

基于 UPLC-QQQ-MS/MS 的工业大麻中 6 种大麻素类成分定量研究

李俊¹, 米要磊¹, 王思嘉², 朱雪雯¹, 万会花¹, 王思凡¹, 杜伟³, 苏畅⁴, 马伟², 陈士林¹, 徐志超⁵, 孙伟^{1*}, 杨维^{1*}

1. 中国中医科学院中药研究所 中药鉴定与安全性评估北京市重点实验室, 北京 100700
2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040
3. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京 100700
4. 深圳市药品检验研究院, 广东 深圳 518057
5. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 建立基于超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-QQQ-MS/MS)技术的工业大麻中 6 种大麻素类成分的定量分析方法, 并利用该方法对 9 个大麻仁基原植物工业大麻植株 3 个不同部位(雌花、苞片、叶)中的大麻素类成分含量进行研究, 为合理合法开发利用工业大麻, 甄选商业化品种以及选育符合我国法规的高大麻二酚(cannabidiol, CBD)含量、低四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC)含量品种奠定基础。**方法** 采用液质联用技术: Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 多反应监测模式。**结果** 以工业大麻中 6 种大麻素类成分大麻二酚、四氢大麻酚、大麻萜酚(cannabigerol, CBG)、大麻二酚酸(cannabidiolic acid, CBDA)、大麻萜酚酸(cannabigerolic acid, CBGA)和四氢大麻酚酸(tetrahydrocannabinolic acid, THCA)为研究对象, 建立了基于 UPLC-QQQ-MS/MS 的定量方法。方法学验证结果显示: 6 种大麻素类成分线性良好, R^2 为 0.999 1~1.000 0, 准确度为 0.29%~2.80%, 精密度为 0.84%~2.74%, 加样回收率为 99.36%~102.88%。样品分析结果显示: 花和苞片中的 6 种大麻素类成分含量显著高于叶片中的含量, 不同品种大麻中 6 种大麻素类成分在花、苞片和叶中的分布具有特异性。**结论** 基于 UPLC-QQQ-MS/MS 所建立的工业大麻中 6 种大麻素类成分的定量分析方法, 灵敏度高, 准确性好, 方法简单, 适用于工业大麻中 6 种大麻素类成分的含量测定。

关键词: UPLC-QQQ-MS/MS; 工业大麻; 大麻二酚; 大麻萜酚; 四氢大麻酚; 大麻二酚酸; 大麻萜酚酸; 四氢大麻酚酸
中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)04-1163-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.025

Quantitative analysis of six cannabinoids in Hemp based on UPLC-QQQ-MS/MS

LI Jun¹, MI Yao-lei¹, WANG Si-jia², ZHU Xue-wen¹, WAN Hui-hua¹, WANG Si-fan¹, DU Wei³, SU Chang⁴, MA Wei², CHEN Shi-lin¹, XU Zhi-chao⁵, SUN Wei¹, YANG Wei¹

1. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safe Evaluation of Chinese Medicine Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
2. College of Pharmaceutical Sciences, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China
3. Agilent Technologies (China) Co., Ltd., Beijing 100700, China
4. Shenzhen Institute of Drug Inspection, Shenzhen 518057, China
5. School of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To establish a quantitative analysis method for six cannabinoids in hemp based on ultra-performance liquid chromatography coupled to triple-quadrupole tandem mass spectrometer (UPLC-QQQ-MS/MS) technology, and use this method to study the content of cannabinoids in three different parts (female flowers, bracts, and leaves) of cannabis plants in nine international mainstream hemp. It lays a foundation for the rational and legal development and utilization of medicinal cannabis, the selection of commercial varieties and the breeding of varieties with high cannabidiol (CBD) content and low tetrahydrocannabinol (THC) content in accordance with Chinese laws and regulations. **Methods** The chromatographic separation was performed on an Agilent

收稿日期: 2021-08-06

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04008); 国家重点研发计划(2021YFE1011900)

作者简介: 李俊(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术研究。E-mail: lj25150903@163.com

*通信作者: 孙伟, 研究员。E-mail: wsun@icmm.ac.cn

杨维, 副研究员。E-mail: wyang@icmm.ac.cn

Eclipse Plus C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with a gradient elution, the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution (A)-methanol (B), and the flow rate was set at 0.3 mL/min; Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for the quantitative analysis of six cannabinoids in hems. **Results** Taking six CBD, THC, cannabigerol (CBG), cannabidiolic acid (CBDA), cannabigerolic acid (CBGA), and tetrahydrocannabinolic acid (THCA) in hemp as the research object, a quantitative method based on UPLC-QQQ-MS/MS was developed. The method verification results showed that the six cannabinoids had good linearity, with R^2 ranging from 0.9991 to 1.000, accuracy ranging from 0.29% to 2.80%, precision ranging from 0.84% to 2.74%, and the sample recovery rate was 99.36% to 102.88%. The sample analysis results showed that the content of six cannabinoids in flowers and bracts was significantly higher than that in leaves, and the distribution of six cannabinoids in different varieties of cannabis in flowers, bracts and leaves was specific. **Conclusion** The quantitative analysis method established by UPLC-QQQ-MS/MS has high sensitivity, good accuracy and simple method, which is suitable for the determination of cannabinoids in hemp.

Key words: UPLC-QQQ-MS/MS; hemp; cannabidiol; cannabigerol; tetrahydrocannabinol; cannabidiolic acid; cannabigerolic acid; tetrahydrocannabinolic acid

工业大麻又名汉麻、火麻、胡麻、线麻、和野麻，是大麻科 (Cannabaceae) 大麻属 *Cannabis* L. 一年生雌雄异株草本植物，其基原为大麻 *Cannabis sativa* L.。工业大麻是我国的传统经济作物也是历史悠久的药用植物^[1]，其种子（火麻仁）、茎秆以及花叶具有不同的实际应用价值。近年来以在工业大麻中提取的大麻二酚（Cannabidiol, CBD）为单一成分的药物 Epidiolex 相继被美国食品药品监督管理局、欧盟委员会、英国国家医疗服务体系等批准上市，主要用于治疗儿童先天性罕见癫痫、Lennox-gastuat 或 Dravet 综合征。2020 年联合国麻醉药品委员会成员国将大麻及大麻酯从《麻醉品单一公约》附表 4 中剔除，承认其药用及研究价值。

根据我国现行大麻种质管理分类四氢大麻酚（tetrahydrocannabinol, THC）的含量将大麻分为 2 类：THC 含量低于 0.3% 的称为工业大麻，主要用于获取纤维和种子，THC 含量高于 0.3% 的称为医用大麻在我国严禁种植和使用。2019 年陈士林团队提出了全新的根据大麻素含量的大麻种质资源管理三级分类体系，即工业大麻[THC<0.3%高大麻二酚（cannabidiol, CBD）含量]、医用大麻（THC>0.3%）、工业大麻（THC<0.3%低 CBD 含量）^[2]。最新基于基因组重测序的研究显示大麻最早是在东亚单一起源之后按照纤维型大麻（工业大麻）和毒品型大麻 2 种模式经过强烈的人工驯化形成了现今形态各异的大麻品种^[3]。我国有 20 多个省市都有工业大麻种植历史，其中大面积种植工业大麻的地区有黑龙江和云南省，在甘肃、吉林等地也有零星种植^[4]。

大麻素是大麻中特有的酚萜类化合物^[5]主要由脂肪酸途径和萜类途径生成大麻素合成起始底物香

叶基焦磷酸（geranyl diphosphate, GPP）和橄榄酸（olivetolic acid, OA），二者在大麻萜酚酸合成酶的作用下生成大麻素生物合成的主要前体大麻萜酚酸（cannabigerolic acid, CBGA），大麻萜酚酸在大麻二醇酸合成酶和四氢大麻酚酸合成酶的作用下分别生成大麻二醇酸（cannabidiolic acid, CBDA）和四氢大麻酚酸（tetrahydrocannabinolic acid, THCA）CBGA、CBDA 和 THCA 后又生成终产物大麻萜酚（cannabigerol, CBG）、CBD 和 THC^[6]。根据大麻素结构中是否含羧基可将大麻素分为 2 类即酸性大麻素（如 CBDA、THCA、CBGA）和中性大麻素（如 CBD、THC、CBG）。在新鲜大麻植株中大麻素主要以 2 种形式存在，大麻被收割后在其贮藏期或受热的情况下，酸性大麻素经非酶促反应脱羧生成中性大麻素。CBD 和 THC 是大麻中最重要的 2 个中性大麻素，具有多种药理活性。THC 是大麻中的主要精神活性物质，具有镇痛、抗炎、抗惊厥、刺激食欲等作用^[7-8]，但 THC 会使人产生幻觉和依赖性并会对青少年发育中的大脑造成损害，被很多国家列为毒麻药品并禁止使用^[2]。CBD 可以抗抑郁、抗焦虑，并对心血管系统和呼吸系统具有保护作用^[9]，且 CBD 不具有精神活性，因此在临床治疗中被广泛应用。近些年酸性大麻素也被报道具有潜在治疗价值。有研究表明 CBDA 对 Rett 综合征具有潜在治疗效果^[10]，以及 CBDA 通过激活血清素（flibanserine, 5-HT_{1A}）受体来减轻啮齿动物的恶心和焦虑，且激活效力明显强于 CBD^[11]。

目前，国际上对工业大麻中大麻素的提取及检测研究已有部分相关研究报道，但针对不同品种及单一品种不同组织中大麻素类成分含量的比较研究

还相对较少。检测大麻素类化合物在雌性大麻花和苞片中含量的分布情况是研究大麻素成分的转录调控遗传机制的基础。同时随着我国云南及黑龙江省放开符合条件的企业进行工业大麻的科研、种植和提取等领域,培育和甄选富含高 CBD 低 THC (< 0.3%) 的工业大麻品种是实现 CBD 等无精神活性物质提取且实现产业化的关键。本实验利用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (UPLC-QQQ-MS/MS) 技术建立了工业大麻中 6 种代表性大麻素的同时定量方法,对国际商业主流 9 个工业大麻植株的花、苞片和叶中的 6 种大麻素含量进行定量检测,并对 6 种大麻素含量之间的相互关系进行分析为工业大麻品种筛选提供一定的参考数据。同时对不同部位中大麻素含量进行比较,为阐明大麻素组织特异性的生物合成提供代谢基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

电子分析天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司)、舒美 KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、台式 DK-3450 Mini 高速离心机 (丹麦 Labogene 公司)、Blue Pard 恒温振荡器 (上海一恒科学仪器有限公司)、冷冻干燥机 FD-1A-50 (北京博医康实验仪器有限公司)、JXFSTPRP-11-01 型冷冻研磨机 (上海净信实业发展有限公司)、Agilent 1290 超高效液相色谱仪 (美国安捷伦有限公司)、Agilent G6400 三重四极杆质谱仪 (美国安捷伦有限公司)。

1.2 材料

9 个商业品种工业大麻 (Cs001: Atlant CBD; Cs002: Dinamed CBD; Cs003: Dinamed CBD Plus; Cs004: CBD Therapy; Cs005: Purplematic CBD; Cs006: Tatanka Pure CBD; Cs007: Swiss Dream Auto CBD; Cs008: CBD Terra Italia; Cs009: Red Pure Auto CBD) 的花、苞片、叶,原植物经中国中医科学院中药研究所孙伟研究员鉴定为工业大麻 *C. sativa* L。

大麻二酚 (批号 13956-29-1) 和大麻萜酚 (批号 25654-31-3) 购自云南西力生物技术有限公司,四氢大麻酚 (批号 6465-30-1)、四氢大麻酚酸 (批号 23978-85-0)、大麻萜酚酸 (批号 25555-57-1) 和大麻二醇酸 (批号 1244-58-2) 购自德国默克公司,质量分数均大于 98%。质谱级甲醇和质谱级甲酸购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 屈臣氏蒸馏水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 柱温 35 °C。流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-甲醇 (B)。洗脱梯度为 0~2 min, 5%~70% B; 2~10 min, 70%~100% B; 10~13 min, 100% B; 13~14 min, 100%~5% B; 14~15 min, 5% B。体积流量 0.3 mL/min; 进样量 3 μL。

2.2 质谱条件

离子源电喷雾离子源 (ESI 源) 正、负离子模式。鞘气温度 250 °C。鞘气体积流量 11 L/min。喷嘴电压 500 V。雾化器压力 310.28 kPa。毛细管电压: 正电压 4000 V, 负电压 3500 V。干燥气温度 300 °C。干燥气体积流量 5 L/min。各路气体均使用氮气。数据采集模式为多反应监测模式。各定量成分的参数设定见表 1。

表 1 6 种大麻素类成分的质谱信息

Table 1 Mass spectrometry information of six cannabinoids

化合物	离子模式	离子对(<i>m/z</i>)	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
CBD	正离子	315.2/193.0	116	25
CBG	正离子	317.2/193.0	92	13
THC	正离子	315.2/123.0	128	37
CBDA	负离子	357.2/339.2	146	17
CBGA	负离子	359.2/341.2	152	21
THCA	负离子	357.2/313.2	188	25

2.3 样品前处理方法优化

2.3.1 提取溶剂的选择 准确称取 0.1 g 磨碎后的样品 (工业大麻花、苞片、叶) 平行 6 份, 依次分别加入 10 mL 50% 甲醇、75% 甲醇、95% 甲醇、95% 甲醇+0.01% 甲酸、95% 甲醇+0.1% 甲酸以及 95% 甲醇+0.5% 甲酸 超声提取 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 用提取溶剂稀释 200 倍, 过 0.25 μm 的微孔滤膜, 按“2.1”和“2.2”项下方法进样分析, 记录 6 种成分的峰面积响应值。

2.3.2 样品浸泡时间的考察 准确称取 0.1 g 磨碎后的工业大麻花样品, 平行 5 份, 分别加入 10 mL 提取溶剂 (根据“2.3.1”项下分析结果选择), 充分混匀后分别在 4 °C, 放置 0、2、4、8、12 h。超声提取 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min 取上清, 过 0.25 μm 的微孔滤膜, 用 95% 甲醇稀释 200 倍, 按“2.1”和“2.2”项下方法进样分析, 记录 6 种成分的峰面积响应值。

2.3.3 样品干燥方法的考察 “2.3.1”项下分析结果选择新鲜样品采摘后, 分别用 60 °C 通风烘箱干燥

24 h 或真空冷冻干燥机干燥 48 h。根据“2.3.1”和“2.3.2”项下分析结果选择最佳提取条件,在相同条件下分别提取烘干样品和冻干样品。按“2.1”和“2.2”项下方法进样分析记录 6 种成分的峰面积响应值。

2.4 溶液的制备

2.4.1 对照品溶液的制备

(1) 对照品储备液的制备:精密称取 CBD、CBG、THC、CBDA、CBGA、THCA 对照品制备成 1 mg/mL 的对照品储备溶液。

(2) 混合对照品溶液的制备:精密吸取 6 种对照品溶液,混合稀释,配制成含 CBD(0.019 5 μg/mL)、CBG(0.019 5 μg/mL)、THC(0.019 5 μg/mL)、CBDA(0.312 5 μg/mL)、CBGA(0.039 1 μg/mL)、THCA(0.117 2 μg/mL)的混合溶液,用甲醇依次稀释得一系列混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 将冷冻干燥后的样品用冷冻研磨机磨碎,精确称量研磨后的样品 0.1 g 于 10 mL 量瓶中,加入 10 mL, 95% 甲醇,混合均匀,4 ℃ 冷藏 2 h,超声提取 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min,取上清,根据检测需要用 95% 甲醇稀释,过 0.25 μm 的微孔滤膜制成供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 取“2.4.1”项下配制的混合对照品溶液各 3 份按“2.1”和“2.2”项下方法进样分析,记录 6 种成分的峰面积响应值。以各对照品浓度为横坐标(X),峰面积响应值为纵坐标(Y),用最小二乘法进行线性回归,结果见表 2。CBD、CBG、THC 质量浓度在 0.60~19.50 ng/mL 内,与峰面积线性关系良好,CBDA、CBGA、THCA 质量浓度分别在 9.80~312.50、1.20~39.10、3.70~117.20 ng/mL,与峰面积线性关系良好。

2.5.2 精密度考察 取混合对照品溶液,分别按“2.1”和“2.2”项下分析测试条件连续进样 6 次,详细记录峰面积响应值。计算 6 种被测成分峰面

积的 RSD 值。结果 RSD 值在 0.53%~2.74%。

2.5.3 重复性试验 取同一批次样品 6 份,按照“2.4.2”项下方法制备,按“2.1”和“2.2”项下方法测定随行当日标准曲线。详细记录峰面积响应值,根据标准曲线计算 6 种被测成分的含量的 RSD 值,RSD 值在 0.29%~2.80%。

2.5.4 稳定性试验 按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,在 4 ℃ 放置 0、2、4、6、8、12、24 h 后,按“2.1”和“2.2”项下方法对 6 种大麻素类成分进行测定,详细记录峰面积响应值,计算 RSD 值,RSD 值为 2.58%~4.65%。

2.5.5 加样回收率试验 精密吸取 6 种大麻素类成分的对照品储备液适量,混合稀释,配制成含 CBD(45.60 μg/mL)、CBG(3.2 μg/mL)、THC(5.4 μg/mL)、CBDA(457.5 μg/mL)、CBGA(7.13 μg/mL)、THCA(35.4 μg/mL)的混合溶液,制备高浓度质控溶液(QC-高),用甲醇依次稀释,制备中浓度质控溶液(QC-中)和低浓度质控溶液(QC-低)。从 10 个品种的工业大麻叶中随机抽取 6 份,充分混合均匀,先测定该混合样品含量后再从中精密称取 0.05 g,分别加入加标溶液(QC-高、中、低)各 1 mL(每组平行 6 份),按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”和“2.2”项下方法测定记录峰面积。计算各定量成分的含量,扣除本底量,根据加入量计算加样回收率。高质量浓度各成分平均回收率为 99.91%~101.00%,RSD 为 0.22%~1.61%;中质量浓度各成分平均回收率为 99.64%~101.21%,RSD 为 0.38%~1.21%;低质量浓度各成分平均回收率为 99.36%~102.88%,RSD 为 0.22%~3.65%。

2.6 样品检测

取待测样品,按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”和“2.2”项下方法测定。进行 3 次平行实验,记录峰面积根据随行标准曲线计算供试品溶液中各成分浓度,按照下式计算样品中各成分含量。色谱图见图 1。

$$\text{样品中各成分含量} = (C \times n \times V) / a$$

C 为标准曲线上计算出的各化合物浓度, n 为稀释倍数, V 为所用提取溶剂体积, a 为所取样品质量

2.7 数据处理

用 SPSS 22.0 对 6 种大麻素含量进行相关性分析,根据(总 CBD 含量=CBD 含量+CBDA 含量×0.877)计算 9 个工业大麻中不同部位总 CBD 含量^[12]。采用邓肯多重比较法对不同部位中的大麻素含量以

表 2 6 种化合物的线性关系考察结果

Table 2 Results of linear relationship of six compounds

化合物	线性回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	R ²
CBD	$Y = 2 \times 10^7 X + 1\ 353.8$	0.60~19.50	0.999 8
CBG	$Y = 7 \times 10^7 X + 2\ 215.4$	0.60~19.50	1.000 0
THC	$Y = 1 \times 10^7 X - 371$	0.60~19.50	0.999 8
CBDA	$Y = 8 \times 10^6 X + 80\ 786$	9.80~312.5	0.999 1
CBGA	$Y = 5 \times 10^7 X + 24\ 683$	1.20~39.1	0.999 5
THCA	$Y = 2 \times 10^7 X + 93\ 053$	3.70~117.2	0.999 8

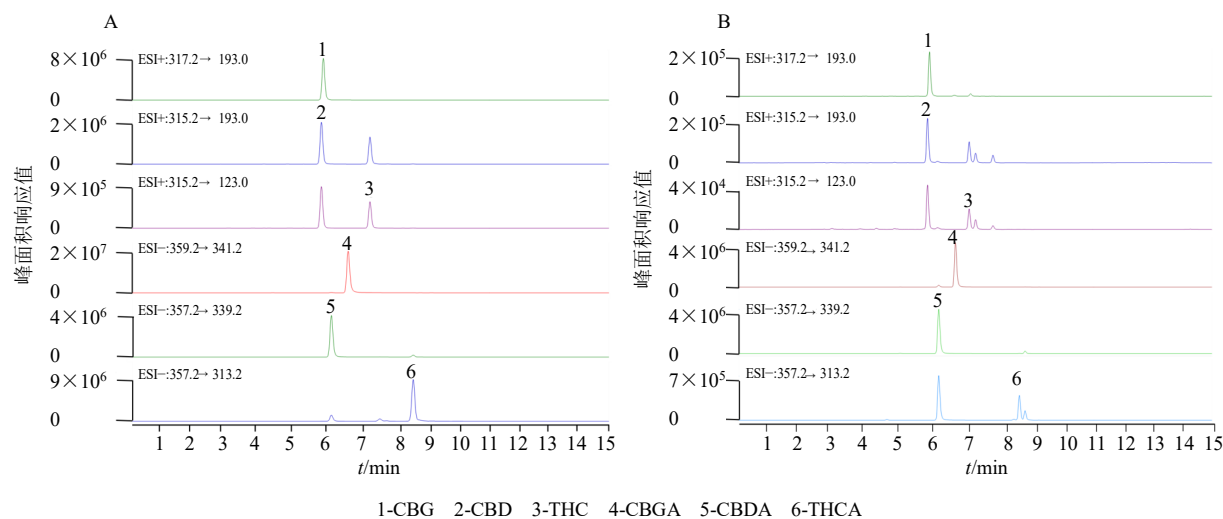


图 1 混合对照品 (A) 和供试品溶液 (B) MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of reference substance (A) and test solution (B)

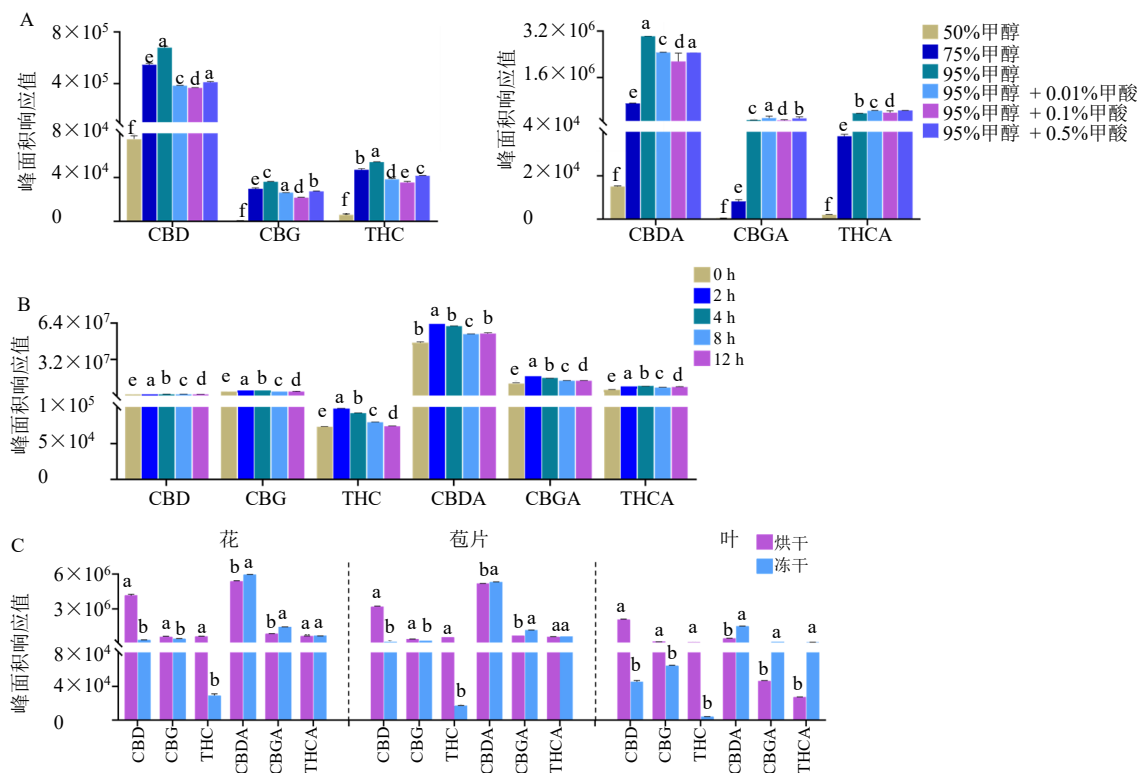
及 9 个品种工业大麻中总 CBD 含量进行比较, 应用 Graphpad Prism 软件对数据进行绘图展示。

3 结果与分析

3.1 前处理方法考察结果

3.1.1 提取溶剂考察结果 按“2.3.1”项下方法对不

同提取溶剂进行考察, 结果如图 2-A。当采用不同浓度甲醇对工业大麻进行提取时, 95% 甲醇的提取效率最高。在 95% 甲醇中加入不同比例的甲酸, 结果显示 CBD、CBG、THC、CBDA 在不加入甲酸时提取效率最高。因此选择 95% 的甲醇做为提取溶剂。



A-不同提取溶剂对大麻素提取效率 B-浸泡时间对大麻素提取效率 C-不同干燥方法对工业大麻中大麻素含量, 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

A-Effects of different extraction solvents on the extraction efficiency of cannabinoids B-Effect of soaking time on the extraction efficiency of cannabinoids

C-Effects of different drying methods on the content of cannabinoids in hemp, different letters means $P < 0.05$

图 2 前处理方法考察结果

Fig. 2 Results of pretreatment method investigation

3.1.2 样品浸泡时间考察结果 按“2.3.2”项下方法对样品浸泡时间进行考察,结果如图 2-B。考察 5 个时间段下样品在提取溶剂中的浸泡时间对大麻素提取效率的影响,结果显示,当在 4 ℃ 放置 2 h 时,CBD、CBG、THC、CBDA 和 CBGA 的提取效率最高,当在 4 ℃ 放置 4 h 时,THCA 的提取效率最高。因此,综合考虑,样品浸泡时间选择 2 h。

3.1.3 样品干燥方法考察结果 按“2.3.3”项下方法对样品干燥方法进行考察,结果如图 2-C。相对

于冷冻干燥法,采用烘干法时,CBD、CBG 和 THC 的含量增加,可能是由于温度升高使酸性大麻素脱羧生成中性大麻素,因此本研究采用冷冻干燥法进行干燥。

3.2 样品含量测定

取待测样品 0.1 g,按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”和“2.2”项下方法测定。进行 3 次平行实验,记录峰面积,根据随行标准曲线计算供试品溶液中各成分浓度,按照下式计算样品中各成分含量。结果见表 3。

表 3 大麻花、苞片和叶中 6 种大麻素类成分含量测定结果

Table 3 Determination results of six cannabinoids in flowers, bracts, and leaves of hemp

样品部位	编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
		CBD	CBG	THC	CBDA	CBGA	THCA
花	Cs001	5 493.1 $\pm$ 19.7	2 082.3 $\pm$ 8.4	729.0 $\pm$ 10.8	52 595.4 $\pm$ 201.2	7 846.7 $\pm$ 33.4	1 995.3 $\pm$ 26.9
	Cs002	704.6 $\pm$ 6.8	233.5 $\pm$ 1.6	114.6 $\pm$ 4.3	27 466.0 $\pm$ 151.3	3 877.9 $\pm$ 4.1	989.5 $\pm$ 8.4
	Cs003	875.3 $\pm$ 9.6	227.5 $\pm$ 1.9	159.2 $\pm$ 2.0	27 866.0 $\pm$ 189.8	2 533.4 $\pm$ 23.9	1 041.5 $\pm$ 16.6
	Cs004	1 402.4 $\pm$ 17.4	405.6 $\pm$ 3.1	231.7 $\pm$ 1.3	40 904.8 $\pm$ 352.4	6 384.1 $\pm$ 51.2	1 933.0 $\pm$ 36.7
	Cs005	1 372.9 $\pm$ 5.6	173.3 $\pm$ 1.4	214.4 $\pm$ 6.5	29 972.0 $\pm$ 213.2	1 778.3 $\pm$ 17.4	1 082.6 $\pm$ 9.6
	Cs006	918.2 $\pm$ 9.5	274.1 $\pm$ 0.9	133.8 $\pm$ 0.3	34 084.1 $\pm$ 224.0	2 333.4 $\pm$ 8.3	1 319.8 $\pm$ 25.6
	Cs007	3 272.4 $\pm$ 24.2	1 134.3 $\pm$ 16.2	464.1 $\pm$ 15.4	52 565.1 $\pm$ 49.3	8 288.0 $\pm$ 37.7	2 217.0 $\pm$ 38.3
	Cs008	2 226.6 $\pm$ 15.2	429.3 $\pm$ 0.9	270.3 $\pm$ 9.5	74 788.3 $\pm$ 1049.2	2 563.1 $\pm$ 15.7	3
	Cs009	2 471.1 $\pm$ 17.6	308.0 $\pm$ 5.0	320.9 $\pm$ 1.1	81 614.0 $\pm$ 344.8	3 080.1 $\pm$ 15.8	4 894.2 $\pm$ 38.2
苞片	Cs001	2 232.0 $\pm$ 9.5	194.1 $\pm$ 4.0	273.5 $\pm$ 3.4	16 301.2 $\pm$ 243.6	859.1 $\pm$ 8.0	372.1 $\pm$ 2.9
	Cs002	1 023.9 $\pm$ 8.0	282.3 $\pm$ 0.4	194.1 $\pm$ 2.6	27 432.3 $\pm$ 348.4	7 237.0 $\pm$ 69.3	893.8 $\pm$ 6.3
	Cs003	875.5 $\pm$ 13.0	78.5 $\pm$ 0.2	153.1 $\pm$ 2.3	22 323.0 $\pm$ 216.7	1 034.3 $\pm$ 9.4	828.4 $\pm$ 34.1
	Cs004	1 717.9 $\pm$ 10.9	361.6 $\pm$ 1.8	305.2 $\pm$ 16.8	49 999.5 $\pm$ 809.4	6 261.1 $\pm$ 38.7	2 568.6 $\pm$ 98.9
	Cs005	1 846.2 $\pm$ 24.3	57.0 $\pm$ 0.4	187.9 $\pm$ 1.2	16 024.5 $\pm$ 222.4	547.3 $\pm$ 2.0	475.1 $\pm$ 13.8
	Cs006	787.8 $\pm$ 7.1	64.8 $\pm$ 1.2	120.3 $\pm$ 0.6	2 3370.4 $\pm$ 33.1	407.2 $\pm$ 3.8	843.5 $\pm$ 8.7
	Cs007	1 438.2 $\pm$ 12.3	300.4 $\pm$ 2.5	221.5 $\pm$ 13.9	32 296.3 $\pm$ 301.7	3 528.0 $\pm$ 43.6	1 207.2 $\pm$ 38.8
	Cs008	1 021.3 $\pm$ 3.7	266.3 $\pm$ 3.1	153.4 $\pm$ 5.9	60 679.8 $\pm$ 376.8	2 127.4 $\pm$ 8.0	4
	Cs009	2 499.9 $\pm$ 4.0	254.2 $\pm$ 1.7	316.9 $\pm$ 11.8	56 613.6 $\pm$ 492.9	2 579.8 $\pm$ 1.4	2 334.1 $\pm$ 6.7
叶	Cs001	781.7 $\pm$ 5.5	19.1 $\pm$ 0.3	90.6 $\pm$ 0.7	6 305.5 $\pm$ 2359.0	8.6 $\pm$ 0.6	235.9 $\pm$ 0.9
	Cs002	527.4 $\pm$ 2.5	79.0 $\pm$ 0.8	70.3 $\pm$ 1.2	12 080.7 $\pm$ 54.0	338.2 $\pm$ 1.6	869.3 $\pm$ 149
	Cs003	842.1 $\pm$ 1.9	10.2 $\pm$ 0.1	96.6 $\pm$ 1.0	5 526.0 $\pm$ 58.7	14.3 $\pm$ 0.2	229.2 $\pm$ 4.7
	Cs004	530.8 $\pm$ 1.3	12.5 $\pm$ 0.1	73.1 $\pm$ 0.7	8 391.0 $\pm$ 11.4	27.6 $\pm$ 0.1	454.7 $\pm$ 3.9
	Cs005	1 174.5 $\pm$ 6.4	3.6 $\pm$ 0.1	96.2 $\pm$ 0.9	3 346.0 $\pm$ 3.6	12.2 $\pm$ 0.3	92.2 $\pm$ 0.2
	Cs006	446.4 $\pm$ 6.2	29.9 $\pm$ 0.4	54.5 $\pm$ 0.1	10 541.9 $\pm$ 53.9	9.3 $\pm$ 0.2	764.3 $\pm$ 11.5
	Cs007	1 113.0 $\pm$ 7.9	118.0 $\pm$ 1.6	145.8 $\pm$ 0.9	10 745.7 $\pm$ 169.1	874.4 $\pm$ 11.1	583.0 $\pm$ 9.2
	Cs008	350.0 $\pm$ 15.8	45.7 $\pm$ 2.1	52.7 $\pm$ 1.2	1 248.1 $\pm$ 6.6	99.1 $\pm$ 3.8	788.9 $\pm$ 12.7
	Cs009	522.8 $\pm$ 4.4	68.8 $\pm$ 1.2	64.4 $\pm$ 0.7	11 375.5 $\pm$ 378.6	286.0 $\pm$ 0.3	627.8 $\pm$ 4.7

3.3 数据分析结果

3.3.1 不同部位的大麻素含量差异分析 采用邓肯多重比较法分析 9 个品种工业大麻中 6 种大麻素类成分在花、苞片和叶中的分布情况,结果如图 3 所示。从总体趋势看,6 种大麻素在花和苞片中的含量显著高于叶片中的含量。比较 6 种大麻素类成分在 9 个工业大麻品种中的含量,结果显示,CBDA 在 3 个部位中均是含量最高的化合物,THC 在花和苞片中含量最低,CBG 在叶片中含量最低。在 Cs001、Cs003、Cs006、Cs007 和 Cs009 这 5 个品种中,6 种大麻素类成分均在花中的含量最高,在

其余 4 个品种中 6 种大麻素类成分在各部位的含量变化具有特异性,例如 Cs003 中 CBD 在 3 个部位的含量没有显著差异,Cs004 苞片中的 CBD 和 THC 含量最高。不同品种中大麻素在 3 个部位的含量分布情况不一致的原因可能与其表型特征和基因型有关。

3.3.2 不同品种工业大麻中总 CBD 含量比较 采用邓肯多重比较法对 9 个品种工业大麻的总 CBD 含量进行比较,结果如图 3-B 所示。除 Cs002 和 Cs003 花中的总 CBD 含量不存在显著性差异外,其余品种中的总 CBD 含量均存在显著性差异。

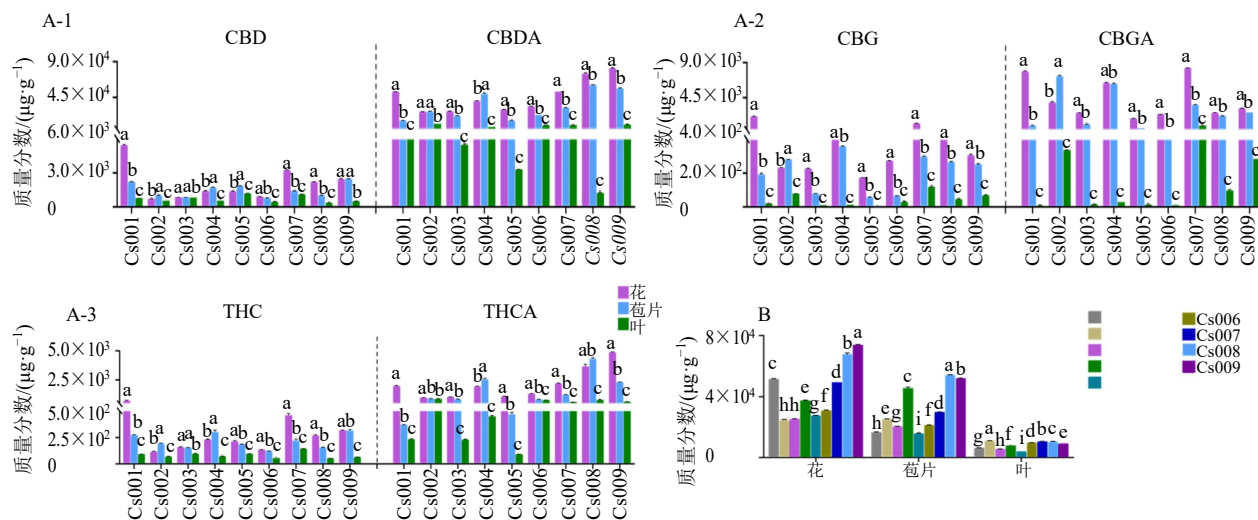


图 3 不同部位中大麻素含量比较 (A) 和不同品种总 CBD 含量比较 (B)

Fig. 3 Comparison of cannabinoid content in different parts (A) and comparison of total CBD content of different varieties (B)

3.3.3 工业大麻中 6 种大麻素类成分相关性分析 为了更好的对工业大麻中 6 种大麻素类化合物含量之间的相互关系进行研究,对其进行了相关性分析 ($0 < |r| \leq 0.3$ 为微弱相关, $0.3 < |r| \leq 0.5$ 为低度相关, $0.5 < |r| \leq 0.8$ 为显著相关, $0.8 < |r| \leq 1.0$ 为极显著相关),结果如表 4 所示。CBGA 与 CBDA ($r=0.939$, $P<0.01$)、CBGA 与 THCA ($r=0.867$, $P<0.01$)、CBDA 与 THCA ($r=0.952$, $P<0.01$)、CBD 与 THC ($r=0.988$, $P<0.01$) 呈极显著相关。

4 讨论

4.1 检测方法的选择

目前,液质联用(LC-MS)和气质联用(GC-MS)是大麻素类成分最常用的检测方法,GC-MS 灵敏度高、稳定性好,适用于挥发性和半挥发性化合物,但样品在进行 GC-MS 分析前需进行衍生化处理,加强样品的挥发性^[13-14],不适合酸性大麻素的分析。而 LC-MS 兼具液相色谱的高分离能力和质谱的高

灵敏度、高分辨率等优点^[15-16],适合于强极性、热稳定性差等化合物的检测,是植物次生代谢产物(如生物碱类、酚酸类、黄酮类等)分离分析的主要手段^[17]。利用三重四极杆质谱(QQQ)的多反应监测模式(MRM)可对样品中的微量成分精确定量,结果准确可靠^[18],因此本实验采用 UPLC-QQQ-MS/MS 建立工业大麻中 6 种主要大麻素的定量分析方法。

4.2 样品前处理方法的优化

前处理过程可以去除工业大麻中的杂质干扰成分,并将目标化合物最大程度的保留,进行后续的检测分析。目前对大麻素的提取方法多样,例如热回流提取法^[19]、超临界 CO_2 萃取法^[20]、动态浸渍法^[21]和超声辅助提取法^[22]等。提取溶剂多选择甲醇^[23-26]、甲醇-氯仿(9:1)^[27-29]、乙腈-甲醇(80:20)^[30-31]、己烷^[32-33]等。综合考虑试剂成本、试剂毒性以及方法简便性等,本实验选用大麻

表 4 6 种大麻素类成分相关性分析
Table 4 Correlation analysis of six cannabinoids

指标	<i>r</i>					
	CBG	CBD	THC	CBGA	CBDA	THCA
CBG	1.000					
CBD	0.721*	1.000				
THC	0.794*	0.988**	1.000			
CBGA	0.782*	0.648*	0.685*	1.000		
CBDA	0.745*	0.515*	0.588*	0.939**	1.000	
THCA	0.624*	0.297	0.370	0.867**	0.952**	1.000

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

素提取中常用的甲醇做为溶剂辅以超声提取,对不同浓度甲醇对大麻素的提取效率进行考察。为了考察甲酸是否对 6 种定量成分有影响,又对 95%甲醇中加入不同比例的甲酸进行了考察。本实验通过比较在不同条件下各成分的提取效率,最终选择 95%甲醇为提取溶剂 4 ℃放置 2 h 超声提取 30 min 为工业大麻样品前处理条件。此外,本研究还考察了烘干法和真空冷冻干燥法对样品中大麻素含量的影响,结果显示酸性大麻素中含有羧基,加热时会发生脱羧反应,而真空冷冻干燥法在低温状态下对样品进行干燥,化合物性质较稳定,能较好地反映大麻素类活性物质在样品中的真实存在状态。同时冷冻状态可以同时检测大麻组织器官的 RNA 转录及蛋白组水平的变化,可以较好的研究大麻素代谢与调控水平变化。

4.3 分析条件优化

本研究采用正、负离子扫描模式对 6 种大麻素类化合物对照品的质谱条件进行优化,结果显示 CBD、THC、CBG 在正离子扫描模式下响应值较高,CBDA、CBGA、THCA-A 在负离子扫描模式下响应值较高。在离子对为 315.2/193.0 和 315.2/123.0 时,均能检测到 CBD 和 THC 这 2 个化合物,但 CBD 在离子对为 315.2/193.0 时响应值高于 315.2/123.0 THC 在离子对为 315.2/123.0 时响应值高于 315.2/193.0,因此选择 315.2/193.0 为 CBD 的最佳检测条件,选择 315.2/123.0 为 THC 的最佳检测条件。在离子对为 357.2/339.2 和 357.2/313.2 时也可同时检测到 CBDA 和 THCA 这 2 个化合物,根据其响应值,分别选择 357.2/339.2、357.2/313.2 为 CBDA、THCA 的最佳检测条件。

4.4 不同品种工业大麻中的大麻素含量测定

不同品种工业大麻花和苞片中 6 种大麻素的

含量都高于叶片中的含量,这主要由于大麻素类化合物主要在雌性大麻植株花和苞片上的腺毛中积累^[34]。而 6 种大麻素在花和苞片中的含量变化情况各异 可能是代谢途径中调控大麻素合成的基因在 2 个部位的差异表达所导致的。而不同品种工业大麻中大麻素含量存在差异,可能与其遗传背景相关 后期可从基因组方面对不同品种间存在差异的原因进行深入研究。

本实验对大麻素含量进行相关性分析,结果显示 CBGA 与 CBDA、CBGA 与 THCA、CBDA 与 THCA 均呈极显著相关。可能是因为在大麻素的合成通路中,CBGA 是合成 THCA、CBDA 的化学前体,在酶的作用下 CBGA 转化为 CBDA 和 THCA,因此它们的含量变化紧密相关。

5 小结

工业大麻已有上千年的应用史,随着现代科学技术的发展,对工业大麻的研究也越加深入,其中大麻素因具有巨大的医疗潜力而备受关注,本研究建立的大麻素 UPLC-QQQ-MS/MS 定量方法,可对 6 种代表性大麻素化合物准确定量,为大麻素的后续研究奠定了基础。不同品种间大麻素含量差异以及 6 种大麻素之间存在相关性的原因有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭孟璧,陈璇,郭鸿彦,等. 不同光质对工业大麻生长及其抗癫痫成分大麻二酚积累的影响 [J]. 中药材, 2019, 42(10): 2220-2225.
- [2] 李秋实,孟莹,陈士林. 药用大麻种质资源分类与研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4309-4316.
- [3] Ren G P, Zhang X, Li Y, *et al*. Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of

- Cannabis sativa* [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(29): doi:10.1126/sciadv.abg2286.
- [4] 张际庆, 陈士林, 尉广飞, 等. 高大麻二酚(CBD)含量药用大麻的新品种选育及生产 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(21): 4772-4780.
 - [5] 常丽, 李建军, 黄思齐, 等. 植物大麻活性成分及其药用研究概况 [J]. *生命的化学*, 2018, 38(2): 273-280.
 - [6] Tahir M N, Shahbazi F, Rondeau-Gagné S, *et al.* The biosynthesis of the cannabinoids [J]. *J Cannabis Res*, 2021, 3(1): 7.
 - [7] Koppel B S, Brust J C, Fife T, *et al.* Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology [J]. *Neurology*, 2014, 82(17): 1556-1563.
 - [8] Reddy D S, Golub V M. The pharmacological basis of *Cannabis* therapy for epilepsy [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 357(1): 45-55.
 - [9] 蒋鸿雁, 张瑞林, 曹艳, 等. 大麻二酚在医学上的应用前景 [J]. *昆明医科大学学报*, 2021, 42(2): 147-152.
 - [10] Vigli D, Cosentino L, Pellas M, *et al.* Chronic treatment with cannabidiolic acid (CBDA) reduces thermal pain sensitivity in male mice and rescues the hyperalgesia in a mouse model of rett syndrome [J]. *Neuroscience*, 2021, 453: 113-123.
 - [11] Pertwee R G, Rock E M, Guenther K, *et al.* Cannabidiolic acid methyl ester, a stable synthetic analogue of cannabidiolic acid, can produce 5-HT_{1A} receptor-mediated suppression of nausea and anxiety in rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(1): 100-112.
 - [12] Stack G M, Toth J A, Carlson C H, *et al.* Season-long characterization of high-cannabinoid hemp (*Cannabis sativa* L.) reveals variation in cannabinoid accumulation, flowering time, and disease resistance [J]. *GCB Bioenergy*, 2021, 13(4): 546-561.
 - [13] Ebersbach P, Stehle F, Kayser O, *et al.* Chemical fingerprinting of single glandular trichomes of *Cannabis sativa* by Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 1-12.
 - [14] 常玉玮, 王国栋. LC-MS 在植物代谢组学分析中的应用 [J]. *生命科学*, 2015, 27(8): 978-985.
 - [15] 苏靖, 戴荣继. 液质联用技术在中药研究中的应用 [J]. *生命科学仪器*, 2014, 12(Z1): 38-42.
 - [16] 王宇歆, 刘洪斌, 李东华. 液相色谱质谱联用技术在中药研究中的应用进展 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2011, 17(4): 444-446.
 - [17] De Vos R C, Moco S, Lommen A, *et al.* Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 778-791.
 - [18] Hopfgartner G, Varesio E. New approaches for quantitative analysis in biological fluids using mass spectrometric detection [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2005, 24(7): 583-589.
 - [19] 高哲, 张志军, 李晓君, 等. 火麻叶中大麻二酚的热回流法提取工艺研究 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(3): 107-111.
 - [20] Attard T M, Bainier C, Reinaud M, *et al.* Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 112: 38-46.
 - [21] 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]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 143: 228-236.
 - [22] 高宝昌, 孙宇峰, 张旭, 等. 工业大麻叶中大麻二酚含量分析研究 [J]. *黑龙江科学*, 2018, 9(1): 61-63.
 - [23] Gröger T, Schäffer M, Pütz M, *et al.* Application of two-dimensional gas chromatography combined with pixel-based chemometric processing for the chemical profiling of illicit drug samples [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1200(1): 8-16.
 - [24] Tipparat P, Natakankitkul S, Chamnivikaipong P, *et al.* Characteristics of cannabinoids composition of *Cannabis* plants grown in Northern Thailand and its forensic application [J]. *Forensic Sci Int*, 2012, 215(1/2/3): 164-170.
 - [25] Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, *et al.* Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR [J]. *Phytochemistry*, 2013, 87: 51-59.
 - [26] Gul W, Gul S W, Radwan M M, *et al.* Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of *Cannabis* using high-performance liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 2015, 98(6): 1523-1528.
 - [27] Oliveira G L, Voloch M H, Sztulman G B, *et al.* Cannabinoid contents in *Cannabis* products seized in São Paulo, Brazil, 2006-2007 [J]. *Forensic Toxicol*, 2008, 26(1): 31-35.
 - [28] De Backer B, Debrus B, Lebrun P, *et al.* Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in *Cannabis* plant material [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(32): 4115-4124.

- [29] De Backer B, Maebe K, Verstraete A G, *et al.* Evolution of the content of THC and other major cannabinoids in drug-type *Cannabis* cuttings and seedlings during growth of plants [J]. *J Forensic Sci*, 2012, 57(4): 918-922.
- [30] Wang M, Wang Y H, Avula B, *et al.* Quantitative determination of cannabinoids in *Cannabis* and *Cannabis* products using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography and diode array/mass spectrometric detection [J]. *J Forensic Sci*, 2017, 62(3): 602-611.
- [31] Gul W, Gul S W, Chandra S, *et al.* Detection and quantification of cannabinoids in extracts of *Cannabis sativa* roots using LC-MS/MS [J]. *Planta Med*, 2018, 84(4): 267-271.
- [32] Mechtler K, Bailer J, de Hueber K. Variations of Δ^9 -THC content in single plants of hemp varieties [J]. *Ind Crop Prod*, 2004, 19(1): 19-24.
- [33] Hewavitharana A K, Golding G, Tempany G, *et al.* Quantitative GC-MS analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in fiber hemp varieties [J]. *J Anal Toxicol*, 2005, 29(4): 258-261.
- [34] Ebersbach P, Stehle F, Kayser O, *et al.* Chemical fingerprinting of single glandular trichomes of *Cannabis sativa* by Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 1-12.

[责任编辑 时圣明]