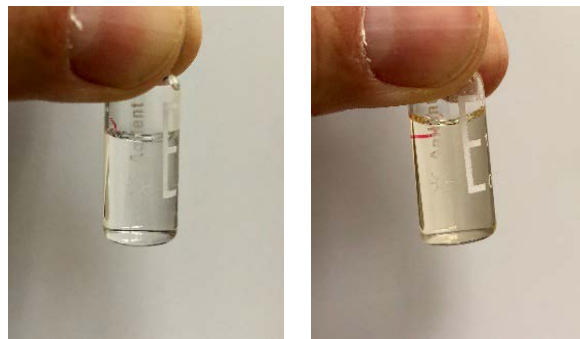


图 4. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid (左图) 和 QuEChERS (右图) 萃取的牛奶巧克力之间的直观对比

除了重量分析之外，还通过 LC/Q-TOF 对来自各种样品处理的萃取物进行了比较，以进一步进行清洁度评估。查看所得的 TIC 图，与其他净化技术相比，Captiva EMR-Lipid 萃取物的基线明显更低（图 5A 和 5B）。这种额外的清洁度在 4.5 到 6 分钟之间以及 8.5 分钟后尤为明显。此外，采用不同净化技术的 LC/UV

分析结果显示，与其他净化方法相比，使用 Captiva EMR-Lipid 净化产品时，THC 的信号明显更高（图 6）。这种 UV 信号增加可归因于使用 Captiva EMR-Lipid 过滤的出色脂质去除效果。大麻素是脂溶性的，因此，如果未有效去除脂质，则会干扰大麻素的紫外检测^[6]。QuEChERS 的特异性和容量不足以完全捕获烘焙食品和巧

克力中的脂肪。QuEChERS 分散剂只能使用 C18 从样品中去除脂质，这种方法缺乏选择性，同时还会捕获大麻素。在低温或冬化条件下，脂质沉淀的确会去大量脂质，但也会共沉淀大量大麻素，如图 5A 和 5B 所示。

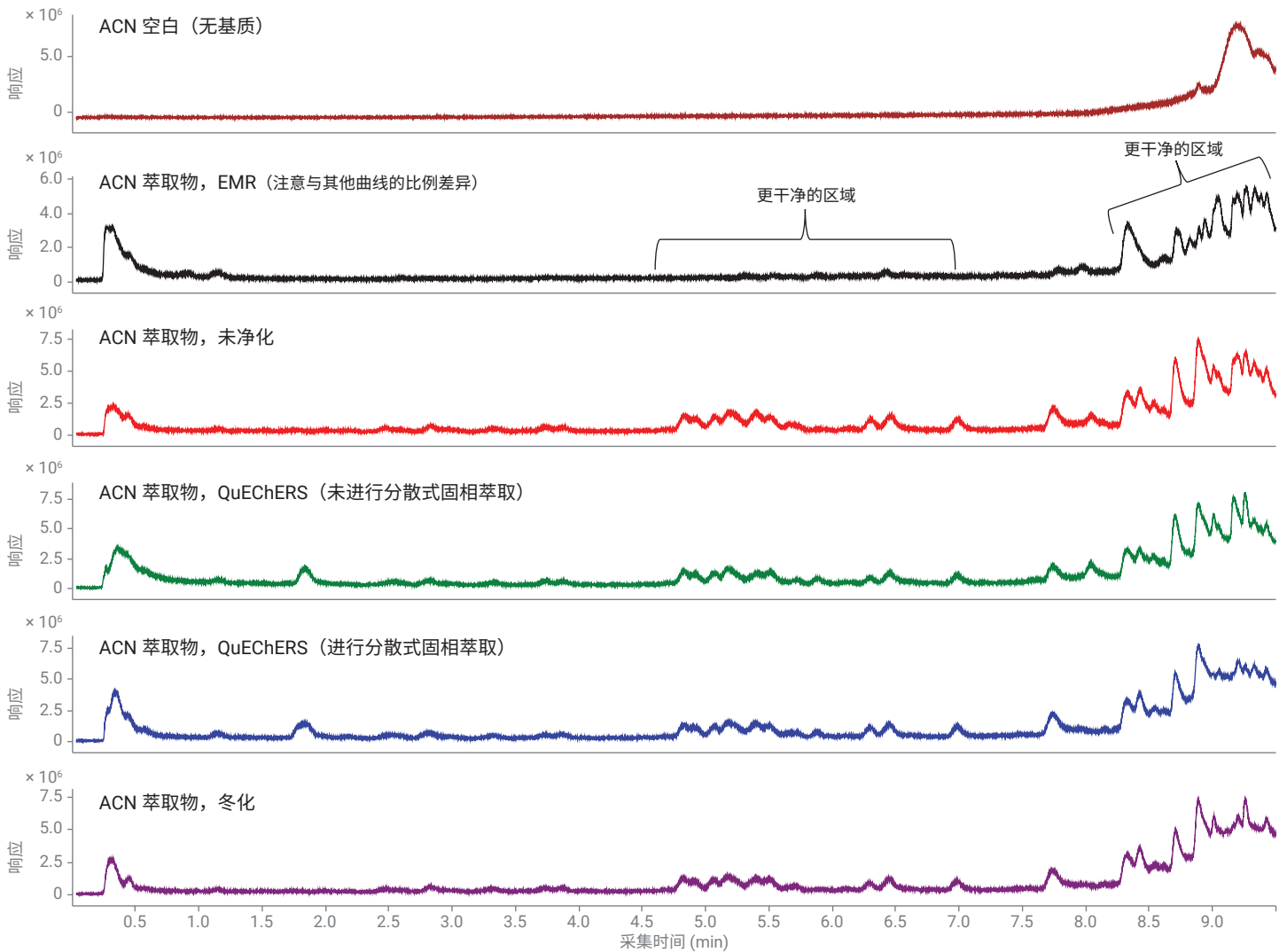


图 5A. LC/Q-TOF TIC 对比

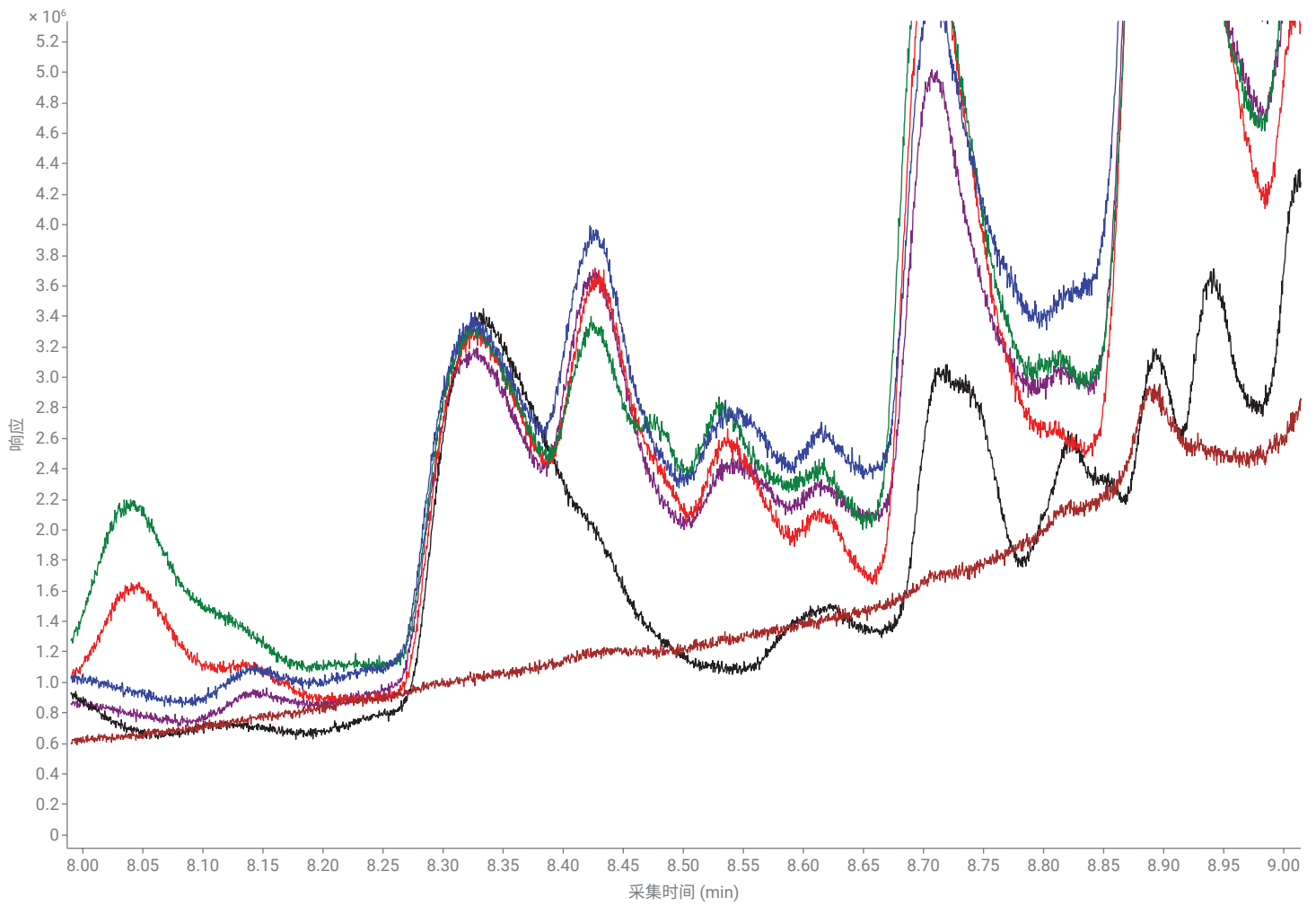


图 5B. 第 8 分钟和第 9 分钟之间的放大区域。THC 在 8.32 分钟时洗脱

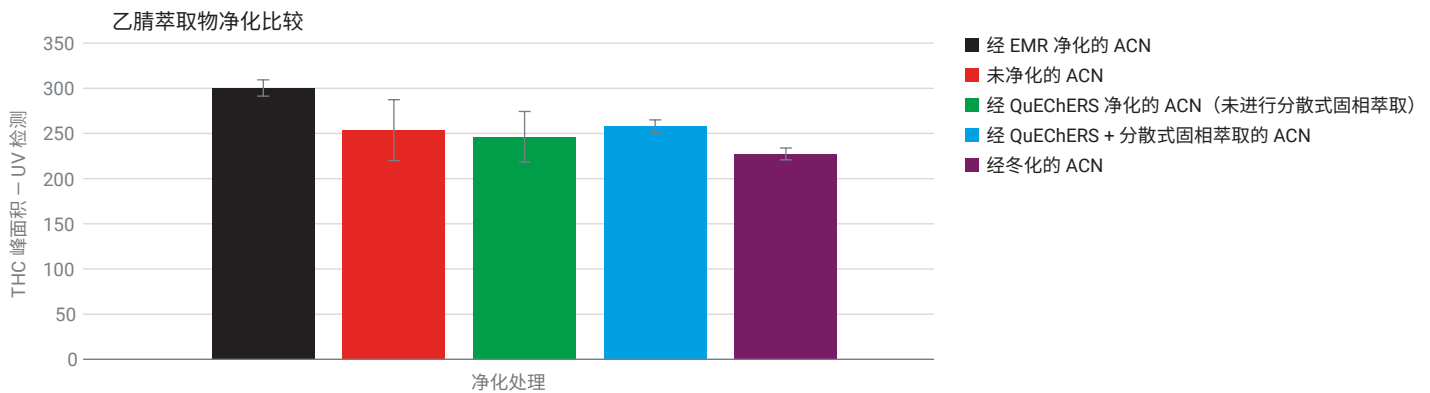


图 6. 掺入大麻的牛奶巧克力的乙腈萃取物经不同的净化处理后 THC 峰面积 (UV 信号) 对比 (每种处理方法 3 份样品, 误差线表示标准偏差)

方法性能特征

通过牛奶巧克力超过 4 天，白巧克力和黑巧克力分别超过 2 天测试优化方法（用酸化乙腈萃取 CBD 和 THC，结合在 Captiva EMR-Lipid 上过滤萃取物）的稳定性、准确度和精度（表 2、3、4）。每种大麻素的浓度范围为 0.5–100 µg/mL，重复进样三次，使用六点绘制基质匹配标准曲线（表 5 和图 7）。这些校准曲线的稳定性在 7 天内得到证实（表 6）。在萃取/过滤前后添加非掺入巧克力样品，以确定两种分析物的回收率（表 7）。最后，对市售的掺入 THC 的牛奶巧克力进行了检测，以验证定量流程的准确度（表 8）。

日内和日间准确度与精度

表 2. 牛奶巧克力

校准品 1 (0.5 µg/mL CBD, 0.5 µg/mL THC)	CBD				THC			
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
校准品 1 — 第一次前处理	114.1	106.6	103	117.4	96.3	97.8	96.7	109.8
校准品 1 — 第二次前处理	105.3	97.8	123.5	110.1	103.4	93.5	100.2	105.9
校准品 1 — 第三次前处理	106.1	101.4	108.1	108.6	97.6	101.9	92.1	106.2
日内平均准确度 (n = 3)	108.5	101.9	111.5	112.0	99.1	97.7	96.3	107.3
日间平均准确度 (n = 12)	108.5				100.1			
日间标准偏差 (n = 12)	7.1				5.4			
日间精密性 (%RSD, n = 12)	6.5				5.4			

表 3. 黑巧克力

校准品 1 (0.5 µg/mL CBD, 0.5 µg/mL THC)	CBD		THC	
	第 1 天	第 2 天	第 1 天	第 2 天
校准品 1 — 第一次前处理	105.9	112.6	109.0	96.9
校准品 1 — 第二次前处理	107.0	106.9	106.8	96.5
校准品 1 — 第三次前处理	103.8	93.7	106.4	97.4
日内平均准确度 (n = 3)	105.6	104.4	107.4	96.9
日间平均准确度 (n = 6)	105.0		102.2	
日间标准偏差 (n = 6)	6.2		5.8	
日间精密性 (%RSD, n = 6)	6.0		5.7	

表 4. 白巧克力

校准品 1 (0.5 µg/mL CBD, 0.5 µg/mL THC)	CBD		THC	
	第 1 天	第 2 天	第 1 天	第 2 天
校准品 1 — 第一次前处理	98.4	114	103.7	107.2
校准品 1 — 第二次前处理	111.9	107.8	103.5	103
校准品 1 — 第三次前处理	106.8	101.4	107.8	102.6
日内平均准确度 (n = 3)	105.7	107.7	105.0	104.3
日间平均准确度 (n = 6)	106.7		104.6	
日间标准偏差 (n = 6)	6.0		2.3	
日间精密性 (%RSD, n = 6)	5.6		2.2	

校准曲线和线性范围

表 5. 牛奶巧克力、黑巧克力和白巧克力的校准曲线平均拟合 (R^2)

名称	范围 ($\mu\text{g/mL}$)	校准品数量	曲线类型	重量	平均拟合, 牛奶巧克力 (R^2 , $n = 4$)	平均拟合, 黑巧克力 (R^2 , $n = 2$)	平均拟合, 白巧克力 (R^2 , $n = 2$)
CBD	0.5–100	6	线性	1/x	0.99962	0.99988	0.99984
THC	0.5–100	6	线性	1/x	0.99983	0.99984	0.99987

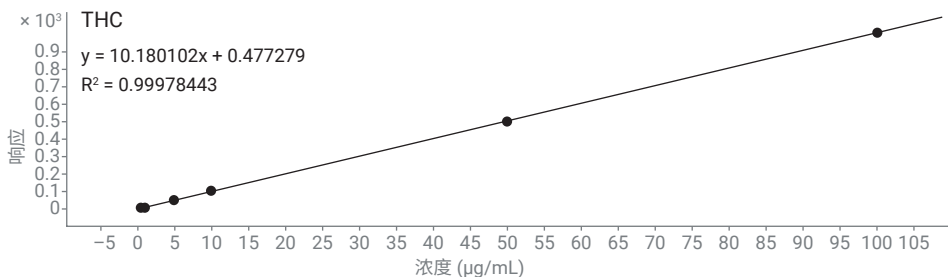
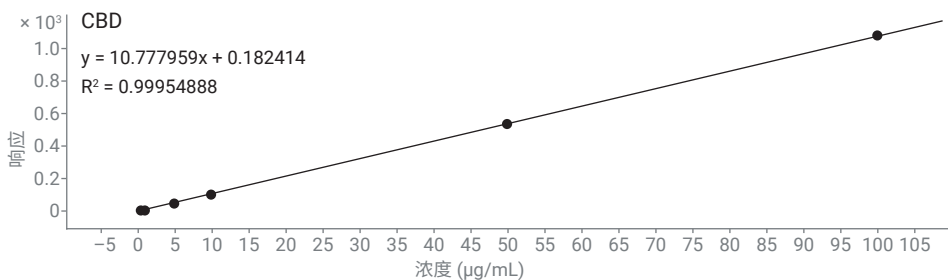


图 7. 分别针对 CBD 和 THC 的典型基质匹配校准曲线

牛奶巧克力中校准品的稳定性

表 6. CBD 和 THC 校准品的 7 天稳定性研究。校准品在 20 °C 下储存于 HPLC 样品瓶进样器中

校准品水平	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	CBD		THC	
		第 1 天的 UV 峰面积	第 7 天的 UV 峰面积	第 1 天的 UV 峰面积	第 7 天的 UV 峰面积
6	100	1025	1142	946	1060
5	50	504	582	471	537
4	10	92	109	94	103
3	5	46	54	45	49
2	1	9	11	8	9
1	0.5	4	5	4	5

回收率研究

表 7. 牛奶巧克力、黑巧克力和白巧克力中 CBD 和 THC 的回收效率和基质效应 (其中 % 回收效率 = (萃取前加标/萃取后加标) × 100, 且 % 基质效应 = (萃取后加标/溶剂加标) × 100)

	CBD			THC		
	牛奶	黑	白	牛奶	黑	白
萃取前基质加标平均峰面积 (n = 3)	292.9	294.9	298.1	257	268.8	261.2
萃取后基质加标平均峰面积 (n = 3)	274.4	275.9	275.7	246.3	245	250.4
回收率% (n = 3)	106.7	106.9	108.1	104.3	109.7	104.3
萃取后基质加标平均峰面积 (n = 3)	274.4	275.9	275.7	246.3	245	250.4
溶剂 (无基质) 加标平均峰面积 (n = 3)	277.2			255.9		
基质效应% (n = 3)	99	99.5	99.4	96.3	95.7	97.9

市售样品分析

将瓶内浓度转换为成品浓度的计算 (使用上述方案 — 如果使用不同的稀释程度, 则需要相应地修改算式)

A) 起始材料中 THC/CBD 的重量 (µg):

$$\text{瓶内浓度 (µg/mL)} \times 4/2.5 \times 2.5/2 \times 10 \text{ mL/1 g 巧克力}$$

B) 起始材料浓度: THC/CBD 重量

$$\frac{(\mu\text{g THC/CBD}) \times 1 \text{ (mg THC/CBD)}}{1000 (\mu\text{g THC/CBD}) \times \text{巧克力样品重量 (g 巧克力)}}$$

表 8. 牛奶巧克力。对市售的掺入 THC 的牛奶巧克力进行了检测, 以验证定量流程的准确度

	THC			
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
平均瓶内浓度计算值 (n = 3, µg/mL)	16.9	15.9	15.4	16.3
巧克力条重量 (g)	31.4	31.4	31.4	31.4
平均巧克力条内浓度计算值 (n = 3, mg THC/条)	10.6	9.9	9.6	10.2
标签声明 (mg THC/条)	10	10	10	10
准确度 %	105.6	99.4	96.2	102.3

结论

由于巧克力和烘焙产品 (如布朗尼和饼干) 的基质复杂性和高脂肪含量, 效价测试极具挑战性。考虑到大麻素与脂肪的亲合力, 在通过 LC/UV 分析之前去除脂质, 以便实现大麻素的可靠、准确的定量分析。与其他用于高脂含量样品的常见前处理技术相比, 本文中开发的流程能够实现最高的脂质去除率, 获得更高的 THC 和 CBD LC/UV 信号。使用较短的液相色谱梯度减少了溶剂消耗, 使用更清洁的样品, 分析柱不太可能受到脂质积累的影响。这些优化的方法参数延长了系统正常运行时间, 提高了实验室分析效率和盈利能力。因此, 使用此方法对高脂肪食品进行效价测试不仅简单、准确、可靠, 而且还能提高实验室分析效率。

免责声明

安捷伦产品和解决方案旨在帮助实验室进行大麻质量控制和安全检测（在国家/地区法律允许的情况下使用）。

致谢

非常感谢 Anthony Macherone 和 Limian Zhao 的建议和对本应用简报的审阅。感谢 Canopy Growth 和 Cannfections Group Inc. 根据其加拿大卫生部许可证相关的规定提供巧克力样品。

参考文献

1. Nurturing New Growth: Canada Gets Ready for Cannabis 2.0. Deloitte, **2019**. <https://doi.org/10.1109/RCIS.2013.6577673>
2. Barrus, D. G. *et al.* Tasty THC: Promises and Challenges of Cannabis Edibles. Methods Rep. RTI Press **2016**. doi: 10.3768/rtipress.2016.op.0035.1611
3. Soroosh, A. J. *et al.* Mitigating Potential Public Health Problems Associated with Edible Cannabis Products Through Adequate Regulation: A Landscape Analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *14*, 1–9. doi: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2020.1793099?scroll=top&needAccess=true>
4. Vandrey, R. *et al.* Cannabnoid Dose and Label Accuracy in Edible Medical Cannabis Products. *JAMA.* **2015**, *313*(24), 2491–2493
5. Leghissa, A.; Hildenbrand, Z. L.; Schug, K. A. The Imperatives and Challenges of Analyzing Cannabis Edibles. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, *28*, 18–24. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799318301930>
6. Matrix effect in chocolate: Investigation of Chocolate Matrix Interference on Cannabinoid Analytes. David D. Dawson* and Robert W. Martin <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.0c01161> **2020**
7. Rejczak, T.; Tuzimski, T. A Review of Recent Developments and Trends in the QuEChERS Sample Preparation Approach. *Open Chem.* **2015**, *13*(1), 980–1010
8. Anumol, T. *et al.* Comparison of Veterinary Drug Residue Results in Animal Tissues by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole or Quadrupole-Time-Of-Flight Tandem Mass Spectrometry after Different Sample Preparation Methods, Including Use of a Commercial Lipid Removal Product. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*(10), 2639–2653. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28224246/>
9. Han, L.; Matarrita, J.; Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. Evaluation of a Recent Product to Remove Lipids and Other Matrix Co-Extractives in the Analysis of Pesticide Residues and Environmental Contaminants in Foods. *J. Chromatogr. A.* **2016**, *1449*, 17–29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27139213/>
10. Stevens, J.; Zhao, L. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 对全血中的 THC 及其代谢物进行高效定量分析，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8635ZHCN, **2017**
11. Storm, C., Zumwalt, M., Macherone, A. 采用 Agilent 1220 Infinity II 液相色谱系统进行大麻素效应测定，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-9285ZHCN, **2020**

www.agilent.com/en/solutions/cannabis-hemp-testing

DE.2968171296

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020，2022
2022 年 12 月 19 日，中国出版
5994-2873ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

