

アプリケーションノート

四重極飛行時間型質量分析を UPLC および APGC と併用した、大麻栽培種のターゲット・ノントargetスクリーニングおよび区別のための戦略

Marian Twohig, Douglas M. Stevens, Steven Lai, Christopher J. Hudalla

Waters Corporation, ProVerde Laboratories



要約

このアプリケーションノートでは、大麻栽培種のケミカルプロファイリングのワークフローについて説明します。

アプリケーションのメリット

- LC および GC 分離、単一のインフォマティクスワークフロー、および HRMS システムを用いた大麻のプロファイリング
- プリカーサーイオンとプロダクトイオンによる精密質量データの同時収集を化合物ライブラリーと組み合わせて使用することで、化合物同定の信頼性が向上
- Progenesis QI により、カンナビスの複雑で多様な化学成分の調査が容易になります

はじめに

大麻の使用は、医療目的と娯楽目的の両方で増加して、一般に受け入れられつつあり¹、多くの国で安全で高品質の大麻製品にアクセスできるようにするための公式プログラムが実施されています。大麻は、慢性疼痛や発作性疾患など、さまざまな疾患の治療に有望な可能性が示されています²⁻⁴。大麻栽培種は、その化学組成がきわめて多様であり^{4~8}、栽培種の化学的多様性およびその治療効果やユーザー体験との関連を理解することが重要です。包括的なケミカルプロファイリングは、定量可能なマーカーを使用してアイデンティティーを確立するのに役立ち、これによって、ケミカルプロファイルと薬理効果を相互に関連付けることを目的とした、さまざまな植物化合物の区別が可能になります⁹⁻¹³。植物性カンナビノイドおよびテルペノイドのプロファイルを含むケミカルプロファイルに基づいて、大麻栽培種を分類する試みが行われてきました¹⁰⁻²¹。ケミカルプロファイル（ケモタイプ）のデータを遺伝子型決定と組み合わせて使用することにより、より詳細な情報が得られます^{20,21}。これらの特定のプロファイルは、植物に含まれる主要な活性成分と考えられ、大麻の有益な効果に大きく影響する相乗関係を発揮することが報告されているため、モニターされました¹⁵。

この試験では、大麻栽培種のケミカルプロファイリングのワークフローを実証します。ヘンプを含む 18 種の大麻の花のサンプルから抽出し、高分解能飛行時間型質量分析計（ToF-MS）を搭載した超高速高分離液体クロマトグラフィー（UPLC）および大気圧ガスクロマトグラフィー（APGC）を用いて分析しました（n=5）。これらのテクノロジーの組み合わせにより、分析の対象範囲が広がり、カンナビスやヘンプなどの複雑なサンプルの組成を調べるのに役立ちます。社内のカンナビノイドおよびテルペンのリファレンスデータベースを使用して、検出された化合物にアイデンティティーを割り当てました。これらのデータベースは、in-silico でおよび実験データから生成されました。マススペクトル情報は、利用可能な真正リファレンス標準試料の分析で生成された実験データによって裏付けられた、既知のカンナビノイドおよびテルペンの化学構造から予測されます。

データベースには分子イオンとフラグメントイオンの精密質量、同位体パターンが含まれており、リファレンス標

準試料が使用できる場合は、保持時間などの追加のクロマトグラフィー特性を用いて成分を同定します。主成分分析（PCA）などの多変量解析（MVA）を使用して、さまざまな大麻栽培種間の化学組成の差異を特定しました。

植物によって生産される化学成分の濃度は、光、土壌、植物の年齢、生長条件、収穫時期などの環境条件を含む多くの要因によって決まります^{14,22}。この試験では、植物化学に大きな影響を与えることが知られている環境変数のコントロールはできないことに、注意する必要があります。

実験方法

分析条件

カンナビノイドサンプルの前処理

16 種の化合物のカンナビノイド真正標準溶液（表 1）を組み合わせ、アセトニトリル中にストック溶液を作成しました。ヘンプを含む 18 の栽培種から大麻の花を集め、個別に均質化しました。均質化した植物材料（0.1 g）を 50 mL の遠心チューブ中に秤量しました。5 mL のアセトニトリルを添加し、Geno Grinder を用いて 2 分間サンプルを処理しました（1,000 rpm）。その後、サンプルを 5,000 rpm で 5 分間遠心処理しました。上清を除去し、UPLC-ToF-MS による分析に備えてさらに 1:10 に希釈しました。

名前	分子量	化学式	CAS
Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール（D9-THC）	314.2246	$C_{21}H_{30}O_2$	1972-08-03
Δ^8 -テトラヒドロカンナビノール（D8-THC）	314.2246	$C_{21}H_{30}O_2$	5957-75-5
Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール酸 A（THCA）	358.2144	$C_{22}H_{30}O_4$	23978-85-0
カンナビジオール（CBD）	314.2246	$C_{21}H_{30}O_2$	13956-29-1
カンナビジオール酸（CBDA）	358.2144	$C_{22}H_{30}O_4$	1244-58-2
カンナビゲロール（CBG）	316.2402	$C_{21}H_{32}O_2$	25654-31-3
カンナビゲロール酸（CBGA）	360.2301	$C_{22}H_{32}O_4$	25555-57-1
カンナビクロメン（CBC）	314.2246	$C_{21}H_{30}O_2$	20675-51-8
カンナビクロメン酸（CBCA）	358.2144	$C_{22}H_{30}O_4$	185505-15-1
テトラヒドロカンナビバリン（THCV）	286.1933	$C_{19}H_{26}O_2$	31262-37-0
テトラヒドロカンナビバリン酸（THCVA）	330.1831	$C_{20}H_{26}O_4$	39986-26-0
カンナビジバリン（CBDV）	286.1933	$C_{19}H_{26}O_2$	24274-48-4
カンナビジバリン酸（CBDVA）	330.1831	$C_{20}H_{26}O_4$	31932-13-5
カンナビシクロール（CBL）	314.2246	$C_{21}H_{30}O_2$	21366-63-2
カンナビシクロール酸（CBLA）	358.2144	$C_{22}H_{30}O_4$	40524-99-0
カンナビノール（CBN）	310.1933	$C_{21}H_{26}O_2$	521-35-7

表 1. この試験で分析したターゲットカンナビノイドの名前、分子量、元素組成、精密質量、CAS 番号

テルペンサンプルの前処理

イソプロパノール中に 23 種のテルペンが含まれている標準混合物（表 2）を使用して、テルペン分析用のストッ

ク溶液を作成しました。0.1 g の均質化した植物材料を 20 mL のシンチレーションバイアルに秤量しました。このバイアルに酢酸エチル 5 ミリリットルを追加しました。超音波処理を 15 分間行った後、得られた約 4 mL の抽出物を 4 mL のアンバー色のバイアルに移しました。サンプルを遠心分離し、GC-MS による分析のために一部を 2 mL オートサンプラーバイアルに移しました。このサンプル前処理手順は、さまざまな抽出溶媒の調査および GC-MS を使用した分析法バリデーションを記載した最近の文献からのものを採用しています²³。

名前	分子量	化学式	CAS
α-ピネン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	80-56-8
カンフェン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	79-92-5
(-)-β-ピネン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	18172-67-3
β-ミルセン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	123-35-3
δ-3-カレン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	13466-78-9
α-テルピネン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	99-86-5
π-シメン	134.1096	C ₁₀ H ₁₄	99-87-6
δ-リモネン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	5989-27-5
オシメン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	13877-91-3
γ-テルピネン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	99-85-4
テルピノレン	136.1252	C ₁₀ H ₁₆	586-62-9
リナロール	154.1358	C ₁₀ H ₁₈ O	78-70-6
(-)-イソプレゴール	154.1358	C ₁₀ H ₁₈ O	89-79-2
ゲラニオール	154.1358	C ₁₀ H ₁₈ O	106-24-1
β-カリオフィレン	204.1878	C ₁₅ H ₂₄	87-44-5
α-フムレン	204.1878	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6
ネオリドール	223.2062	C ₁₅ H ₂₆ O	7212-44-4
(-)-グアイオール	223.2062	C ₁₅ H ₂₆ O	489-86-1
(-)-α-ビスボロール	223.2062	C ₁₅ H ₂₆ O	23089-26-1
(-)-カリオフィレンオキシド	221.1905	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6
ユーカリプトール	154.1358	C ₁₀ H ₁₈ O	470-82-6

表 2. 本試験で分析したターゲットのカンナビノイドおよびテルペンの名前、CAS 番号、別名

装置およびソフトウェア

LC 分離は、ACQUITY UPLC I-Class システムおよび Xevo G2-XS QToF 質量分析計で行いました。データ取り込みには、MassLynx ソフトウェアを使用しました。データ解析および MVA には、Progenesis QI および EZinfo を使用しました²⁴。

UPLC 分析条件

カラム:	ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl* 2.1×100 mm、1.7 μm
移動相 A:	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B:	0.1% ギ酸含有アセトニトリル
流速:	0.600 mL/分
カラム温度:	30 °C
注入量:	1 μL

グラジエント

時間 (分)	%A	%B	曲線
0.0	45%	55%	–
6.0	40%	60%	6
9.0	20%	80%	6
10.0	1%	99%	6
13.0	1%	99%	6
13.1	45%	55%	1

*データ取り込みおよびクロマトグラフィー特性のさらなる評価の後、CORTECS C₁₈（製品番号：[186007096](#)）で分離を行ったところ、この試験で使用した真正カンナビノイド標準試料の優れた分離が得られることがわかりました³¹。

Xevo G2-XS QToF 条件

測定モード：	MS ^E 感度モード
開始質量および終了質量：	100 ～ 1200 Da
イオン化モード：	ESI+
キャピラリー電圧：	3.5 kV
コーン電圧：	25 V
コリジョンエネルギーランプ：	15 ～ 35 eV
脱溶媒温度：	400 °C

イオン源温度：100 °C

脱溶媒ガス流量：800 (L/時間)

コーンガス：50 (L/時間)

APGC 分析条件

GC：Agilent 7890B、7693A オートサンプラー付き

カラム：Restek Rxi-5MS、20 m × 内径 0.18 mm × 0.18 μm フィルム

キャリアガス：ヘリウム 0.4 mL/分

注入：1 μL、スプリット 20:1、275 °C で、
ウールが含まれている内径 4 mm のストレートイン
レットライナーを使用

溶媒遅延：4.0 分

GC 昇温プログラム

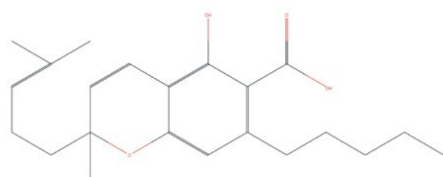
昇温速度 (°C/分)	温度 (°C)	ホールド (分)
–	40	3.0
12	180	0.0
50	325	6.0
合計分析時間 = 23.57 分		

Xevo G2-XS QToF 条件

測定モード:	MS ^E 感度モード
質量範囲:	40～500 Da
イオン化:	APGC+ プロトン化モード（水を使用）
コロナ電流:	2.0 μ A
コーン電圧:	20 V
コーンガス:	窒素 100 L/時間
メイクアップガス:	窒素 400 L/時間
補助ガス:	窒素 150 L/時間
トランスファーライン:	300 °C
イオン源温度:	150 °C
コリジョンエネルギーランプ:	10 ～ 40 eV

ライブラリーの生成

MS^E として知られているデータインディペンデント取得モードを使用して、単一の注入でプリカーサーイオンおよびプロダクトイオンからの精密質量測定値を収集しました。複数の特性を使用してサイエンスライブラリーまたはデータベースのエントリを検索すると、疑陽性の発生率が大幅に減少し、結果の信頼性が大幅に向上します。使用できる真正標準試料の分析による解析データファイルを、類縁物質の構造の .mol ファイルと併用して、対象化合物のカスタムデータベースを作成しました。保持時間と精密質量の情報は、Progenesis QI レポートから収集できます（図 1）。レファレンス標準試料を使用できなかった化合物の追加の構造をライブラリーに追加し、カンナビノイドと類縁物質の総数が 120 を超えました。カンナビノイドおよびテルペンの化合物クラスには異性体が多数存在し、さらに、多くの場合構造的特徴が類似しているため、フラグメンテーションやクロマトグラフィーの保持時間などの特定の情報が含まれているデータベースが、ターゲットを絞った試験およびターゲットを絞らない試験の両方に役に立ちます。追加のデータベースには、ChemSpider (www.chemspider.com < <http://www.chemspider.com/>> 英国王立化学会) からアクセスできます。



フラグメントデータベース

追加のプロパティー

CBC
ID: CBC
Formula: C ₂₁ H ₃₀ O ₂
Neutral mass: 314.2246
CBC-A
ID: CBC-A
Formula: C ₂₂ H ₃₀ O ₄
Neutral mass: 358.2144
CBD
ID: CBD
Formula: C ₂₁ H ₃₀ O ₂
Neutral mass: 314.2246
CBD-A
ID: CBD-A
Formula: C ₂₂ H ₃₀ O ₄
Neutral mass: 358.2144
CBDVA
ID: CBDVA
Formula: C ₂₀ H ₂₆ O ₄
Neutral mass: 330.1831

Export fragment database			Export additional compound properties		
Select the compounds whose spectra you want			Select the compounds whose additional properties you want		
☒ Compounds with accepted IDs ☐ All compounds					
Compound	Accepted ID	Adducts	Compound	Accepted ID	Retention Time
☒ 2.26_287.2016m/z	CBDV	M+H	☒ 2.26_287.2016m/z	CBDV	2.26
☒ 3.06_287.2014m/z	THCV	M+H	☒ 3.06_287.2014m/z	THCV	3.06
☒ 3.67_315.2324m/z	CBD	M+H	☒ 3.67_315.2324m/z	CBD	3.67
☒ 3.78_330.1834n	CBDVA	M+H, M+	☒ 3.78_330.1834n	CBDVA	3.78
☒ 3.97_317.2478m/z	CBG	M+H	☒ 3.97_317.2478m/z	CBG	3.97
☒ 4.63_311.2008m/z	CBN	M+H	☒ 4.63_311.2008m/z	CBN	4.63
☒ 5.05_315.2327m/z	d9_THC	M+H	☒ 5.05_315.2327m/z	d9_THC	5.05
☒ 5.23_315.2326m/z	d8_THC	M+H	☒ 5.23_315.2326m/z	d8_THC	5.23
☒ 5.59_315.2325m/z	CBL	M+H	☒ 5.59_315.2325m/z	CBL	5.59
☒ 5.99_315.2323m/z	CBC	M+H	☒ 5.99_315.2323m/z	CBC	5.99
☒ 6.03_331.1907m/z	THCVA	M+H	☒ 6.03_331.1907m/z	THCVA	6.03
☒ 6.30_358.2148n	CBDA	M+H, M+	☒ 6.30_358.2148n	CBDA	6.30
☒ 7.25_361.2381m/z	CBGA	M+H	☒ 7.25_361.2381m/z	CBGA	7.25
☒ 8.38_359.2220m/z	THCA	M+H	☒ 8.38_359.2220m/z	THCA	8.38
☒ 8.74_359.2219m/z	CBLA	M+H	☒ 8.74_359.2219m/z	CBLA	8.74

図 1. CBCA のデータベースエントリーおよびフラグメントと追加の化合物特性のデータベースの例

結果および考察

カンナビノイドの UPLC-Tof/MS 分析

16 種のカンナビノイドの真正標準試料を、最初のターゲット成分として使用しました。図 2 に示すクロマトグラフィー分離を使用して、混合物中の各カンナビノイドを同定できます。

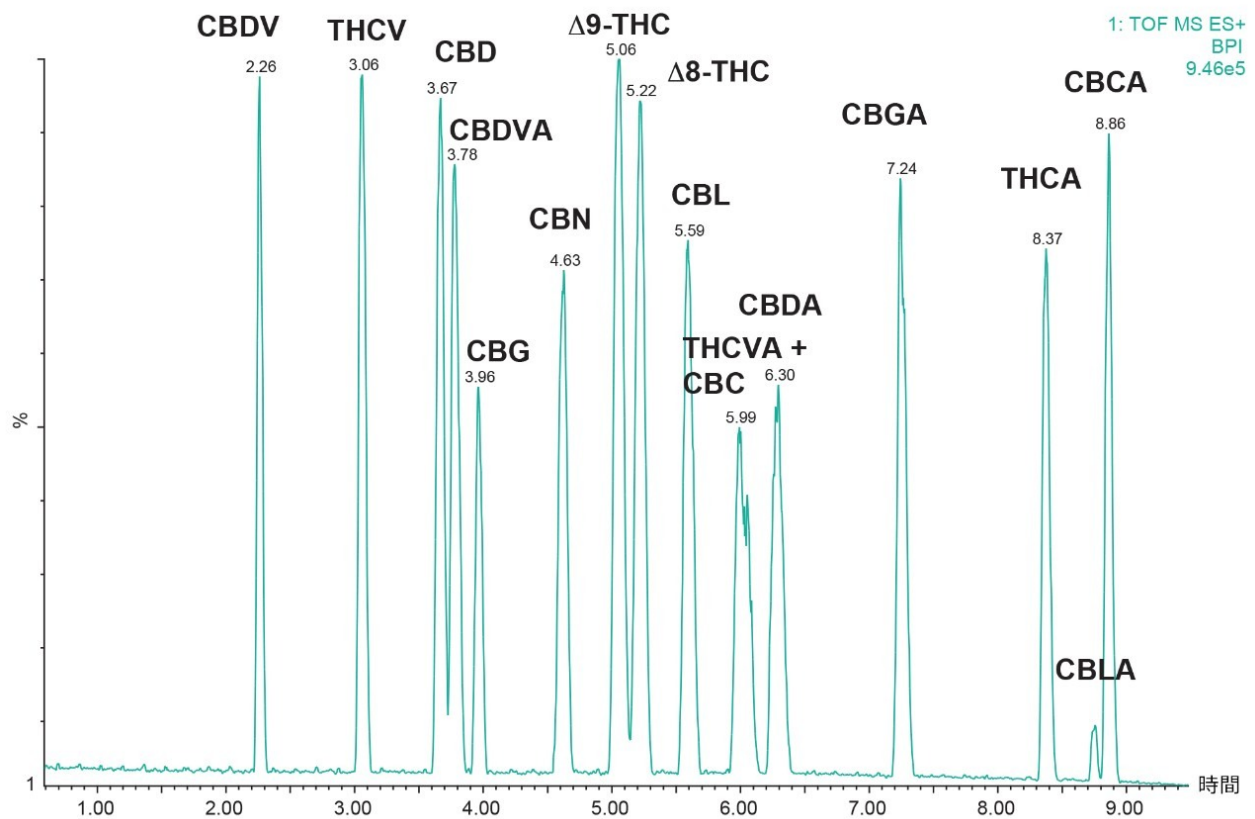


図 2. この試験で分析した 16 種のカンナビノイド真正標準混合物のベースピーク強度クロマトグラム (1 μ L 注入)

大麻栽培種の区別

主成分分析 (PCA) を使用して、テルペンおよびカンナビノイドのプロファイルから得られた情報の概要を示し、観察されたパターンをまとめました²⁴。大麻栽培種 (ヘンプを含む) の UPLC-Tof-MS 分析の PCA プロットが図 3 に示されています。

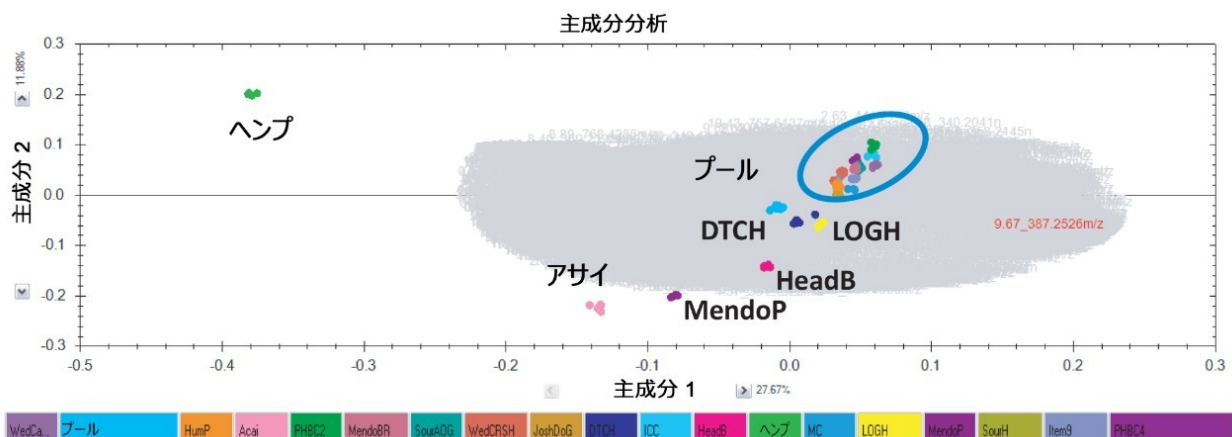


図 3. 大麻栽培種（ヘンプを含む）の UPLC-MS 分析の PCA プロット。各栽培品種は異なる色で示されています。

図 3 の中の栽培種のクラスター（青色の楕円で強調表示）が PCA データで観察されました。その他のいくつかのバリエントは分離されており、化学的に明確に異なることが示されています。観察された主な差異は、プロットの左側のヘンプ（高 CBD 含量で低 Δ^9 -THC 含量のバリエント）と右側の高 Δ^9 -THC 含量の栽培種（ Δ^9 -THC 含有量がより高い）の差異です。ヘンプグループを除くと図 4 のパターンになり、各薬物タイプの栽培種が明確に区別されます。Mendo Purps、HumP、アサイの栽培種は最も明確です。

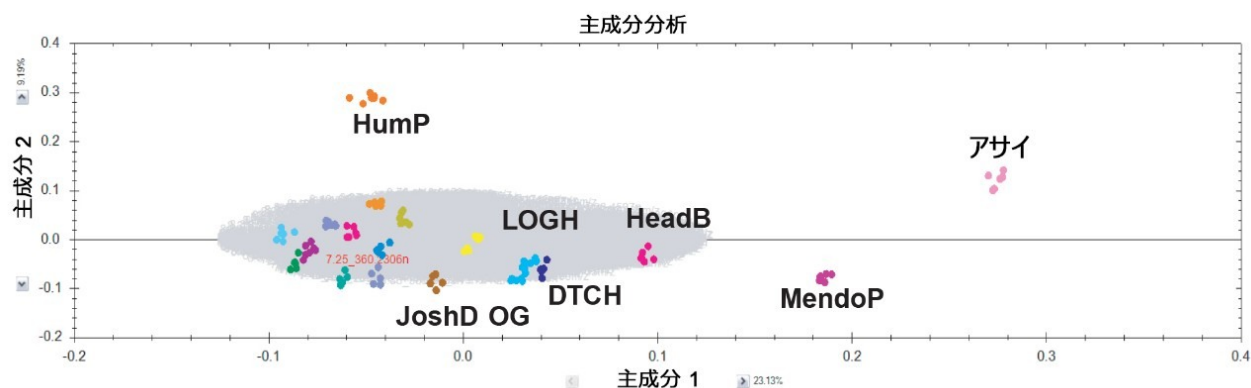


図 4. ヘンプを除く大麻栽培種の UPLC-MS 分析の PCA プロット

CBG の同定および存在量プロファイル

CBG は非向精神性カンナビノイドであり、その潜在的な治療特性が薬理学的な関心を集めてきました^{25,26}。CBG は、構造、追加特性、フラグメントデータベースを用いて同定されてきました。元素組成 $C_{21}H_{32}O_2$ ($(M+H)^+$ 317.2477) が提案されています。質量誤差、保持時間誤差、同位体類似性も良好であり、同定の信頼性を高めています（図 5）。

Find a compound

Filter compoundsFilter is active

Help

Compound	N	m/z	z	Retention time	Peak Width	Tag	Accepted ID	Identifications	Anova (p)	q Value	Max fold change	Highest mean	Lowest mean	Isotope distribution	Max Abundance	Min CV%	Description
6.28_359.2218m/z	<	359.2218	1	6.28	0.34		CBD-A	4	< 1.1E-16	< 1.1E-16	216	Hemp	Acai		376097.2637	0.25	CBD-A
2.27_287.2012m/z	<	287.2012	1	2.27	0.16		CBDV	7	< 1.1E-16	< 1.1E-16	Infinity	Hemp	WedCake		1463.6017	4.61	OC1C=C(CCC)C=C(C=C1)C
3.79_330.1835n	33	331.1908	1	3.79	0.20		CBDVA	5	< 1.1E-16	< 1.1E-16	Infinity	Hemp	MendoBR		697.4288	7.50	CBDVA
3.96_317.2480m/z	<	317.2480	1	3.96	0.24		CBG	1	< 1.1E-16	< 1.1E-16	6.15	MendoP	Acai		25622.7685	1.59	CBG
7.25_361.2378m/z	<	361.2378	1	7.25	0.33		CBGA	1	< 1.1E-16	< 1.1E-16	38.3	LOGH	Hemp		55364.0845	1.25	CBGA
4.62_311.2006m/z	<	311.2006	1	4.62	0.21		CBN	4	< 1.1E-16	< 1.1E-16	114	Acai	ICC		20204.7942	2.23	CBN
5.06_315.2323m/z	<	315.2323	1	5.06	0.65		d9-THC	7	< 1.1E-16	< 1.1E-16	5.81	Acai	Hemp		507733.9556	1.68	d9-THC

Compound 3.96_317.2480m/z

Compound abundance

Possible identifications

3D Montage

Possible identifications: 1

Compound ID	Description	Adducts	Formula	Retention time	Score	Fragmentation score	Mass error (ppm)	Retention time error (mins)	Isotope similarity
CBG	CBG	M+H	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	3.97	A 75.2	A 90.1	1.53	-6.57e-003	96.43

図 7. 化合物レビューには、同定されたカンナビノイドおよびその他の特性に関するデータのサマリーが示されています。

拡張 MVA の場合、Progenesis QI によって EZinfo にデータをエクスポートすることができ、そこでは、検出されたカンナビノイドのローディングバイプロットが観察されます（図 8）。このプロットにより、観察結果の傾向と類似性が明らかになります。 Δ^9 -THC および THCV のマーカーは、左上の四分円の方向に向いています。UPLC/UV を用いた効力実験では（データは示されていません）、左上の四分円の栽培種は圧倒的に重量 0.91 ~ 2.97% の高 Δ^9 -THC レベルであることがわかり、左下の四分円に向かう傾向の栽培種の大部分では THCA の含有量がより高いことがわかりました。さらに、カンナビノイドのマーカーである THCVA、CBCA、CBGA、CBG がこの四分円の中に示されており、これらの栽培種でこれらのカンナビノイドがより高含量に発現していることが示されています。プロットの右側でヘンプグループに向かって、カンナビノイドの CBD、CBDA、CBDV がクラスターを形成しています。 Δ^9 -THC の代謝物である CBN が上側の四分円に観察されました。これは、プロットのこのセクションの栽培種が老化していたか、その形成の原因となる保管条件にさらされた可能性を示しています¹³。

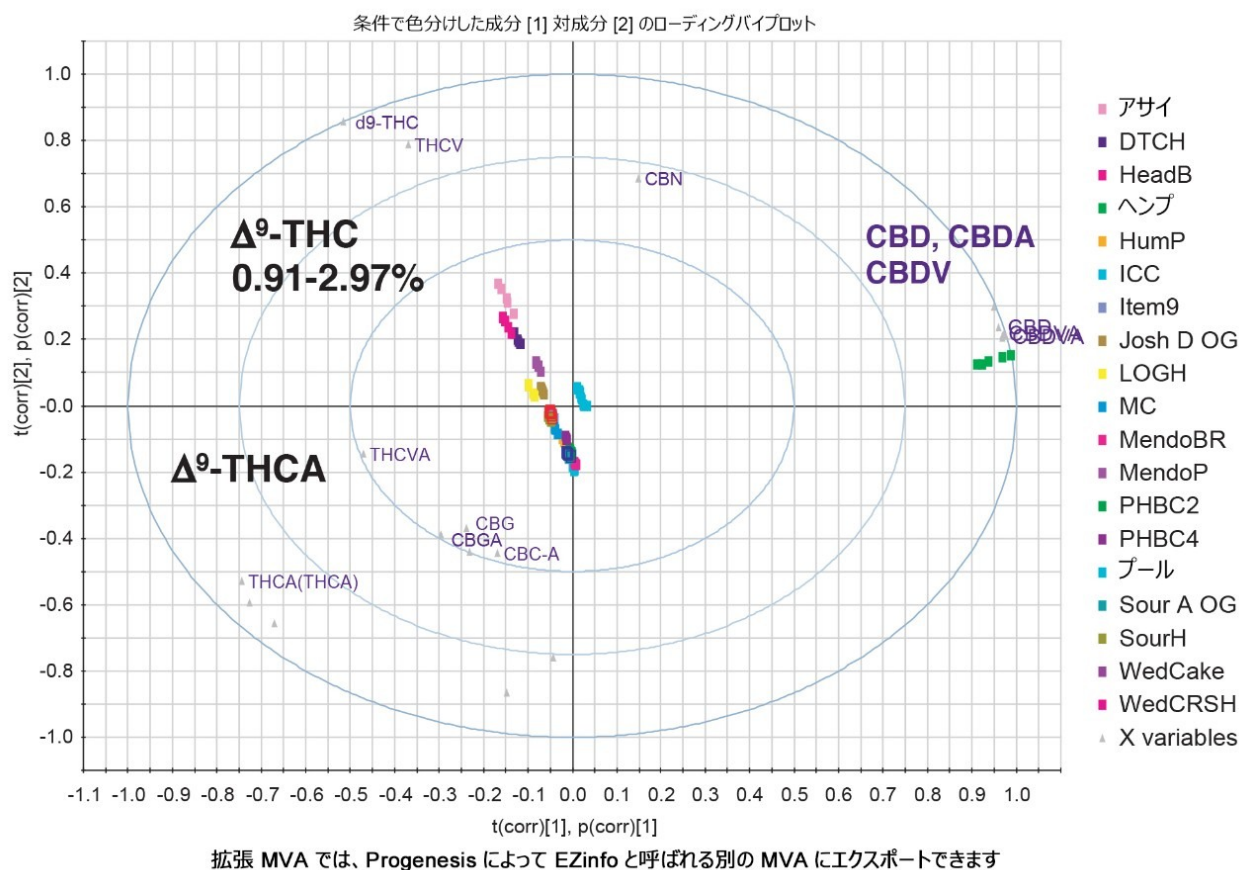


図 8. 同定されたカンナビノイドマーカを示すローディングバイプロット

ローディングプロット (A) を使用して、栽培種間の関係を示すスコアプロット (B) で観察されるパターンを解釈できます²⁴。同定されたカンナビノイド (CBGA、THCA、Δ⁹-THC) を最も明確に区別する化学的な相違が、ローディングプロットで観察できます。CBGA の発現量が多い栽培種は、右上の四分円に見られます。意味のある未知の対象マーカは、Progenesis Q1 にインポートして戻すことができます。ニュートラル質量 374.2463 で 9.20 分に溶出する未知成分 9.20_374.2463n (赤色の楕円で強調表示) が、左下の四分円で栽培種 Josh D OG の方向に認められました (図 9A および B)。

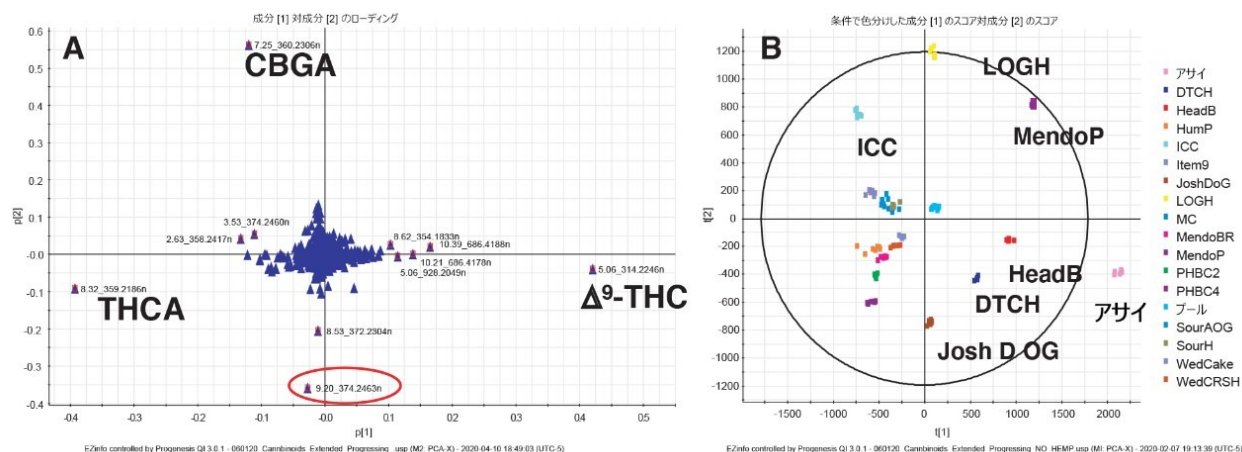


図 9. 実験からヘンプを除いたときのデータの傾向を示す、ローディングプロット (A) およびスコアプロット (B)

成分を、EZinfo のローディングプロットから Progenesis Q1 にインポートし、さらに評価しました。社内データベースに対してマーカーを検索すると、元素組成 $C_{23}H_{34}O_4$ の化合物 4 種類が提示され、それぞれの提示について、スコアと理論上のフラグメンテーションに基づいてランク付けしました (図 10)。この同定をさらに確認するための真正標準化合物は、入手できませんでした。別のネガティブイオン ESI 実験で、この成分の 3 つの主要な精密質量フラグメント (m/z 329.2486 の $C_{22}H_{33}O_2$ 、 m/z 245.1547 の $C_{16}H_{21}O_2$ 、 m/z 191.1077 の $C_{12}H_{15}O_2$) が観察され (データは示されていません)、以前に報告されている同一の報告済み元素組成の、名前がまだ付けられていないカンナビノイドと一致する可能性がありました¹⁴。

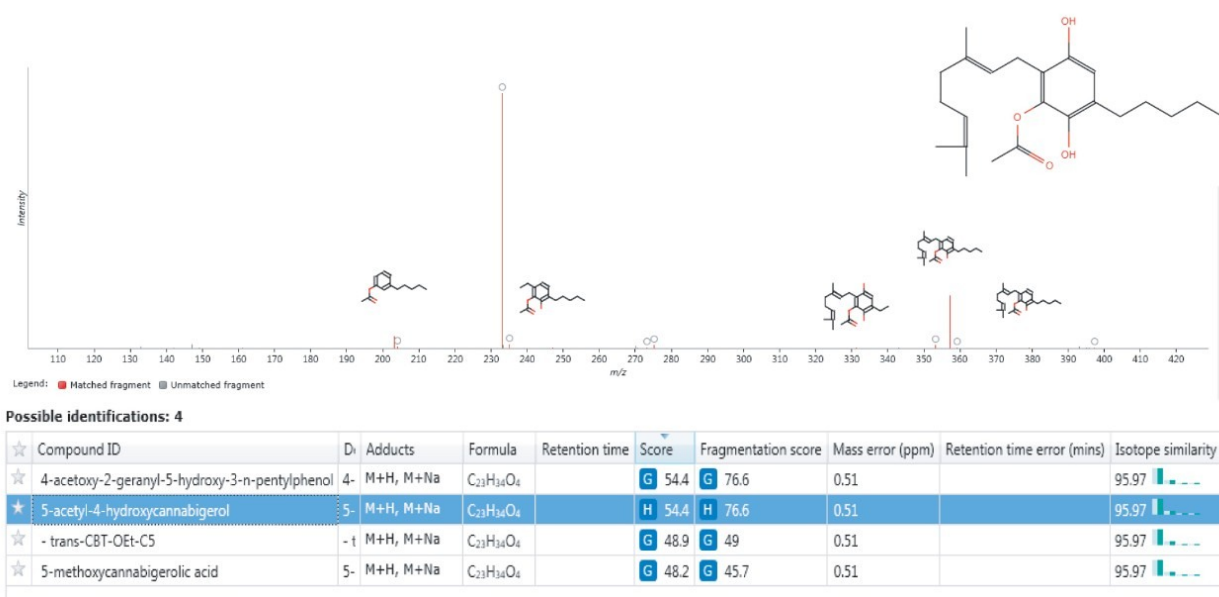


図 10. 元素組成 $C_{23}H_{34}O_4$ の成分について、カンナビノイドデータベースを検索した結果

この成分の存在量プロファイルが図 11 に示されています。栽培種 JoshD OG では最大平均値、栽培種 HumP では最小平均値が検出され、最大変動率は 409 でした。

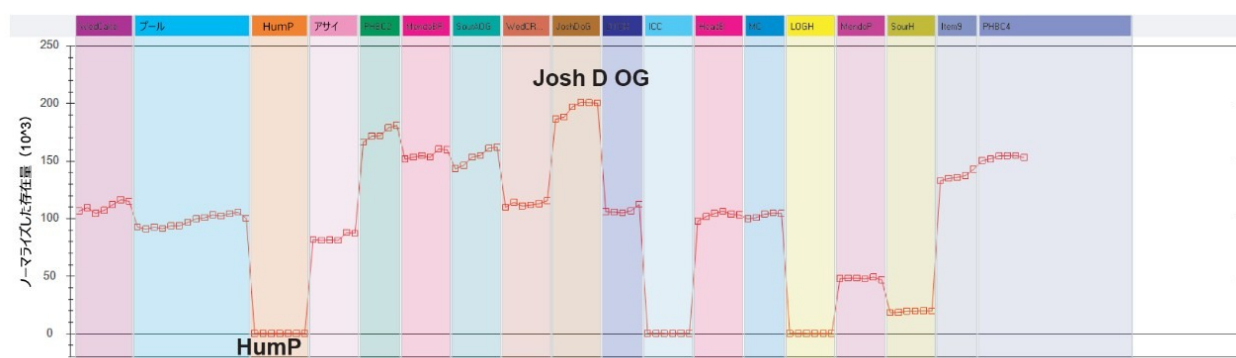


図 11. 試験サンプルにわたる未知成分 9.20_374.2463n の相対的な挙動の差異を示す存在量プロファイルプロット

ローディングデータで強調されているその他の重要な成分には、8.62 分に溶出するニュートラル質量 354.1833n の CBNA が含まれました。これはその後、真正標準試料を使用して確認されました。8.53 分に溶出し、ニュートラル質量 372.2304n および元素組成 $C_{23}H_{32}O_4$ が提案された成分は、データベースエントリーを使用して 2-アセトキシカンナビクロメンとして仮同定されました^{8,28}。この提案は、使用可能なデータベースエントリーに基づいて行われました。明確な同定には、真正標準試料を使用する確認や、NMR が後続する単離を含むさらなる試験が必要と思われます。

大麻栽培種はケミカルプロファイルが多様であるため、成分のターゲットリストを Progenesis Q1 ソフトウェア内で作成し、これをその後のターゲットを絞った同定および区別に使用することができます。

テルペンの APGC-Tof-MS 分析

テルペンは、大麻の特性や効果に大きな影響を与えると同時に、多くの生物学的機能にも関与すると報告されています^{15,29}。テルペンのプロファイルを用いた大麻栽培種の化学分類学的区別が、以前に試みられました^{13,15-21}。

カンナビノイドの多様性の特性解析に使用されたのと同じワークフローが、テルペンに使用されました。セスキテルペンからモノテルペンを分離するために、GC 分離法が開発されました（図 12）³⁰。真正テルペン標準試料の分析から得られた情報を使用して、フラグメンテーションおよび保持時間のデータベースを生成し、これを構造データベースと組み合わせて使用し、同定の信頼性を高めました。

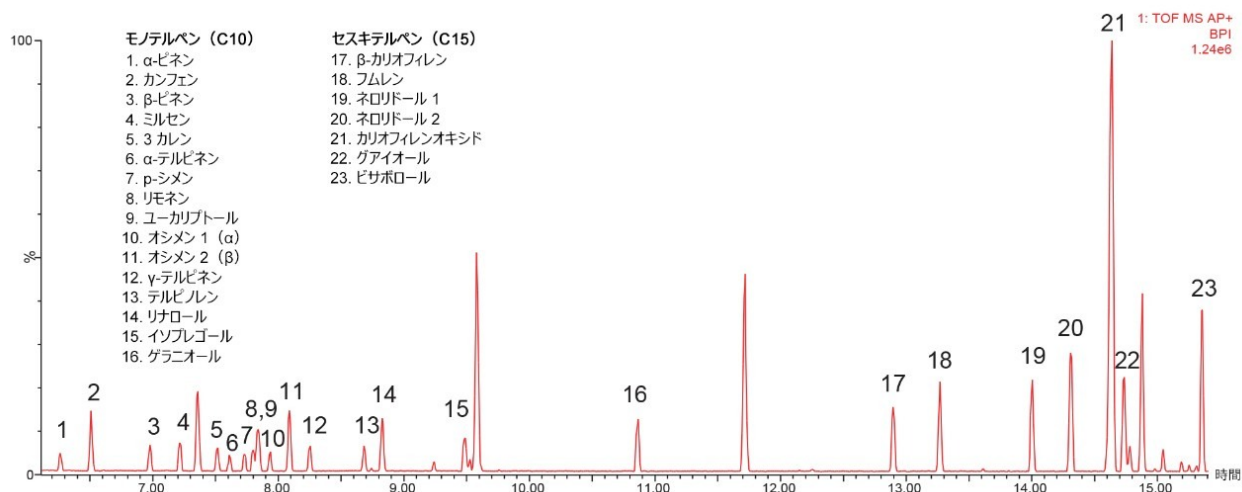


図 12. この試験で分析した 23 種のテルペンの真正標準試料混合物のベースピーク強度クロマトグラム (BPI) (1 μL 注入)

栽培種 LOGH、HumP、ICC、Acai、Hemp、Mendo P、SourAOG は、PCA データで化学的に明確に異なるグループにクラスター化されます(図 13)。ローディングプロットを使用して、明確に異なるグループの相違を説明できます (データは示されていません)。

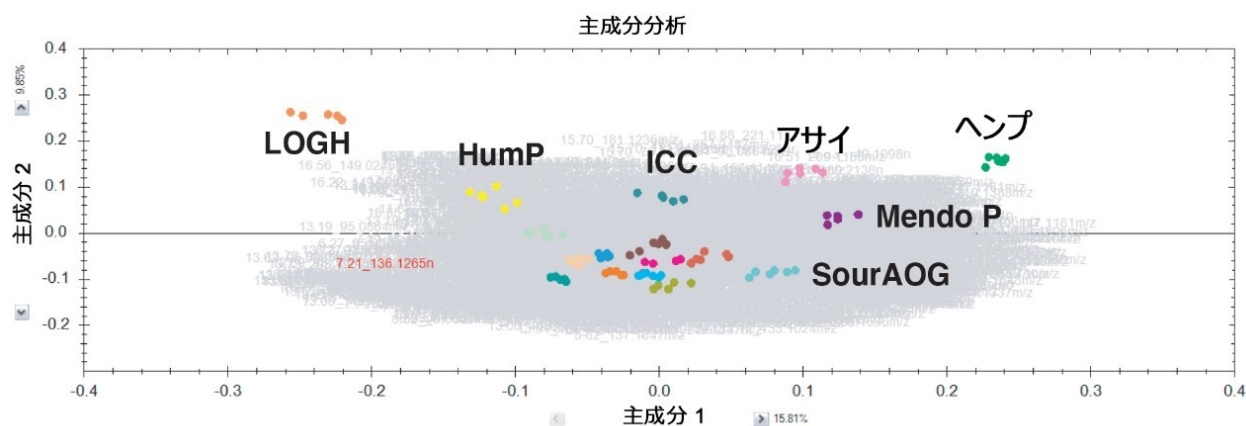


図 13. 大麻栽培種の APGC-MS 分析の PCA プロット

[Review Compounds] (化合物のレビュー) 画面に、ライブラリーを使用して同定されたターゲットテルペンに関する情報が表示されます。β-ミルセンの発現量は、栽培種 SourH で最も高く、ヘンプで最も低くなりました (図 14)。

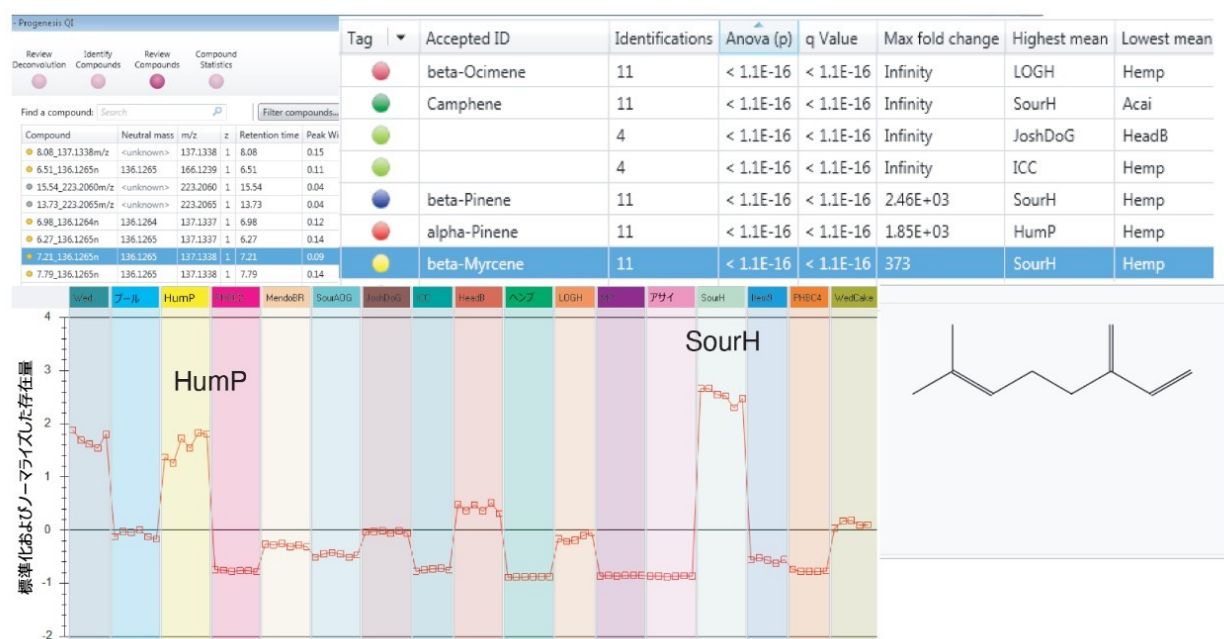


図 14. [Review Compounds]（化合物のレビュー）で、同定されたテルペンのデータおよびその他の特性のサマリーが提供されています。

相関性分析により、サンプルを共通の特性を共有するグループに分離して、抽出した大麻サンプル中のテルペン/カンナビノイドの存在量プロファイルの間の関係の評価を容易にする手段が提供されます。β-ピネン、β-ミルセン、α-ピネンの存在量プロファイル間の相関性が、栽培種 HumP、HeadB、LOGH、SourH で観察されました（図 15）。

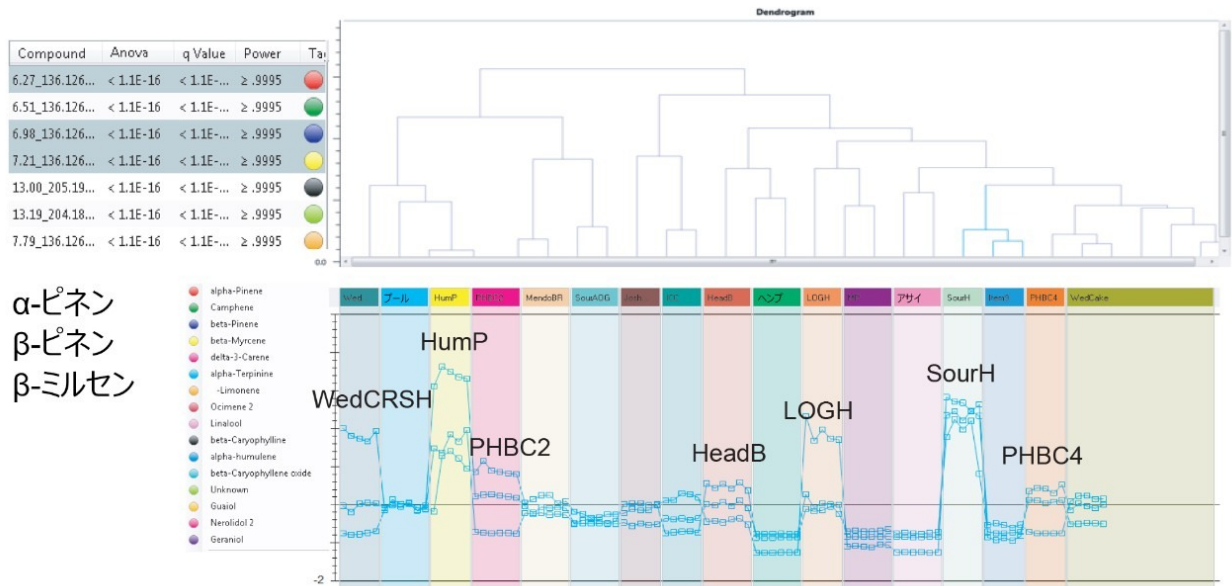


図 15. 大麻栽培種にわたる β -ピネン、 β -ミルセン、 α -ピネンの標準化した存在量プロファイルの類似性を示す相関性分析

ローディングバイプロットでは、プロットの右側（ヘンプのグループとは反対側）にある栽培種に対して強い関連性がある、テルペンマーカースelectionしています。栽培種 LOGH、SourH、MendoBr は、モノテルペンである β -ピネン、 β -オシメン、 α -テルピネン、 γ -テルピネン、テルピノレン、d-3-カレンとより強く関連しています（図 16）。栽培種 HumP では、テルペンである α -ミルセン、 α -ピネン、カリオフィレンオキシドの発現量が多くなりました。

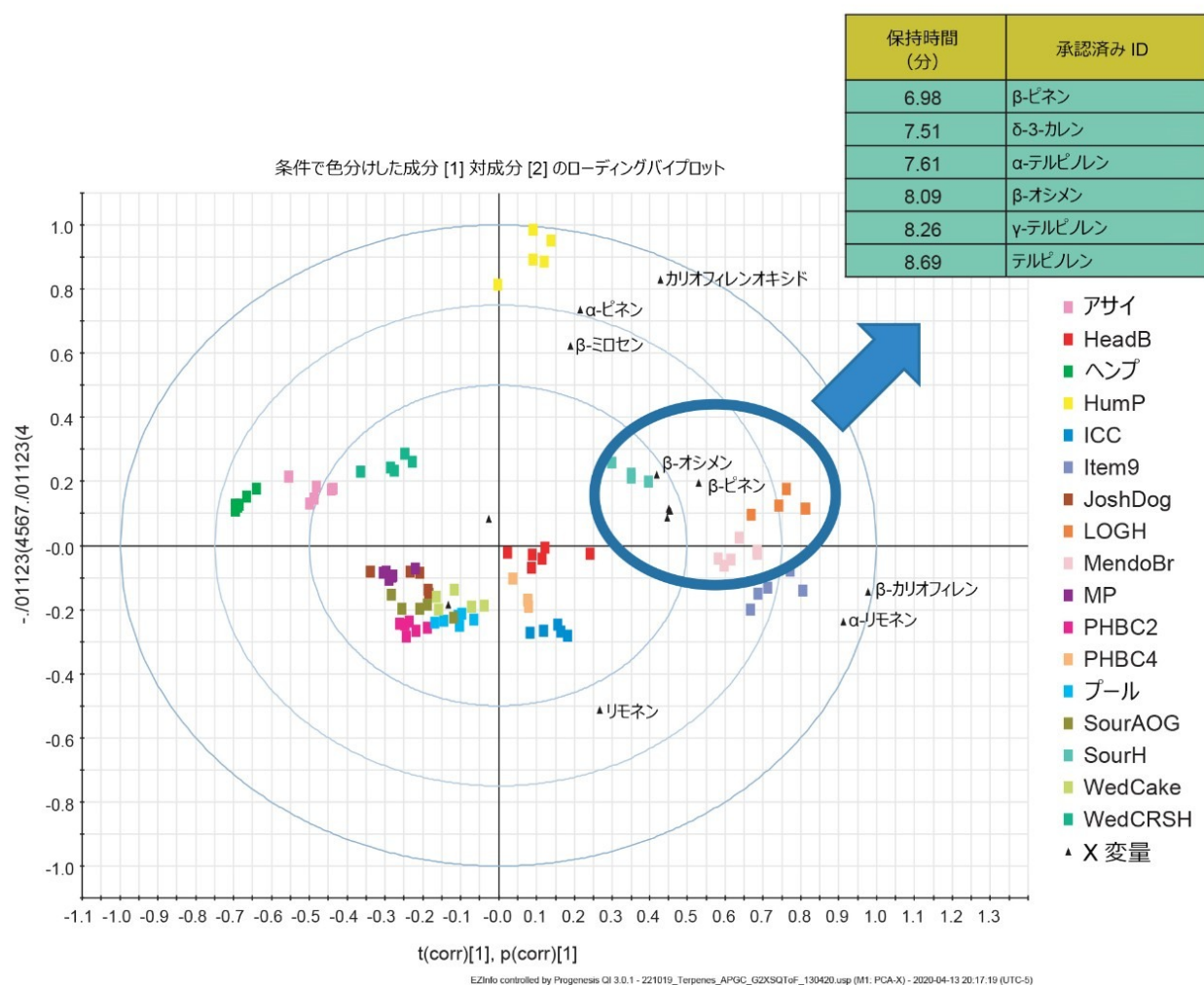


図 16. 選択したテルペンマーカを示すローディングバイプロット

UPLC-ToF/MS および APGC-ToF/MS からのローディングデータを解析して、カンナビノイドとテルペンのプロファイル間の相関性を識別することができます。このデータは、Progenesis QI からエクスポートしてさらに解析することができます。

結論

UPLC-ToF/MS と APGC-ToF/MS を Progenesis QI の PCA データ解析と組み合わせて使用して、栽培種間の相違を容易に特定できます。ヘンプ栽培種では、CBD および関連代謝物の代表的な上昇値と、低レベルの Δ^9 -THC が示されました。 Δ^9 -THC の発現量が高い栽培種が、PCA で観察されました。データを EZ 情報にエクスポートすると、拡張 MVA にアクセスできます。拡張 MVA は、栽培種で観察される化学的差異を解釈および説明するために使用で

きます。カンナビノイドおよびテルペンの存在量プロファイルと階層的クラスタリングのデンドログラムにより、栽培種にわたる傾向を明確に視覚化できます。MVA を使用して重要な未知成分に焦点を合わせ、Progenesis QI に転送してさらに調査することができます。

カスタムデータベースは、栽培種の分析で検出されたカンナビノイドおよびテルペンの同定に、非常に有用でした。このデータベースには、使用できる真正標準試料に基づいて作成された化合物の構造、精密質量、および保持時間やフラグメンテーションなどのその他の特性が含まれています。成分同定は、保持時間、精密質量、プリカーサーイオン、フラグメンテーションパターンや同位体分布など、複数の属性に基づいて行われており、割り当ての信頼性が向上しています。追加のカンナビノイドやテルペンの構造ファイルをデータベースに加えることができるため、より多数の分析種のスクリーニングが容易になります。保持時間とフラグメンテーションスペクトルが記録されていた 13 種のカンナビノイドを、ライブラリーを使用して同定しました。ただし、さらにより多くのカンナビノイドに、構造データベースのスクリーニングと理論的フラグメンテーションに基づいて、アイデンティティーが仮割り当てされました（真正標準試料が利用できなかったためそれ以上の確認はできませんでした）。ライブラリーの生成および標準化されたクロマトグラフィー分離により、大麻マトリックス内の化学的多様性の特性解析を改善できます。

これらのツールにより、管理された分析条件下で大規模なサンプルセットを分析し、測定での技術的ばらつきの影響を最小限に抑えることができ、カンナビノイドやテルペンの発現量での比較的軽微な変化が観察されることが予想される、生長環境や収穫手法のばらつきなどの、複数の条件を評価することが可能になります。

参考文献

1. SV Bhat, BA Nagasampagi, M Sivakumar.Chemistry of Natural Products.2005, ISBN 3-540-40669-7.
2. H Koltai, P Poulin, D Namdar.Promoting Cannabis Products to Pharmaceutical Drugs. European J. Pharm.Sci. 2019, 132, 118–120.
3. AA Izzo, F Borrelli, R Capasso, V Di Marzo, R Mechoulam.Non-Psychotropic Plant Cannabinoids: New Therapeutic Opportunities from an Ancient Herb.Trends in Pharmaco.Sci. 2009, 30, (10), 515–527.
4. CM Andre, JF Hausman, G Guerriero.Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. Front.in Plant Sci.2016, 7(19).
5. MA ElSohly, D Slade.Chemical Constituents of Marijuana: The Complex Mixture of Natural Cannabinoids. Life Sciences. 2005, 78, 539–548.
6. R Brenneisen.Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents.Marijuana and the Cannabinoids, 2007, 17–49.doi:10.1007/978-1-59259-947-9_2.
7. C Citti, P Linciano, F Russo, L Luongo, M Iannotta, S Maione, A Lagana, AL Capriotti, F Forni, MA Vandelli,

- G Gigli, G Cannazza. A Novel Phytocannabinoid Isolated from *Cannabis sativa* L. with an in vivo Cannabimimetic Activity Higher than Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Δ^9 -tetrahydrocannabiphorol. *Scientific Reports*. 2019, 9:20335.
8. MM Radwan, MA ElSohly, D Slade, SA Ahmed, IA Khan, SA Ross, Biologically Active Cannabinoids from High Potency *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 906–911.
 9. C Citti, D Braghiroli, MA Vandelli, G Cannazza. Pharmaceutical and Biomedical Analysis of Cannabinoids: A Critical Review. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 2018, 147, 565–579.
 10. MM Lewis, Y Yang, E Wasilewski, HA Clarke, LP Kotra. Chemical Profiling of Medical Cannabis Extracts. *ACS Omega*. 2017, 2, 6091–6103.
 11. JT Fishedick, A Hazekamp, T Erkelens, YH Choi, R Verpoorte. Metabolic Fingerprinting of *Cannabis sativa* L., Cannabinoids and Terpenoids for Chemotaxonomic and Drug Standardization Purpose. *Phytochemistry*. 2010, 71, 2058–2073.
 12. A Hazekamp, JT Fishedick. Cannabis – From Cultivar to Chemovar. *Drug Test. Analysis*. 2012, DOI 10.1002/dta.407.
 13. A Hazekamp, K Tejkalova, S Papadimitriou. Cannabis: From Cultivar to Chemovar II-A metabolomics Approach to Cannabis Classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 2016, 1.1, 202–215.
 14. P Berman, K Futoran, GM Lewitus, D Mukha, M Benami, T Shlomi, D Meiri. A New ESI-LC/MS Approach for Comprehensive Metabolic Profiling of Phytocannabinoids in Cannabis. *Scientific Reports*. 2018, 8:14280.
 15. EB Russo. Taming THC: Potential Cannabis Synergy and Phytocannabinoid-Terpenoid Entourage Effects. *British Journal of Pharmacology*. 2011, 163, 1344–1364.
 16. MM Delgado-Povedano, C Sanchez-Carnerero, F Priego-Capote. Untargeted Characterisation of Extracts from *Cannabis sativa* L., Cultivars by Gas and Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in High Resolution Mode. *Talanta*. 2020, 208, 120384.
 17. S Elzinga, J Fishedick, R Podkolinski, JC Raber. Cannabinoids and Terpenes as Chemotaxonomic Markers in Cannabis. *Nat. Prod. Chem. Res.* 2015, 3(4).
 18. KW Hillig, A Chemotaxonomic Analysis of Terpenoid Variation in Cannabis. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2004, 32, 875–891.
 19. JT Fishedick. Identification of Terpenoid Chemotypes Among High (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-Producing *Cannabis sativa* L. Cultivars. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 2017, 2.1, 34–47.
 20. C Orser, S Johnson, MD Speck, A Hilyard, Ini Afia. Terpenoid Chemoprofiles Distinguish Drug-Type *Cannabis sativa* L. cultivars in Nevada. *Nat. Prod. Chem. Res.* 2018, 6(304).

21. J Booth, J Bohlman. Terpenes in Cannabis sativa – From Plant Genome to Humans. Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology. 2019 Vol: 284, Page: 67–72.
22. G Magagnini, G Grassi, S Kotiranta. The Effect of Light Spectrum on the Morphology and Cannabinoid Content of Cannabis sativa L., Med Cannabis Cannabinoids. 2018, 1:19–27.
23. EA Ibrahim, Wang M, MM Radwan, AS Wanas, CG Majumdar, B Avula, YH Wang, IA. Khan, S Chandra, H Lata, GM. Hadad, RA Abdel Salam, AK. Ibrahim, SA Ahmed, MA. ElSohly. Analysis of Terpenes in Cannabis sativa L. Using GC-MS: Method Development, Validation, and Application. Planta Med. 2019, 85, 431–438.
24. L Eriksson, E Johansson, N Kettaneh-Wold, J Tyrgg, C Wikstrom, S Wold. 2006, Multi- and Megavariate Data Analysis: Part 1 Basic Principles and Applications (2nd ed).
25. G Navarro, K Varani, I Reyes-Resina, et al. Cannabigerol Action at Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors and at CB1-CB2 Heteroreceptor Complexes. Front Pharmacol. 2018, 9:632. doi:10.3389/fphar.2018.00632.
26. Da Cheng Hao, Xiao-Jie Gu, Pei Gen Xiao. 2015, Medicinal Plants: Chemistry, Biology and Omics. Phytochemical and Biological Research of Cannabis Pharmaceutical Resources Chapter 11. 431–464. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100085-4.00011-6> <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100085-4.00011-6>> .
27. JD Storey, R Tibshirani, Statistical Significance of Genome Wide Studies. Statistical Significance for Genomewide Studies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(16):9440–9445. doi:10.1073/pnas.1530509100.
28. MA ElSohly, MM Radwan, W Gul, S Chandra, A Galal. Phytochemistry of Cannabis sativa L: In Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa. A. Douglas Kinghorn, Heinz Falk, Simon Gibbons, Jun'ichi Kobayashi. (Eds). Springer International Publishing: Cham, Switzerland. 2017, 103, 1–36.
29. M Cho, I So, JN Chun, JH Jeon, The Antitumor Effects of Geraniol: Modulation of Cancer Hallmark Pathways (Review). International Journal of Oncology. 2016, 48(5), 1772–1782. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3427> <<https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3427>> .
30. D Stevens, CJ Hudalla, M Twohig, K Organtini. Terpenes in Hemp and Cannabis Determined Using EI GC-MS/MS. Waters Application Note 720006781EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/terpenes-in-hemp-and-cannabis-determined-using-ei-gc-ms-ms.html>> .
31. K Van Tran, M Twohig, CJ Hudalla. Analysis of Cannabinoids in Cannabis Plant Materials and Edible Products Using UltraPerformance Liquid Chromatography (UPLC) with PDA and Mass Detection. Waters Application Note 720007199EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/analysis-of-cannabinoids-in-cannabis-plant-materials-and-edible-products-using-ultraperformance-liquid-chromatography-uplc-with-pda-and-mass-detection.html>> .

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo G2-XS QToF 四重極飛行時間型質量分析計 <<https://www.waters.com/134798222>>

Waters 大気圧ガスクロマトグラフィー (APGC) <<https://www.waters.com/10100362>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

Progenesis QI <<https://www.waters.com/134790652>>

720006882JA、2021 年 6 月