HPLC 法测定国内工业大麻花叶原料中四氢大麻酚、大麻二酚和大麻二酚酸的含量

朱敏航[1]，周 靖[1]，徐云辉[1]，肖丰坤[2]，华茉莉[1]*

（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 201203；
2. 云南翰谷生物科技有限公司，云南曲靖 655700）

摘要：建立了 2 种 HPLC 法分别测定国内工业大麻花叶原料中四氢大麻酚（**1**）、大麻二酚（**2**）和大麻二酚酸（**3**）的含量。色谱柱采用 Agilent Extend C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），检测波长为 220 nm。以乙腈：0.1%磷酸溶液（76 ∶ 24）为流动相测定 **1** 含量；另以 0.1%磷酸溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱，同时测定 **2** 和 **3** 含量。结果显示，建立的方法具有良好的分离度和专属性，**1** 在 0.001 ～ 0.1 mg/ml 内线性关系良好，**2** 和 **3** 在 0.01 ～ 1 mg/ml 内线性关系良好。**1**、**2**、**3** 的定量限分别为 1.5、1.0、1.0 ng，检测限分别为 0.5、0.4、0.4 ng，平均加样回收率（n=9）分别为 95.27%、102.19%、98.85%，RSD 分别为 5.22%、3.19%、1.69%，可用于测定工业大麻花叶原料中 **1**、**2** 和 **3** 含量。

关键词：工业大麻；四氢大麻酚；大麻二酚；大麻二酚酸；高效液相色谱

中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)01-0095-06

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.01.010

Determination of Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabidiolic Acid in Domestic Hemp Leaves and Flowers by HPLC

ZHU Minhang[1], ZHOU Jing[1], XU Yunhui[1], XIAO Fengkun[2], HUA Moli[1]*

(*1. State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Yunnan Hemp Valley Biological Technology Co., Ltd., Qujing 655700*)

ABSTRACT: Two HPLC methods were established for the determination of tetrahydrocannabinol(**1**), cannabidiol(**2**) and cannabidiolic acid(**3**) in domestic hemp leaves and flowers. An Agilent Extend C_{18} column was used with the detection wavelength of 220 nm. The mobile phase composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous solution(76∶24) was used to determine **1**. The gradient elution of 0.1% phosphoric acid aqueous solution with acetonitrile was used to determine **2** and **3** simultaneously. The results showed that the methods were verified to have good separation and specificity. And it was linear for **1** in the range of 0.001 − 0.1 mg/ml, and it was linear for **2** and **3** in the range of 0.01 − 1 mg/ml. The limits of quantification for **1**, **2** and **3** were 1.5, 1.0 and 1.0 ng, respectively, and the detection limits were 0.5, 0.4 and 0.4 ng, respectively. The average recoveries(n=9) of sample addition were 95.27%, 102.19% and 98.85% with RSDs of 5.22%, 3.19% and 1.69%, respectively. The established method could be used to determine **1**, **2** and **3** in domestic hemp leaves and flowers.

Key Words: hemp; tetrahydrocannabinol; cannabidiol; cannabidiolic acid; HPLC

大麻（*Cannabis sativa* L.）来源于桑科大麻属一年生植物[1]，在世界各地均有野生大麻或栽培大麻，其药用历史悠久[2]。大麻中主要的生物活性物质为大麻素类成分，迄今已从不同的大麻植株中分离鉴定出百余种大麻素类化合物[3—4]，其中最广为

收稿日期：2021-02-07

作者简介：朱敏航(1996—)，女，硕士研究生，专业方向：中药质量研究。

E-mail：434585146@qq.com

通信作者：华茉莉(1972—)，女，研究员，博士生导师，从事中药、天然药物的新药研究与开发。

Tel：021-20572113

E-mail：huamoli@sinopharm.com

人知的是四氢大麻酚（tetrahydrocannabinol，**1**）和大麻二酚（cannabidiol，**2**），化学结构见图 1。**1** 为精神活性成分，具有致幻作用和成瘾性，是大麻作为毒品使用的主要活性组分，因此大麻植物及相关制品中须严格控制其含量。目前，国际通行的大麻植物分类方法的依据多为雌性植株开花期顶部花穗和叶片干重中的 **1** 含量，具体分类为医用大麻（也称毒品大麻、娱乐大麻，**1** 含量 >0.5%，英文多以 marihuana 表示）和工业大麻（也称汉麻，**1** 含量 < 0.3%，英文多以 hemp 表示）。**2** 则为非精神活性成分，公认无致幻作用和成瘾性，且具有广泛的生物活性如抗炎镇痛、抗焦虑、神经保护等 [5—8]，应用前景广阔。2018 年美国 FDA 批准 **2** 口服制剂用于治疗严重的儿童期发作癫痫（Dravet 综合征和 Lennox-Gastaut 综合征）。**2** 的生物合成前体为大麻二酚酸（cannabidiolic acid，**3**），在一定条件（高温、光照等）下 **3** 可脱羧转化为 **2**（图 1）[9—10]。一般情况下，采收的大多数大麻花叶原料均不同程度地存在尚未转化的 **3**，并在之后的储存、运输、加工过程中逐渐转化为 **2**，因此评估大麻植物中可供利用的 **2**，需将 **3** 完全转化为 **2**，但实际操作过程较为烦琐且较易出现转化不彻底或成分被破坏等状况，影响结果的准确性。

由于大麻植物及其相关制品是地下毒品流通的重要品种之一，因此大麻一直是联合国禁毒公约规定的管制对象。然而，近 10 余年，工业大麻逐步在部分国家和地区实现合法化，如我国云南省 2005 年、黑龙江省 2017 年先后通过地方立法，允许在公安系统监控下合法种植、加工工业大麻；2018 年 12 月，美国通过联邦法律，将干重下含 **1** ≤ 0.3% 的工业大麻及其制品从受控物质法中移除，这为大麻的医药应用研究提供了可利用的植物资源。本研究机构上海医药工业研究院是中国麻醉药品协会成员单位，本实验室已建立了麻醉药品和精神药品试验研究安全措施和管理制度，所有试验研究均在严格监控下进行，所用工业大麻花叶原料均为来自云南和黑龙江的合法种植物。

本研究首先建立等度洗脱的 HPLC 法快速准确测定 **1** 含量，以实现对国内工业大麻植物中 **1** 的严格有效监控；随后，建立梯度洗脱的 HPLC 法直接测定国内工业大麻植物中 **2** 和 **3** 的合计含量，以期为国内工业大麻植物中 **1**、**2**、**3** 的快速检测和准确定量提供参考。

1　仪器与试药

Dionex Ultimate 3000 型液相色谱仪（配置二极管阵列检测器，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；RUC-5200 型超声仪（上海睿祺电子设备有限公司）；0.22 μm 针头式滤器（上海泰坦科技股份有限公司）。

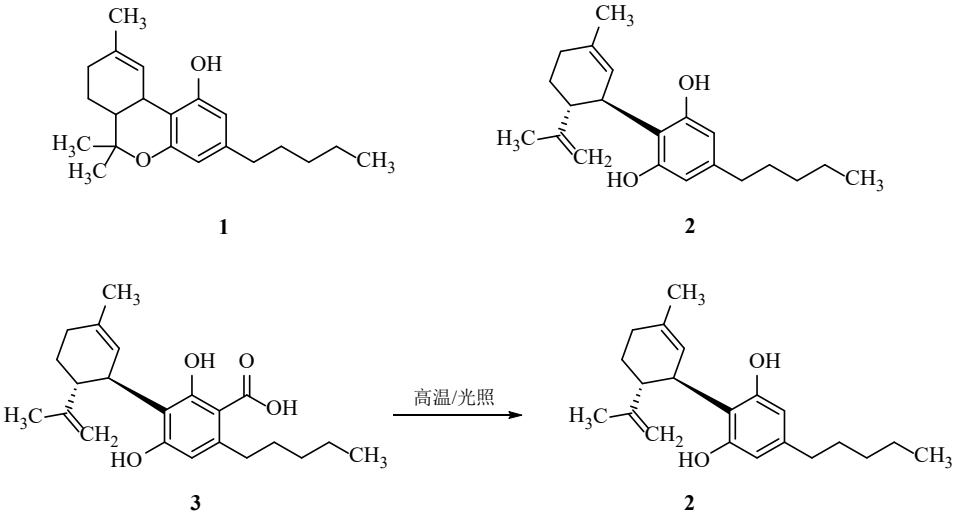


图 1　1、2 的化学结构及 3 转化为 2 的过程

Fig.1　Chemical Structures of **1**, **2** and Conversion of **3** to **2**

1 对照品（规格 1 mg/ml，溶剂为甲醇，批号 FE08221804）和 **2** 对照品（规格 1 mg/ml，溶剂为甲醇，批号 FE01271601）（美国 Sigma-Aldrich 公司）；另自制 **2** 对照品，以上述市售对照品标定，含量为 99.6%；**3** 对照品（自制，含量 99.3%）；工业大麻花叶样品（云南翰谷生物科技有限公司，批号 DM-20190909、DM-Y-001 ～ DM-Y-004；黑龙江省黑河市孙吴县汉麻协会农业技术推广中心，批号 DM-20191114；本实验室研究人员实地从黑龙江种植农场采集的同批次工业大麻不同部位花叶样本 DM-2019101801 ～ DM-2019101803）；乙腈、甲醇为色谱纯，磷酸为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 **1** 含量测定的色谱条件

色谱柱 Agilent Extend C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈：0.1%磷酸溶液（76 ∶ 24）；流速 1 ml/min；柱温 30 ℃；检测波长 220 nm；进样量 10 μl。

2.1.2 **2** 和 **3** 含量测定的色谱条件

流动相 A 为 0.1%磷酸溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—18 min，A 32%；18—20 min，A 32%—10%；20—28 min，A 10%；28—30 min，A 10%—32%；30—35 min，A 32%）；柱温 25 ℃；色谱柱、检测波长、流速和进样量同“**2.1.1**”项。

2.2 溶液配制

系列浓度标准溶液：精密量取 **1** 对照品 0.5 ml 于 5 ml 量瓶中，加入甲醇定容，作为 **1** 对照品贮备液，精密吸取 **1** 对照品贮备液适量，加入甲醇分别稀释至质量浓度为 0.1、0.05、0.02、0.01、0.005、0.002、0.001 mg/ml，得 **1** 标准溶液。另精密称取等量的 **2** 和 **3** 自制对照品置同一量瓶中，加入适量甲醇溶解并定容，作为混合对照品贮备液；精密吸取混合对照品贮备液适量，加入甲醇分别稀释至质量浓度（以 **2** 计）为 1.026、0.513、0.205、0.103、0.041、0.020 5、0.010 3 mg/ml，得 **2** 和 **3** 标准溶液。

对照品溶液：精密量取 **1** 对照品 0.2 ml 于 10 ml 量瓶中，加入甲醇定容，得质量浓度为 0.02 mg/ml 的 **1** 对照品溶液。分别精密称取适量 **2**、**3** 自制对照品，用甲醇溶解并稀释成质量浓度分别为 0.051 3、0.055 5 mg/ml 的 **2**、**3** 对照品溶液。

加样回收标准贮备液：精密量取 **1** 对照品 0.1 ml 置 10 ml 量瓶中，加入甲醇定容，得质量浓度为 0.01 mg/ml 的 **1** 标准贮备液。分别精密称取适量 **2**、**3** 自制对照品，用甲醇溶解并稀释成质量浓度分别为 0.077 9、0.222 0 mg/ml 的 **2**、**3** 标准贮备液。

供试品溶液：取工业大麻花叶样品粉末 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入甲醇 10 ml，超声提取 30 min，静置 30 min 至室温，用甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

取“**2.2**”项下 **1**、**2**、**3** 对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件连续进样 6 次，计算得 **1**、**2**、**3** 峰面积的 RSD（n=6）分别为 0.35%、0.07%、0.05%，理论塔板数均大于 12 000。

2.3.2 专属性试验

分别取甲醇和“**2.2**”项下的 **1**、**2**、**3** 对照品溶液，并取工业大麻花叶样品（批号 DM-20190909），按“**2.2**”项下方法制备相应的供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果见图 2（图 2A ～ 2C 为按“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定，图 2D ～ 2F 为按“**2.1.2**”项下色谱条件进样测定），可见甲醇对 **1**、**2**、**3** 的测定无干扰，表明该方法的专属性良好。

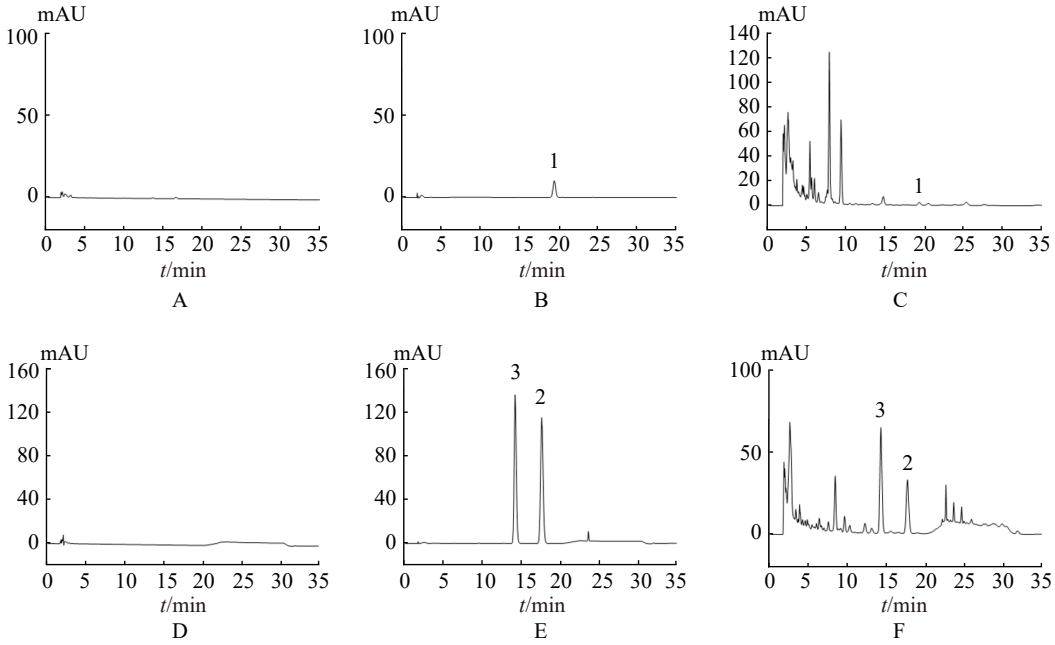
2.3.3 线性试验、检测限和定量限

分别取“**2.2**”项下的 **1** 标准溶液以及 **2** 和 **3** 标准溶液，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以质量浓度（c）为横坐标、峰面积（A）为纵坐标绘制标准曲线，所得回归方程及相关系数见表 1，**1** 在 0.001 ～ 0.1 mg/ml 内线性关系良好，**2** 和 **3** 在 0.01 ～ 1 mg/ml 内线性关系良好。

取“**2.2**”项下对照品溶液，用甲醇逐步稀释，以信噪比（S/N）为 10 和 3 时的进样质量为定量限（LOQ）和检测限（LOD），结果见表 1。

2.3.4 重复性和中间精密度试验

取同一批次工业大麻花叶样品（批号 DM-



A、D：甲醇，B、E：对照品溶液，C、F：供试品溶液

1－**1**；2－**2**；3－**3**

图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms

表 1　线性试验、LOD 和 LOQ 结果

Tab.1　Results of Linearity Test, LODs and LOQs

化合物	回归方程	*r*	LOD/ng	LOQ/ng
1	*A*=453.974 5*c* − 0.093 8	0.999 9	0.5	1.5
2	*A*=408.121 6*c* − 0.620 5	0.999 8	0.4	1.0
3	*A*=422.007 5*c* − 1.538 8	0.999 6	0.4	1.0

20190909）6 份，按“**2.2**”项下方法制备相应的供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法计算每份样品中 **1**、**2**、**3** 含量。结果显示，**1**、**2**、**3** 含量测定值的 RSD（*n*=6）分别为 4.23%、2.08%、1.82%，表明本方法重复性良好。

于不同日期、用不同仪器重复上述测定操作，按外标法计算每份样品中 **1**、**2**、**3** 的含量。结果显示 **1**、**2**、**3** 含量测定值的 RSD（*n*=6）分别为 8.09%、0.83%、1.55%，说明本方法中间精密度良好。

2.3.5　加样回收率试验

精密称取 9 份已知 **1**、**2**、**3** 含量的大麻花叶原料（批号 DM-20190909）0.1 g，分别置 10 ml 锥形瓶中，分别按不同加样水平（50%、100%、150%）加入 **1**、**2**、**3** 加样回收标准贮备液，按“**2.2**”项下供试品溶液配制方法制备不同水平的加样回收率试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法计算回收率。结果显示，不同加样水平（50%、100%、150%）条件下 **1**、**2**、**3** 的平均回收率（*n*=9）分别为 95.27%、102.19%、98.85%，RSD 分别为 5.22%、3.19%、1.69%。

2.3.6　耐用性试验

取“**2.2**”项下 **1**、**2**、**3** 对照品溶液和供试品溶液（批号 DM-20190909），分别考察柱温变化（±5 ℃）、流动相流速变化（±0.2 ml/min）、流动相中磷酸溶液浓度变化（±0.02%）、流动相比例变化（±3%）、色谱柱型号变化的情况下，对样品含量测定结果的影响。结果见表 2 和 3，当色谱参数发生小范围变动时，虽保留时间有一定变化，但不影响含量测定结果，表明方法耐用性良好。

2.3.7　稳定性试验

取“**2.2**”项下 **1**、**2**、**3** 对照品溶液和供试品溶液（批号 DM-20190909），置 10 ℃样品盘中，分别

表 2 1 的耐用性试验结果

Tab.2 Results of Durability Test of **1**

参数	参数值	保留时间/min	含量测定值/%
柱温	25 ℃	21.03	0.017
	35 ℃	17.69	0.018
流速	0.8 ml/min	24.02	0.020
	1.2 ml/min	16.13	0.020
磷酸溶液	0.08%	19.30	0.019
浓度	0.12%	19.27	0.018
流动相A	73%	24.80	0.014
比例	79%	15.39	0.015
色谱柱	Agilent 5 HC-C_{18}柱	23.84	0.015

表 3 2、3 的耐用性试验结果

Tab.3 Results of Durability Test of **2** and **3**

参数	参数值	保留时间/min		含量测定值/%	
		2	**3**	**2**	**3**
柱温	20 ℃	18.51	15.00	0.16	0.24
	30 ℃	16.93	13.57	0.16	0.23
流速	0.8 ml/min	21.59	17.77	0.16	0.24
	1.2 ml/min	14.84	11.95	0.17	0.25
磷酸溶液	0.08%	17.75	14.32	0.15	0.22
浓度	0.12%	17.72	14.26	0.12	0.22
流动相B	65%	23.35	18.61	0.17	0.24
比例	71%	14.14	11.53	0.16	0.24
色谱柱	Agilent 5 HC-C_{18}柱	21.51	18.10	0.18	0.22

于 0、2、4、6、8、12、24、36、48 h 时精密吸取 10 μl，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录相应峰面积，计算 RSD。结果显示，48 h 内供试品溶液中 **1**、**2**、**3** 峰面积的 RSD（n=9）分别为 0.97%、0.78%、0.58%，**1**、**2**、**3** 对照品溶液峰面积的 RSD（n=9）分别为 0.80%、0.58%、0.30%，表明对照品溶液和供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4 样品测定

分别取各批次工业大麻花叶样品，按“**2.2**”项下方法制备相应的供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以外标法计算各样品中 **1**、**2**、**3** 的含量，结果见表 4。

3 讨论

3.1 样品前处理方法的选择

制备供试品溶液时比较了加热回流和超声提取方法的提取效果，显示测定结果相近，故选择较为简便的超声提取。此外，比较了不同有机溶剂的提取效果，显示甲醇较佳，故使用甲醇作为样品提取溶剂，且观察到超声提取 30 min 即可达到最大提取效率。

表 4 样品测定结果

Tab.4 Content Determination Results of Samples

样品批号	含量/%			
	1	**2**	**3**	样品中**2**的总量[1)]
DM-Y-001	0.056	0.280	0.601	0.807
DM-Y-002	0.044	0.297	0.456	0.697
DM-Y-003	0.068	0.376	0.538	0.848
DM-Y-004	0.040	0.224	0.413	0.586
DM-20190909	0.012	0.192	0.302	0.457
DM-2019101801	0.016	0.414	0.234	0.619
DM-2019101802	0.042	0.433	0.884	1.208
DM-2019101803	0.035	0.406	0.637	0.965
DM-20191114	0.030	0.408	0.733	1.051

注：[1)] 样品中 **2** 的总量计算公式为：**2** 含量 +**3** 含量 × $\frac{M_{r(2)}}{M_{r(3)}}$

3.2 HPLC 方法确定

本实验室前期研究显示工业大麻花叶原料中的组分复杂，若采用 HPLC 法同时测定 **1**、**2**、**3** 含量，色谱分析时间较长。本研究采用等度洗脱法测定 **1**、梯度洗脱测定 **2** 和 **3**，分别实现了对管控物质 **1** 及可药用物质 **2** 和 **3** 的快速简便、准确可靠测定。在实际应用中，可针对工业大麻花叶原料的不同质量、控制目标和要求，选用相应的 HPLC 法。

3.3 工业大麻花叶原料中 **2** 的总量

试验结果显示，相同摩尔浓度的 **2** 和 **3**，其色谱响应值（即峰面积）存在一定差异，故分别采用对照品进行含量测定。工业大麻花叶原料中 **2** 来源包括 **2** 和 **3**，由于其相对分子质量不同，将测得的 **3** 含量折算成对应的 **2** 含量，能更准确地反映原料中可供利用的 **2** 的总量。

3.4 云南和黑龙江产工业大麻花叶原料中 **1**、**2**、**3** 含量的比较

样品测定结果显示，云南和黑龙江产工业大麻花叶原料中 **1** 的含量均低于 0.3%，符合国家对工业大麻的监管要求。本研究测定的云南和黑龙江工业大麻花叶原料样本均为 2019 年种植采收，其中 **3** 含量基本高于 **2**，提示其作为 **2** 的植物来源时，需考虑采用一定处理方法将 **3** 完全转化为 **2**，以保证资源的最有效利用。

参考文献：

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 223.

[2] 国家中药学管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 15.

[3] PERTWEE R G. Handbook of *Cannabis*[M]. UK: Oxford University Press, 2014: 13-17.

[4] ELSOHLY M A, SLADE D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids[J]. *Life Sci*, 2005, **78**(5): 539-548.

[5] SILVESTRO S, MAMMANA S, CAVALLI E, *et al*. Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: efficacy and security in clinical trials[J]. *Molecules*, 2019, **24**(8): 1459.

[6] CONSROE P. Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders[J]. *Neurobiol Dis*, 1998, **5**(6): 534-551.

[7] PRYCE G, RIDDALL D R, SELWOOD D L, *et al*. Neuroprotection in experimental autoimmune encephalomyelitis and progressive multiple sclerosis by *Cannabis*-based cannabinoids[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2015, **10**(2): 281-292.

[8] PAZOS M R, CINQUINAF V, GÓMEZ A, *et al*. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function[J]. *Neuropharmacology*, 2012, **63**(5): 776-783.

[9] CITTI C, PACCHETTI B, VANDELLI M A, *et al*. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil anddecarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA)[J]. *J pharm Biomed Anal*, 2017, **147**: 532-540.

[10] WANG M, WANG Y H, AVULA B, *et al*. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry[J]. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2016, **1**(1): 262-271.