

Agilent Infinity II 1260 Prime LC と LC/MSD iQ システムによる 植物性カンナビノイドオイルの定量

著者

Sue D'Antonio¹, Guannan Li¹,
and Anthony Macherone^{1,2}

¹ Agilent Technologies, Inc.

² The Johns Hopkins
University School of
Medicine, Baltimore,
MD, USA

概要

デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（THC）、カンナビジオール（CBD）、デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール酸（THCA）など、大麻や麻、またはそれらに由来する製品中の植物性カンナビノイドの濃度測定は、規制試験および法医学の観点から非常に重要です。しかしこれらの分析試験方法は、求められている結果や情報にかかわらず、基本的に同じです。このアプリケーションノートでは、ペット産業向けに製造された CBD オイル製品の分析に、Agilent Infinity II 1260 Prime LC システムと Agilent InfinityLab LC/MSD iQ とを組み合わせて使用しました。この結果は、優れたクロマトグラフィー分離能、検出下限（LOD）、定量下限（LOQ）を実証しています。

はじめに

2017年のヘンプ（麻）産業市場は全世界で39億ドルと推計されており、ヘンプシードのセグメントでは2025年まで17.1%の年平均成長率となると予測されています¹。ヘンプの生産に影響される市場には、栄養補助食品、食品、繊維、建材、パーソナルケア製品などがあります。また、米国、カナダをはじめ、世界各国で急成長する嗜好用および医療用大麻を補うために、カンナビジオール（精神活性作用のないカンナビノイド）の生産が伸びることが予測されています。

インターネットで検索するだけで、非常に多くのペット向けのヘンプオイル製品やCBDオイル製品が表示されます。現在USDAが義務付けているのは、ヘンプとヘンプ製品の総THC含有量が、質量濃度で0.3%未満であることを確認する力価試験のみです。大半の規制ラポでは、さまざまな製品中のカンナビノイドの分離と測定に、HPLCとUV検出の組み合わせが用いられています。しかしCBDオイルを測定するとテルペン類などが共溶出すること

が多く、UV検出を用いた場合、ターゲットのカンナビノイド類の正確な同定と定量が、こうした共溶出化合物によって妨げられる可能性があります。LC/MSD iQを組み合わせることで、質量確認の特異性が追加され、これらの干渉を軽減して、全体的なメソッドの堅牢性が大幅に向上します。

CBDオイルやCBD製品への注目が高まるなかで、製造業者、販売業者、研究者は、CBDとTHCの両方の濃度や、次の式で定義される総THC含有量と総CBD含有量を正確に測定する必要があります。

$$\text{総 THC} = 0.877 \times [\text{THCA}] + [\text{THC}]$$

式 1.

$$\text{総 CBD} = 0.877 \times [\text{CBDA}] + [\text{CBD}]$$

式 2.

ここで、[THCA]はTHCの酸類似体の濃度、[CBDA]はCBDの酸類似体の濃度です。*Cannabis sativa L.*ゲノムは、THCA、CBDA、その他の植物カンナビノイド酸の生合成をコード化すること、またTHC、CBDなどは収穫、乾燥、加熱時に生成されることに注意することが重要です。

実験方法

ハードウェアとソフトウェア

すべての実験で、次のモジュールで構成されたAgilent InfinityLab LC/MSD iQシステムを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- 1260 Infinity II バイアルサンプラ (40 µL 計量デバイスおよび20 µL ループ付き G7129A と G7129C)、一体型カラムコンパートメント (3 µL ヒーター : G7130-64430) および一体型サンプルクーラーを搭載
- 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)
- InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)

Agilent OpenLab CDS 2 ソフトウェア (バージョン 2.4) を用いて、データ取り込みおよびデータ処理を行いました。

データ測定

LC/MSD iQ の自動測定モードを使用して、SIM イオン以外のすべての MSD パラメータを自動で設定しました。自動測定機能では、HPLC クロマトグラフィーの設定値に基づいて、MS パラメータを設定します。次の各表は LC/MSD iQ 分析パラメータを示しています。

表 1. HPLC 条件

パラメータ	値
流量	0.5 mL/min
カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 1.9 μm
ストップタイム	12.5 分
ポストタイム	3.0 分
注入量	0.5 μL
波長	228 および 270 nm
サンプリングレート	40 Hz

表 2. HPLC 移動相グラジエント

時間	(A) 水	(B) アセトニトリル	(C) メタノール	(D) 0.1% ギ酸
0	25	70	0	5
3.2	25	70	0	5
8.2	5	0	90	5

表 3. 自動測定モード使用時の LC/MSD iQ での設定値

モード	自動測定
チューニングファイル	atunes.tune
イオン源	ESI
タイムフィルタ使用	オン
ターゲットポイント使用	オン
% SIM	50

表 4. LC/MSD iQ エレクトロスプレーイオン源の条件

イオン源パラメータ	値
ガス温度	325 °C
ガス流量	13 L/min
ネブライザ	55 psig
キャピラリー電圧	3,500

表 5. LC/MSD iQ の SIM/Scan パラメータ

セグメント	名前	M+H (m/z)	フラグメンタ (V)	極性
SCAN		200 – 700	100	正
SIM	THCA, CBDA	359.2	100	正
SIM	CBN	311.2	100	正
SIM	CBD, THC, CBC	315.2	100	正
SIM	CBG	317.2	100	正
SIM	CBDV, THCV	359.2	110	正
SIM	CBGA	361.2	110	正

カラムと消耗品

表 6. アジレントの消耗品と部品番号

消耗品	部品番号
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 100 mm, 1.9 μm	695675-302
0.45 μm 再生セルロース (RC) シリンジフィルタ	5190-5107
ギ酸	G2453-85060
InfinityLab UltraPure LC/MS 用超純水, 1 L	5191-4498
InfinityLab UltraPure LC/MS グレード メタノール, 1 L	5191-4497
InfinityLab アセトニトリル, 1 L	5191-4496
セラミックホモジナイザ, 50 mL チューブ, 100 個	5982-9313
5 mL ディスポーザブルシリンジ, 100 個	9301-6476

サンプル前処理

100 µL 量の高純度ヘキサンをメスフラスコにピペットで移し、サンプルの重量を、正確に測定し記録しました。5 mL の高純度ヘキサンをメスフラスコに加え、キャップをした後に軽くボルテックスして混合しました。ヘキサンをメスフラスコの 10 mL マークまで加え、再度混合しました (100 倍希釈)。100 µL の各希釈済みオイルをそれぞれ新しいバイアルに移し、900 µL のエタノールを各バイアルに追加しました。バイアルにキャップを付けて軽く混合した後、0.45 µm の再生セルロース (RC) シリンジフィルタでろ過して、分析用の 2 mL オートサンプルバイアルに移しました。総希釈係数は

1,000 倍でした。この希釈係数は分析対象の製品の CBD 含有量を基に増減できることに注意してください。

表 7 に示すような 11 種類のカンナビノイドの混合物について段階希釈を実行し、5 つのレベルの溶媒ベースの標準混合液を 0.1 または 0.25 µg/mL から 50.0 µg/mL までの範囲で作成しました。LOD および LOQ を特定するために、より低い濃度で繰り返し注入を実行しました。

質量/体積の変換は、式 3 を使用して実行します。

結果と考察

1260 Infinity II Prime LC クォータナリポンプは、4 種類の個別の溶媒を使用して、バイナリポンプのようなグラジエントプロファイルを作成することができます。このため、複雑な移動相の調製作業は必要なく、簡単にボトルの溶媒を補充するだけです。イオン強度と UV ベースライン吸光は、総移動相の 5 % で D チャンネル (0.1 % ギ酸) を使用することで一定に保持されます。HPLC ポンプとコンポーネントの上限は 80 MPa であるため、1.9 µm Poroshell カラムを使用して微小粒子径充填剤の分離能を活用することができます。これにより、優れたクロマトグラフィー分離を分析全体で実現しました。図 1 に、SIM と UV クロマトグラムを示します。表 8 に、各化合物について計算した LOD と LOQ を示します。LOD はノイズレベルの 3 倍 (S/N 比=3) から、LOQ はノイズレベルの 10 倍 (S/N 比=10) から決定しました。最後に、表 9 に 6 つの市販ペット製品の定量結果を示します。

表 7. ターゲットカンナビノイドおよびリテンションタイム (分)

化合物	頭字語	リテンションタイム
カンナビジバリン	CBDV	2.676
カンナビジオール酸	CBDA	3.693
カンナビゲロール酸	CBGA	3.979
カンナビゲロール	CBG	4.267
カンナビジオール	CBD	4.554
テトラヒドロカンナビバリン	THCV	4.941
カンナビノール	CBN	7.198
デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール	Δ ⁹ -THC	8.290
デルタ-8-テトラヒドロカンナビノール	Δ ⁸ -THC	8.590
カンナビクロメン	CBC	9.173
デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール酸	THCA	9.795

$$\text{カンナビノイド濃度}(\% \frac{\text{wt}}{\text{wt}}) = \left[\frac{\text{算出濃度} \cdot V \cdot D}{M \cdot 10,000} \right]$$

式 3.

算出濃度 = 線形回帰分析からの分析対象物の濃度 (µg/mL)

V = サンプル希釈液の初期体積 (mL)

D = 希釈係数

M = サンプルの質量 (g)

10,000 = µg/g から % wt/wt への変換

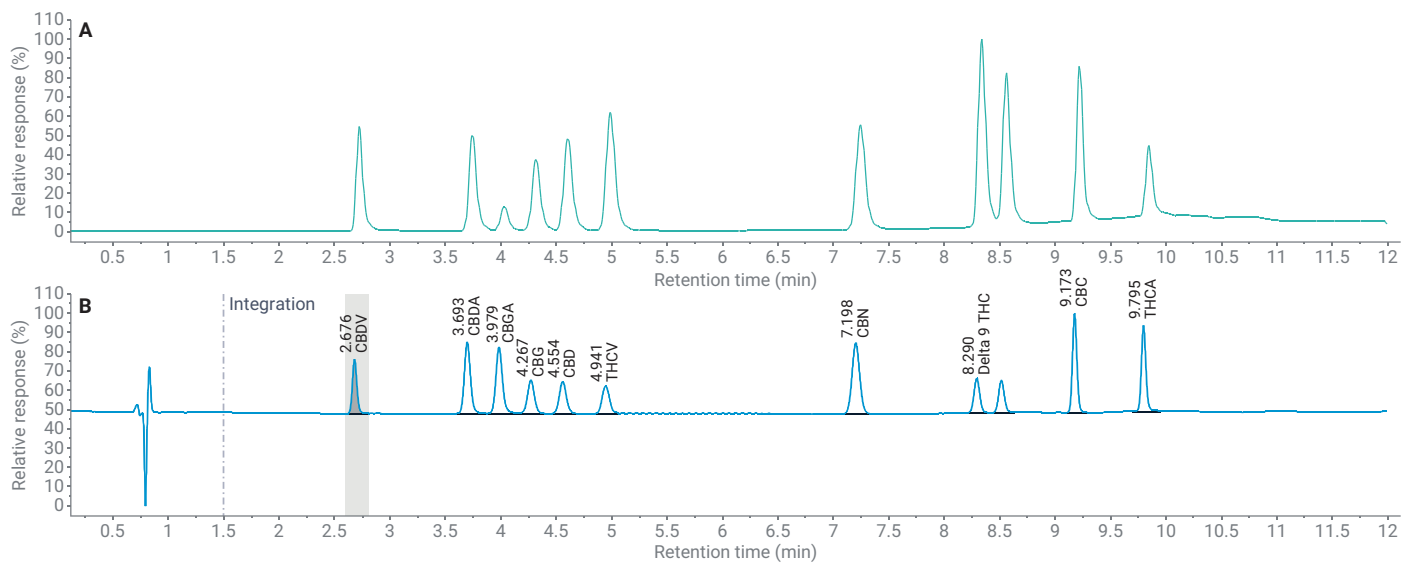


図 1. 11 種類の標準混合物のSIM TIC (A) および DAD シグナル (B)

表 8. キャリブレーション範囲 0.1 ~ 50 µg/mL の相関係数 (R^2) および LOD と LOQ (µg/mL)

化合物	R^2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
CBDV	0.995	0.25	0.50
CBDA	0.996	0.25	0.50
CBGA	0.997	0.25	0.50
CBG	0.997	0.25	0.50
CBD	0.999	0.25	0.50
THCV	0.995	0.25	0.50
CBN	0.997	0.25	0.50
Δ^9 -THC	0.990	0.10	0.50
CBC	0.995	0.25	0.50
THCA	0.995	0.25	0.50
Δ^8 -THC	0.992	0.10	0.25

表 9. 6 種の市販のペット用 CBD オイル中のカンナビノイド定量結果 (µg/mL)

サンプル ID	CBD	CBDA	THCA	Δ^9 -THC	Δ^8 -THC	CBG	CBN	CBC	CBDV	THCV
1MS	191.0	2.0	Nd	6.9	Nd	6.6	Nd	9.5	2.0	Nd
2MS	67.9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
3MS	23.2	2.2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
4MS	2.3	0.8	3.1	1.2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
5MS	34.7	3.7	Nd	0.2	Nd	Nd	Nd	1.7	Nd	Nd
6MS	17.0	Nd	Nd	0.8	Nd	Nd	Nd	1.9	Nd	Nd

結論

1260 Infinity II Prime LC システムは、使いやすい機能を搭載していることに加えて、LC/MSD iQ システムと組み合わせることで、ペット用 CBD オイルなどのカンナビノイド製品の分析で UV 検出のみを使用した場合と比べて選択性が向上します。今回の研究における分析では 6 種類の製品について 11 のカンナビノイド類の有無を特定し、検出されたものを正確に定量しました。これは、優れたクロマトグラフィー分離能と、各ターゲット化合物の m/z イオンのマスペクトル確認によって実現しました。この手法は、カンナビスおよびカンナビノイド製品が医療用や成人の嗜好用に合法化されている地域で法規制コンプライアンス試験を実施するラボでの導入が可能です。また、USDA ガイドラインに従ってヘンプの真正性を確認する必要がある US DEA に登録された法医学ラボや犯罪捜査学ラボにも導入できます。

参考文献

1. Grand View Research (June 2018). *Industrial Hemp Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Seeds, Fiber, Shivs), By Application (Textiles, Personal Care, Animal Care, Construction Materials), By Region, And Segment Forecasts, 2018 – 2025*. Accessed March 20, 2019 from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-hemp-market>.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, March 31, 2020
5994-1706JAJP
DE.3209953704

表 10. 総 CBD および総 THC (% wt/wt)

サンプル ID	総 CBD (% wt/wt)	総 THC (% wt/wt)
1MS	22.1	2.53
2MS	7.8	Nd
3MS	2.9	Nd
4MS	0.3	0.04
5MS	4.3	0.50
6MS	1.9	Nd