

# Agilent Infinity II 1260 Prime/InfinityLab LC/MSD iQ LC/MS 시스템을 사용한 피토칸나비노이드 오일 정량

## 저자

Sue D'Antonio<sup>1</sup>, Guannan Li<sup>1</sup>,  
Anthony Macherone<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Agilent Technologies, Inc.

<sup>2</sup> The Johns Hopkins  
University School of  
Medicine, Baltimore,  
MD, USA

## 개요

대마초 또는 대마와 그 파생 상품에 존재하는  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid (THCA) 및 기타 피토칸나비노이드의 농도 측정은 규제 테스트와 법과학적 관점에서 매우 중요합니다. 그러나 필요한 결과와 정보에 관계 없이 이러한 분석 테스트는 본질적으로 동일합니다. 본 응용 자료에서는 애완동물용으로 제조된 CBD 오일 제품의 분석을 위해 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ와 Agilent Infinity II 1260 Prime LC 시스템을 결합하여 사용했으며, 그 결과로 얻어진 탁월한 크로마토그래피 분리능, 검출 한계(LOD) 및 정량 결과(LOQ)를 보여줍니다.

## 서론

전 세계적으로 대마 시장 규모는 2017년 기준 39억 달러로 추산되었으며, 대마 종자 부문은 2025년까지 “17.1%의 연평균 성장률(CAGR)”<sup>1</sup>로 성장할 것으로 전망되고 있습니다. 대마 산업의 영향을 받는 일부 시장에는 뉴트라슈티컬(기능 식품), 식품, 섬유, 건축 자재 및 개인 위생 용품이 포함됩니다. 또한 미국, 캐나다 및 기타 국가/지역에서 급성장 중인 기호용 및 약용 대마초 시장을 지원하기 위해 칸나비디올(비항정신성 칸나비노이드) 생산이 증가할 것으로 예상됩니다.

인터넷 사이트를 간단히 검색해 보아도 애완동물용으로 나와 있는 대마 및 CBD 오일 제품이 수백 종에 이릅니다. 현재 미국 농무부(USDA)에서는 대마 및 대마 제품의 총 THC 함량이 중량 기준 0.3% 미만인지 확인하기 위한 역가시험만을 요구합니다. 대부분의 규제 실험실에서는 다양한 제품에 존재하는 칸나비노이드의 분리 및 측정 시 UV 검출에 의한 HPLC를 사용합니다. 그러나, CBD 오일은 흔히 테르펜(terpene)과 같이 동시 용리되는 성분을 함유하고 있으며, 이들 성분은 UV 검출기를 사용할

경우 표적 칸나비노이드의 정확한 식별과 정량을 방해할 수 있습니다. 본 실험에서는 이러한 간섭을 완화하고 분석법의 전반적인 견고성을 크게 향상시키기 위해 질량 확인의 특이성을 더하는 방법으로 LC/MSD iQ를 추가 도입했습니다.

CBD 오일 및 관련 제품에 대한 관심이 증가함에 따라 제조업체, 유통업체 및 연구자들은 CBD 및 THC의 개별 농도, 그리고 다음과 같이 정의되는 총 THC 및 총 CBD 함량을 반드시 정확하게 측정해야 합니다.

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

공식 1.

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

공식 2.

여기서 [THCA]는 THC의 산(acid) 형태 유사체 농도이고 [CBDA]는 CBD의 산 형태 유사체 농도입니다. 여기서 유의해야 할 점은 *Cannabis sativa L.* 계통의 경우 THCA, CBDA 및 기타 산 형태의 피토칸나비노이드 생합성에 대해 인코딩되어 있고 THC, CBD 등은 수확, 건조 및 가열을 통해 생성된다는 것입니다.

## 실험

### 하드웨어 및 소프트웨어

Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 시스템은 모든 실험에 사용되었으며 다음 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1260 Infinity II Flexible 펌프 (G7104C)
- 1260 Infinity II 바이알 시료 주입기 (G7129A - 40µL 계량 장치와 20µL 루프 및 G7129C) - 통합 컬럼 격실 (3µL 히터; G7130-64430) 및 통합 시료 냉각기 포함
- 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 WR(G7115A)
- InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)

데이터 획득 및 데이터 처리에는 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어(버전 2.4)를 사용하였습니다.

## 데이터 수집

SIM 이온 이외의 모든 MSD 파라미터는 자동 수집 모드(Auto Acquire mode)를 사용하여 LC/MSD iQ에 의해 자동으로 설정되었습니다. 자동 수집 모드에서는 유속과 같은 HPLC 크로마토그래피 설정을 기반으로 MS 파라미터가 설정됩니다. 다음 표는 LC/MSD iQ 분석 파라미터를 보여줍니다.

표 1. HPLC 조건

| 파라미터   | 값  |
|--------|--|
| 유량     | 0.5mL/분  |
| 컬럼     | Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100mm, 1.9µm |
| 중지 시간  | 12.5분  |
| 사후 시간  | 3.0분   |
| 주입 부피  | 0.5µL  |
| 파장     | 228 및 270nm                                      |
| 샘플링 속도 | 40Hz   |

표 2. HPLC 이동상 그레디언트

| 시간  | (A) 100% H <sub>2</sub> O | (B) 100% ACN | (C) 100% MeOH | (D) 1mL 포름산 첨가 1L H <sub>2</sub> O |
|-----|---------------------------|--------------|---------------|------------------------------------|
| 0   | 25                        | 70           | 0             | 5                                  |
| 3.2 | 25                        | 70           | 0             | 5                                  |
| 8.2 | 5                         | 0            | 90            | 5                                  |

표 3. 자동 수집 모드(Auto Acquire mode)를 이용한 LC/MSD iQ 수집 설정

| 수집 모드     | 자동          |
|-----------|-------------|
| 튜닝 파일     | atunes.tune |
| 이온화원      | ESI         |
| 시간 필터 사용  | 켜짐          |
| 목표 포인트 사용 | 켜짐          |
| % SIM     | 50          |

표 4. LC/MSD iQ 전기분무 소스 조건

| 소스 파라미터   | 값       |
|-----------|---------|
| 가스 온도     | 325°C   |
| 가스 유량     | 13L/분   |
| Nebulizer | 55 psig |
| 캐필러리 전압   | 3,500   |

표 5. iQ SIM/스캔 파라미터

| 세그먼트 | 명칭             | M+H (m/z) | Fragmentor 전압(V) | 극성  |
|------|----------------|-----------|------------------|-----|
| SCAN |                | 200 ~ 700 | 100              | 양이온 |
| SIM  | THCA 및 CBDA    | 359.2     | 100              | 양이온 |
| SIM  | CBN            | 311.2     | 100              | 양이온 |
| SIM  | CBD, THC 및 CBC | 315.2     | 100              | 양이온 |
| SIM  | CBG            | 317.2     | 100              | 양이온 |
| SIM  | CBDV 및 THCV    | 359.2     | 110              | 양이온 |
| SIM  | CBGA           | 361.2     | 110              | 양이온 |

## 컬럼 및 공급품

표 6. 애질런트 공급품 및 주문 가능한 부품 번호.

| 소모품  | 부품 번호       |
|--|-------------|
| Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0mm × 100mm, 1.9µm | 695675-302  |
| 0.45µm 재생 셀룰로오스(RC) 시린지 필터                         | 5190-5107   |
| 포름산  | G2453-85060 |
| InfinityLab Ultrapure LCMS 물, 1L                   | 5191-4498   |
| InfinityLab Ultrapure LC/MS 등급 메탄올, 1L             | 5191-4497   |
| InfinityLab 아세토니트릴, 1L                             | 5191-4496   |
| 세라믹 균질기, 50mL 튜브, 100/pk                           | 5982-9313   |
| 5mL 일회용 시린지 100/pk                                 | 9301-6476   |

## 시료 전처리

균질화된 시료 100 $\mu$ L의 빈무게를 칭량한 10mL 메스 플라스크에 피펫으로 분주하고 시료 분취량의 중량을 정확하게 측정하여 기록했습니다. 5mL의 고순도 헥산을 플라스크에 첨가하고 마개를 막은 후 짧게 vortex 처리해 혼합하였습니다. 헥산을 플라스크의 10mL 눈금까지 첨가하고 플라스크를 다시 혼합했습니다(100배 희석). 희석된 오일 100 $\mu$ L를 새 바이알로 옮기고 900 $\mu$ L의 에탄올을 각각에 첨가했습니다. 바이알을 마개로 막고 짧게 혼합한 후 0.45 $\mu$ m 재생 셀룰로오스(RC) 시린지

필터로 여과한 다음, 분석을 위해 2mL 자동 시료 주입기 바이알로 옮겼습니다.

총 희석배수는 1,000배였습니다. 이 희석배수는 분석 중인 제품의 CBD 함량에 따라 높거나 낮출 수 있습니다.

0.1 또는 0.25 $\mu$ g/mL에서 50.0 $\mu$ g/mL까지의 범위에서 5가지 농도의 용매 기반 검량용액을 생성하기 위해 표 7에 나타난 11가지 칸나비노이드 혼합물을 연속 희석했습니다.

LOD 및 LOQ 측정을 위해 낮은 검량 농도에서 반복 주입을 시행했습니다.

공식 3을 사용해 중량/부피 단위 변환을 하였습니다.

## 결과 및 토의

Binary 펌프와 유사한 그레디언트 프로파일을 갖춘 1260 Infinity II Prime LC Quaternary 펌프는 4가지의 서로 다른 용매를 사용할 수 있습니다. 때문에 복잡한 이동상을 만들지 않아도 되고 용기를 빠르게 보충할 수 있습니다. 총 이동상의 5% 수준으로 D 채널(0.1% 포름산)을 사용하여 이온 강도와 UV 베이스라인 흡수가 일정하게 유지되었습니다. HPLC 펌프와 구성품의 압력 상한은 800-bar로, 1.9 $\mu$ m Poroshell 컬럼을 사용하여 더 작은 입자에 의한 분리의 이점을 활용할 수 있습니다. 이에 따라 분석 전반에 걸쳐 우수한 크로마토그래피 분리능을 얻을 수 있었습니다. 그림 1은 SIM 및 UV 크로마토그램을 보여줍니다. 표 8은 각 화합물에 대해 산출된 LOD 및 LOQ를 나타냅니다. LOD는 신호 대 잡음비 3:1에서, LOQ는 신호 대 잡음비 10:1에서 확인하였습니다. 마지막으로, 표 9는 시중에 판매되는 6가지 애완동물 제품에 대한 정량 결과를 보여줍니다.

표 7. 표적 칸나비노이드 및 머무름 시간(분)

| 화합물                                     | 약어              | 머무름 시간 |
|---|-----------------|--------|
| Cannabidivarin                          | CBDV            | 2.676  |
| Cannabidiolic acid                      | CBDA            | 3.693  |
| Cannabigerolic acid                     | CBGA            | 3.979  |
| Cannabigerol                            | CBG             | 4.267  |
| Cannabidiol                             | CBD             | 4.554  |
| Tetrahydrocannabivarin                  | THCV            | 4.941  |
| Cannabinol                              | CBN             | 7.198  |
| $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol        | $\Delta^9$ -THC | 8.290  |
| $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol        | $\Delta^8$ -THC | 8.590  |
| Cannabichromene                         | CBC             | 9.173  |
| $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid | THCA            | 9.795  |

$$\text{칸나비노이드 농도}(\% \frac{\text{wt}}{\text{wt}}) = \left[ \frac{\text{산출된 농도} * V * D}{M * 10,000} \right]$$

### 공식 3.

산출된 농도 = 선형 회귀 분석으로 얻은 분석물질의 농도( $\mu$ g/mL)

V = 시료 희석제의 초기 부피(mL)

D = 희석배수

M = 시료 질량(g)

10,000 =  $\mu$ g/g에서 % wt/wt로 변환

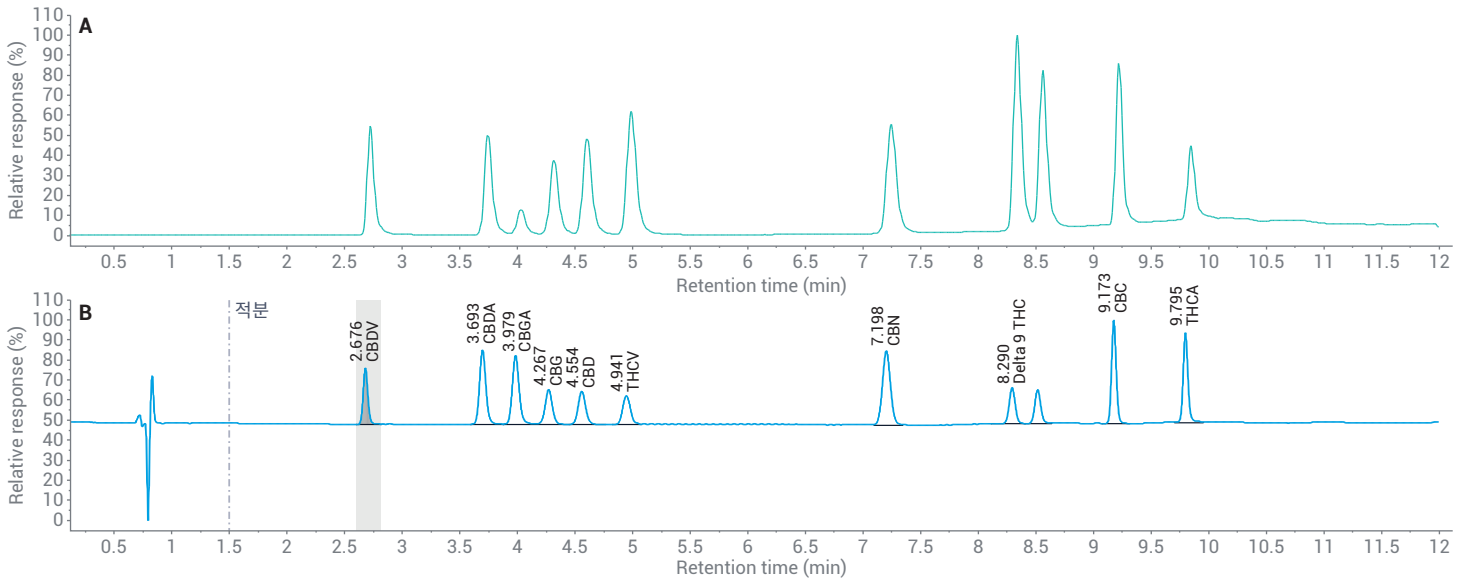


그림 1. 11-화합물 혼합물에 대한 정규화된 SIM TIC (A) 및 DAD 신호 (B). 농도 단위는  $\mu\text{g/mL}$ 임.

표 8. 검량 범위 0.1 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 에 대한 상관 계수( $R^2$ ) 및 LOD/LOQ 결과

| 화합물             | $R^2$ | LOD ( $\mu\text{g/mL}$ ) | LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----------------|-------|--------------------------|--------------------------|
| 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                     |
| $\Delta^9$ -THC | 0.990 | 0.10                     | 0.50                     |
| CBC             | 0.995 | 0.25                     | 0.50                     |
| THCA            | 0.995 | 0.25                     | 0.50                     |
| $\Delta^9$ -THC | 0.992 | 0.10                     | 0.25                     |

표 9. 애완동물용으로 시판되는 6가지 CBD 오일 정량 결과( $\mu\text{g/mL}$ )

| 시료 ID | CBD   | CBDA | THCA | $\Delta^9$ -THC | $\Delta^8$ -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   |

## 결론

애완동물용 CBD 오일과 같은 칸나비노이드 제품 분석 시 LC/MSD iQ 시스템과 1260 Infinity II Prime LC 시스템의 결합은 UV 검출만 사용하는 경우에 비해 향상된 선택성을 제공합니다. 이 연구에서 설명한 분석으로 6개 제품에서 11가지 칸나비노이드의 유무를 확인하였고, 발견된 칸나비노이드 모두에 대해서는 정확한 정량이 이루어졌습니다. 이러한 결과는 우수한 크로마토그래피 분리능과 더불어 각 표적 화합물에 대한  $m/z$  이온의 탁월한 질량 스펙트럼 확인을 통해 얻을 수 있었습니다. 이 분석법은 대마초 및 칸나비노이드 제품이 약용 또는 성인 기호용으로 합법화된 지역에서 규제 준수 테스트 수행 인증을 받은 실험실에 도입할 수 있으며, 미국 마약단속국 (US DEA)에 등록되어 USDA 지침에 따라 대마를 인증해야 하는 법과학 및 범죄수사학 실험실에서 구현할 수 있습니다.

## 참고문헌

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>.

표 10. 총 CBD 및 THC (% wt/wt)

| 시료 ID | 총 CBD (% wt/wt) | 총 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              |

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

애질런트 제품 및 솔루션은 주/국가 법률에 따라 사용이 허용되는 실험실에서 대마초 품질 관리 및 안전 시험에 사용하도록 설계되었습니다.

DE.3209953704

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020  
2020년 3월 31일, 한국에서 인쇄  
5994-1706KO

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울 특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)