

모발 내 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid 검출을 위한 빠르고 견고한 고감도 분석법

응용 자료

법의학/도핑 관리

저자

David Engelhart
Omega Labs, Inc.
Mogadore, OH 44260
USA

Fred Feyerherm,
Stephan Baumann, and
Bernhard Rothweiler
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
USA

개요

컬럼 변경과 백플러싱을 사용하여 모발에 함유된 THCA 대마초(marijuana) 대사체를 검출할 수 있을 뿐 아니라, 분석 시간과 주기 시간이 7분과 9분에 불과한 견고성 있는 분석법을 개발하였습니다. 이 분석법의 검출 한계(LOD)는 0.002pg/mg, 정량 한계(LOQ)는 0.01pg/mg입니다.

소개

대부분 약물은 다른 생물학적 매트릭스에 비해 모발 내에서 잔존 기간이 길기 때문에, 복용 후 오랫동안 검출이 가능한 모발 검사는 지난 50여년 동안 약물 남용 검사에 사용되어 왔습니다. 모발 검사는 가석방자의 약물 사용 모니터링이나 약물 사용 이력 확인, 약물에 의한 성폭행 확인 등 다양한 범죄 조사에 널리 사용됩니다. 또한 직원이나 약물 치료 참여자, 아동 양육권 소송 관련 당사자의 약물 사용을 스크리닝하고 모니터링하는 데 보편적으로 사용됩니다. 이밖에 수집이 쉽고, 변조가 어려우며, 복용 후 검출 기간이 길어 직장 내 약물 검사 프로그램에도 자주 활용됩니다.

대마초(marijuana)는 법의학과 약물 스크리닝 분야에서 가장 빈번하게 검사하는 화합물입니다. 대마초 모화합물 tetrahydrocannabinol(THC)은 모발 시료에서 높은 농도로 존재하지만, 대마초 연기에 의한 잠재적인 오염 가능성을 배제하기 위해 산성 대사체인 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA)를 검출하는 경우가 많습니다. 미국 약물남용&정신건강서비스청 (Substance Abuse Mental Health Services Administration, SAMHSA)은 아직 직장 내 모발 검사 지침을 채택하지 않았으나, nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol의 검출 한계로 mg 모발당 0.05pg을 제안하였으며, 관계 규제 당국은 추가 연구와 분석을 통해 최종 지침을 확정할 예정입니다. 모발검사협회 (Society of Hair Testing) 권고안에 따르면 THCA 정량 한계는 $\leq 0.2\text{pg/mg}$ 입니다.



Agilent Technologies

이 응용 자료에서는 Agilent 7000B Triple Quadrupole GC/MS 시스템과 Agilent 7890A GC 시스템에서 2차원 GC와 다중 반응 모니터링 모드(선택 반응 모니터링)의 음이온 화학적 이온화(CI) MS/MS를 사용하여 모발 내 THC 대사체를 높은 감도로 빠르게 검출할 수 있는 분석법을 개발하였습니다. 이 분석법은 기존 GC/MSD 분석법[1]을 바탕으로 화학적 백그라운드 낮고 감도가 높은 삼중 사중극자 MS/MS 분석법의 장점을 최대한 활용할 수 있도록 고안되었습니다. 백플러시를 사용하여 견고성을 높이고 LTM(Low Thermal Mass) 컬럼 모듈로 크로마토그래피 분석 시간을 7 분, 주기 시간은 9분으로 단축하였습니다. 7000B Triple Quadrupole GC/MS 시스템을 이용한 MRM MS/MS 분석에서 높은 감도를 얻었으며, LOD와 LOQ는 각각 0.002과 0.01pg/mg이었습니다.

실험

표준물질 및 시약

내부 표준물질로 사용한 tri-deuterated THCA(100µg/mL methanol 용액)와 표지되지 않은 THCA(100µg/mL methanol 용액)는 Cerilliant(Round Rock, TX)사에서 구입하였습니다. 분석에 사용한 내부 표준물질 농도는 mg 모발당 0.05pg이었습니다.

Methanol, acetonitrile, toluene, ethyl acetate, hexane, glacial acetic acid, methylene chloride는 Spectrum Chemicals(Gardena, CA)에서 구입하였습니다. 모든 용매는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 등급이나 그 이상을 사용하였으며 모든 화합물은 ACS 등급을 사용하였습니다. 유도체화 작용제인 pentafluoropropionic anhydride(PFPA)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(HFIP)은 Campbell Science(Rockton, IL) 제품을 사용하였습니다.

기기

실험은 분할/비분할 주입구와 LTM 시스템이 장착된 Agilent 7890A GC 시스템을 Agilent 7000B Triple Quadrupole GC/MS 시스템에 연결하여 사용하였습니다. 백플러싱용 가드 컬럼, Deans Switch와 연결된 두 개의 LTM 컬럼, Purged Ultimate Union을 그림 1과 같이 구성하여 2차원 크로마토그래피를 수행하였습니다. 기기 조건은 표 1과 같습니다.

표 1. Agilent 7890A GC 시스템과 Agilent 7000B Triple Quadrupole 질량 분석기 조건

GC 분석 조건

가드 컬럼 1m × 0.15mm, 1.2µm DB-1 (p/n G3903-61004)

분석 컬럼

컬럼 1 15m × 0.25mm, 0.25µm DB-1ms LTM 컬럼 모듈(long legs) (p/n G3900-65002)

컬럼 2 15m × 0.25mm, 0.25µm DB-17ms LTM 컬럼 모듈(long legs) (p/n G3900-65001)

컬럼 페룰 연결부 가변 금속 페룰 0.1–0.25mm 컬럼 (p/n G3188-27501)

주입 포트 라이너(liner) Single taper direct connect (p/n G1544-80730)

주입량 2µL

주입구 온도 등온, 250°C

주입 모드 0.75분 펄스 비분할, 35psi

오븐 온도

GC 오븐 250°C에서 7분 유지(등온)

첫 번째 LTM 모듈 100°C에서 50초 유지
200°C/분 속도로 100°C에서 210°C로 승온
10°C/분 속도로 210°C에서 267°C로 승온
267°C에서 2분 유지

두 번째 LTM 모듈 100°C에서 324초 유지
200°C/분 속도로 100°C에서 230°C로 승온
10°C/분 속도로 230°C에서 240°C로 승온
240°C에서 2분 유지

운반 가스 헬륨(He), 등압 모드
가드 컬럼: 1psi, 컬럼 1: 26.6psi,
컬럼 2: 19.6psi

이송 라인 온도 300°C

MS 조건

Tune Autotune

EMV 델타 1,200V

데이터 수집 파라미터 NCI 모드, MRM

반응 가스 암모니아, 35% 유량

충돌 가스 아르곤, 일정 유량(0.9mL/분)

Quench 가스 헬륨(He), 일정 유량(0.5mL/분)

용매 지연 6.2분

MS 온도 소스 150°C, 사중극자 150°C

시료 전처리

시료는 참고자료[2]에서 기술한 방법으로 전처리하였습니다. 검량액, 대조군 또는 모발 시료(20mg)를 칭량하여 실란화된 유리관에 넣고 methylene chloride(1.5mL)로 세척하였습니다. 용매를 따라 내고 모발 시료를 건조하였습니다. 내부 표준물질인 THCA-d3(0.05pg/mg)를 모발 시료에 첨가하였습니다. 모발 시료에 표시되지 않은 THCA를 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5pg/mg 모발 농도로 첨가하여 검량선을 생성하였습니다.

모발 시료에 탈이온수(0.5mL)와 2N sodium hydroxide (0.5mL)를 가하고 75°C에서 15분 동안 가열하였습니다. 시료를 냉각한 후 2,500rpm에서 15분 동안 원심분리하였습니다. 상등액을 acetic acid(1mL), 1M acetic acid(3mL), 0.1M sodium acetate 완충액(pH 4, 2mL)이 담긴 유리관에 옮겨 담았습니다. 유리관 마개를 닫고 혼합하였습니다.

Bond Elut Certify I 고체상 추출 컬럼(130mg, Agilent, Inc.)인 SPE 컬럼은 hexane/ethyl acetate(75:25, v/v, 2mL), methanol(3mL), 탈이온수(3mL), 0.1M hydrochloric acid(1mL)로 활성화하였습니다. 산성화된 시료를 SPE 컬럼에 넣고 건조하였습니다. 탈이온수(2-3mL)로 SPE 컬럼을 세척하고 5분 동안 건조하였습니다. 이어, SPE 컬럼을 0.1M hydrochloric acid/acetonitrile (70:30 v/v, 3mL)로 세척하고 30psi에서 10분 동안 건조하였습니다. 마지막으로 hexane/ethyl acetate(75:25 v/v, 3mL) 용액으로 SPE 컬럼을 행구어 실란화된 유리관으로 THCA를 용리하였습니다.

용리액은 40°C 질소 조건에서 증발 건조된 후 PFPA(70µL)와 HFIP(30µL)에 재용해되어 유도체화되었습니다. 혼합물을 유리 삽입관이 있는 자동 시료 주입기(autosampler) 바이알에 옮겨 담고 마개로 밀폐하였습니다. 바이알을 80°C에서 20분 동안 가열하고 상온에 10분 동안 방치하였습니다. 추출물을 진공 오븐에서 증발 건조하였습니다. 마지막으로 시료를 toluene(50µL)에 재용해시킨 후 GC/MS 시스템에 주입하였습니다.

분석 파라미터

Triple Quadrupole GC/MS 시스템 파라미터를 표 2에 정리하였습니다.

표 2. Agilent 7000B Triple Quadrupole GC/MS 시스템 분석 파라미터

화합물	RT (분)	MRM	Dwell 시간(ms)	총물 에너지(EV)
THCA*	6.714	620→492	50	5
		620→383	50	5
THCA-d3	6.710	623→495	20	5
		623→386	20	5

*11-nor-Δ⁹-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid

결과 및 토의

Heart-cutting 2차원 가스 크로마토그래피

GC 컬럼 2개를 일렬로 연결하여 분석 대상 피크에서 백그라운드 제거하는 기술은 이미 잘 정립된 분석법으로, 매트릭스 간섭을 제거하고 분석 물질을 명확히 분리하기 위해 널리 사용됩니다. 첫 번째 컬럼에서 분석 물질의 머무름 시간이 결정되면, 공급 스위치(Deans switch)가 켜지면서 두 번째 컬럼으로 흐름이 유도되고 잠시 후 스위치는 꺼집니다. 이를 통해 첫 번째 컬럼을 통과하는 용리액에서 좁은 범위(heart-cut)로 분석 물질을 분리하여 백그라운드를 최소화하고, 두 번째 컬럼에서 추가적인 분리가 이루어집니다(그림 1). 두 컬럼의 고정상 특성이 다를수록 전체적인 분리 성능이 향상됩니다.

모발에 함유된 THCA를 높은 견고성으로 빠르게 검출하기 위한 시스템 구성

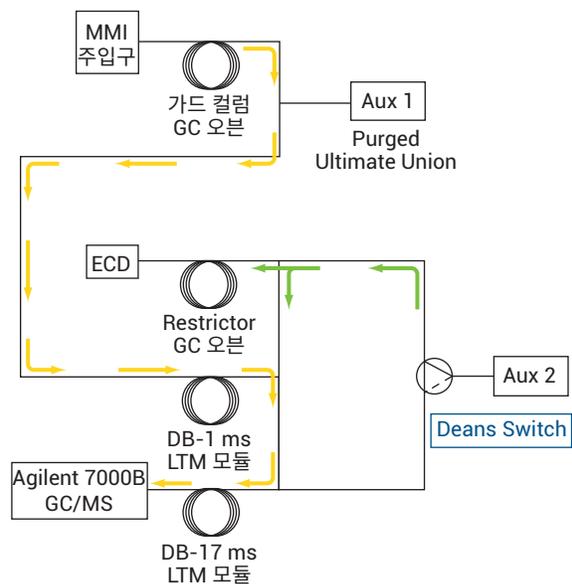


그림 1. THCA 분석법에 사용된 시스템 개요

높은 견고성과 빠른 속도

백플러싱과 LTM 컬럼 모듈을 함께 사용하면 기존 단일 컬럼 접근법에 비해 높은 견고성과 단축된 분석 시간을 얻을 수 있습니다. 분석 시스템은 독립적으로 프로그램된 3개의 압력 영역과 역시 독립적으로 가열되는 3개의 영역으로 구성됩니다(그림 1). 가드 컬럼과 첫 번째 LTM 컬럼은 상대적으로 비극성인 DB-1 ms 상으로, 두 번째 LTM 컬럼은 DB1 ms에 비해 극성이 강한 DB-17 ms 상으로 코팅되어 있습니다. Heart-cut 범위는 0.2 분에 불과합니다(5.5-5.7분).

가드 컬럼과 보조 압력 제어 모듈(AUX EPC)은 백플러시 기능을 제공하여 LTM 분석 컬럼을 보호하고 보존합니다. 분석이 진행되는 동안 가드 컬럼은 1psi 일정 압력에서 백플러시 모드로 작동합니다. 분석 시작 후 처음 0.75분 동안은 백플러시 대신 주입구 압력 펄스 모드로 작동합니다. 백플러싱은 끓는점이 높은 화합물이 컬럼에 침착되는 현상을 방지하며, 머무름 시간 변화와 피크 왜곡, 화학적 노이즈를 줄여 정량 성능을 향상합니다. MS 소스 오염으로 인한 세척 필요성을 낮추고 분석 시간이 단축됩니다.

또한, 이 분석법에서는 LTM 컬럼 모듈이 GC 오븐 외부에 장착되어 두 분석 컬럼의 온도를 독립적, 최적으로 제어할 수 있습니다(그림 2). 독특한 컬럼 모듈 설계로 빠른 승온과 냉각이 요구되는 분석법에도 적합합니다. GC 소프트웨어로 제어되는 LTM 컬럼 모듈은 주입구, 자동 시료 주입기 (autosampler), 또는 검출기를 변경하지 않고 애질런트 GC에 추가할 수 있습니다.

백플러싱과 LTM 방법을 적용한 분석법은 정량 성능과 감도가 우수할 뿐 아니라(다음 섹션 참조), 분석 시간은 7 분, 주기 시간은 9분에 불과합니다.

빠른 승온과 냉각이 가능한 LTM 컬럼 모듈



그림 2. Agilent 7890A GC에 장착된 LTM 컬럼 모듈

감도와 정량 성능

이 분석법의 LOD는 0.002pg/mg이었으며, pg/mg 수준에서도 높은 감도를 나타냈습니다(그림 3). 정량 정확도도 매우 높았으며, 0.002-0.5pg/mg 모발 농도에서 R²는 0.995였습니다(그림 4). LOQ는 0.01pg/mg으로 모발검사 협회(Society of Hair Testing)가 권장하는 0.2 pg/mg

LOQ보다 10배 이상 낮았습니다(그림 5). 이 분석법은 또한 머무름 시간(한계값 포함), 응답 수준, 정성 이온 비율(한계값 포함) 및 계산된 농도를 포함하는 규제 정량 분석 보고서를 제공합니다. 또한, 시료와 THCA-d3 내부 표준물질의 TIC trace와 정성 및 정량 MRM trace도 보고서에 포함됩니다.

LOD 0.002pg/mg

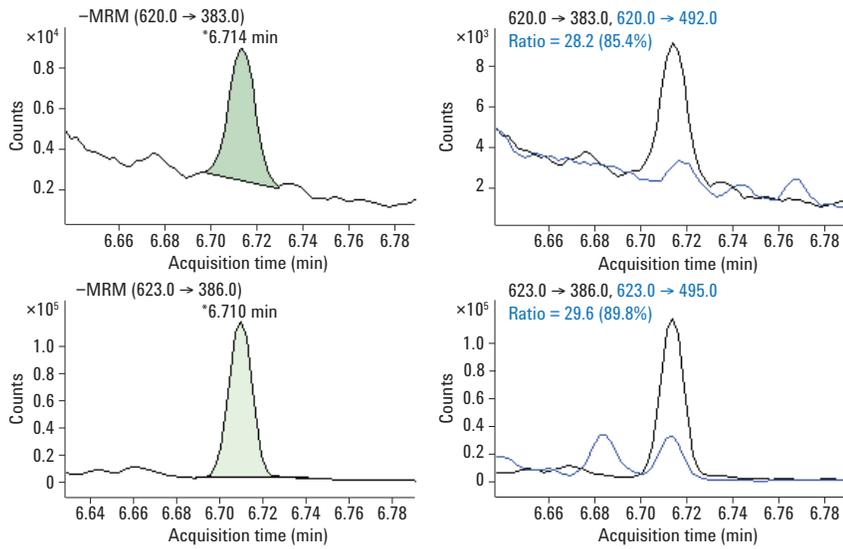


그림 3. THCA(상단 패널)와 중수소 치환 표준물질(하단 패널)을 함유한 모발 시료의 정량 transition(왼쪽)과 정량 및 정성 transition(오른쪽) MRM trace(LOD 0.002pg/mg)

검량 신뢰성

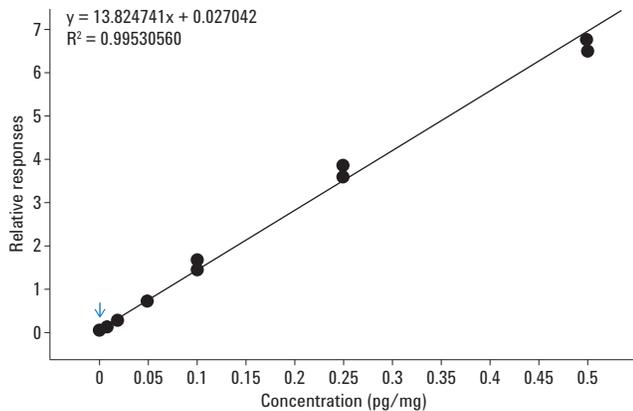


그림 4. 모발 시료에 THCA를 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5pg/mg 모발 농도로 첨가하여 생성한 THCA 검량선

LOQ 0.01pg/mg

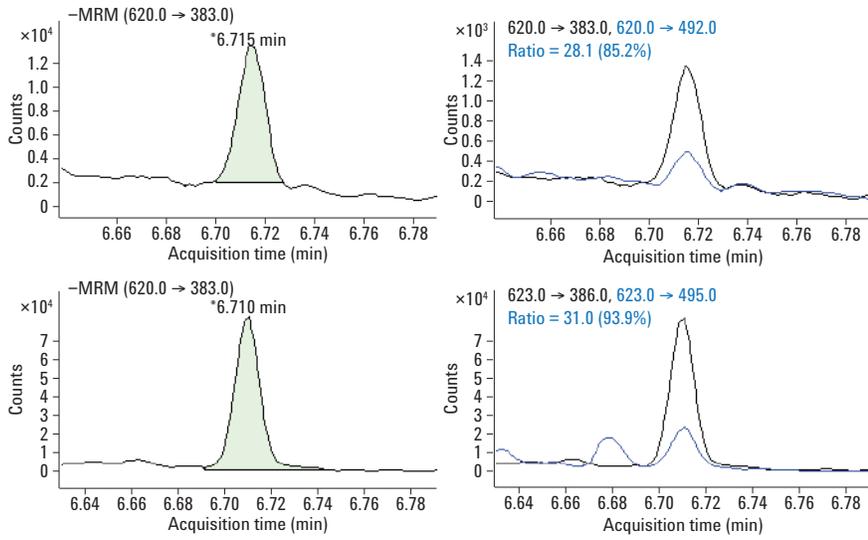


그림 5. THCA(상단 패널)와 중수소 치환 표준물질(하단 패널)을 함유한 모발 시료의 정량 transition(왼쪽)과 정량 및 정성 transition(오른쪽) MRM trace(LOQ 0.01pg/mg)

데이터 파일	01401015.D	바이알	14
작업자	DATASYSTEM01/Admin	희석	0.0
데이터 수집 방법		시료 정보	
데이터 수집 날짜:	2010-10-08 16:24	마지막 검량 업데이트	2010-11-28 09:34
시료명과 경로	0.01pg/mg, D:/MassHunter/GCMS/1/data/PFAA Curve Extracted/		

화합물	신호	RT	한계	응답	QRatio	한계	최종 농도
THCA-d3	623.0 → 386.0	6.71		82,558		35,770-143,081	
	623.0 → 495.0			24,962	30.2	23.1-42.9	
THCA	620.0 → 383.0	6.71	6.38-7.05	10,999			0.008
	620.0 → 492.0			3,908	35.5	23.1-42.9	

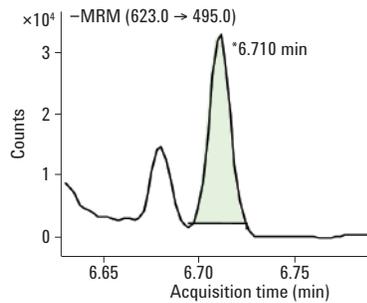
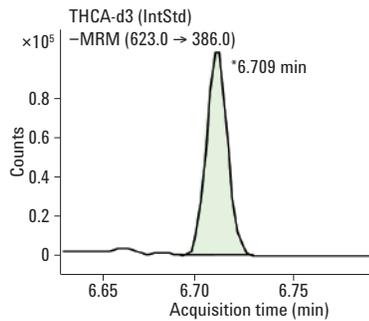
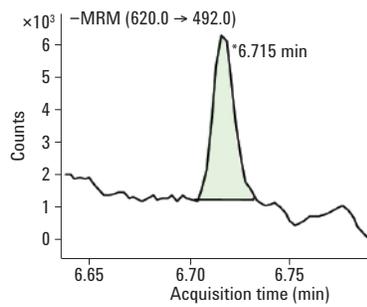
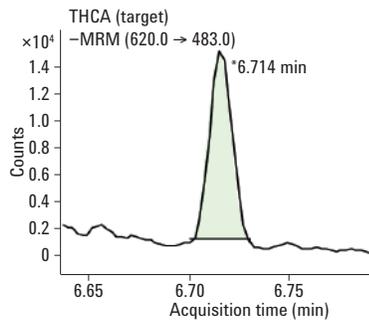
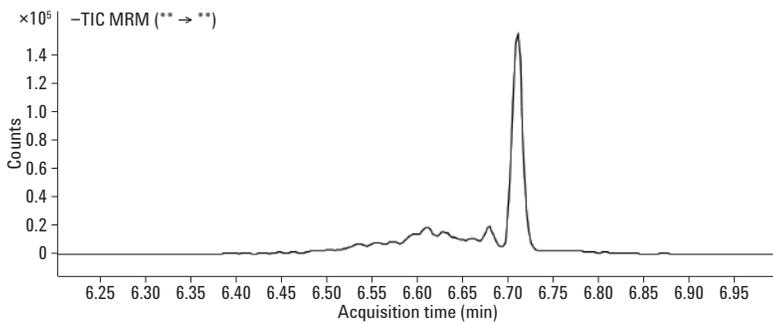


그림 6. 모발 시료에 THCA를 LOQ 농도 0.01pg/mg으로 첨가한 시료의 정량 분석 결과 보고서

결론

이 응용 자료에서는 크로마토그래피 분리능 향상에 효과적이라고 검증된 heart-cutting 기술과 최첨단 미세유체 기술을 활용한 백플러싱, LTM 컬럼 승온 모듈을 결합하여 높은 견고성과 감도로 모발 내 THCA(LOD 0.002pg/mg, LOQ 0.01pg/mg)를 검출 및 정량하는 분석법을 개발하였으며, 분석 시간과 주기 시간은 7분과 9분이었습니다.

참고문헌

1. F. Feyerherm, *et al.*, "Rapid Multidimensional GC Analysis of Trace Drugs in Complex Matrices" Gerstel publication AN-2007-8.
2. C. Moore, *et al.*, "Application of Two-dimensional Gas Chromatography with Electron Capture Chemical Ionization Mass Spectrometry to the Detection of 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) in Hair" *J. Anal. Toxicol.* **30**, 171-177 (2006).

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2014
2014년 3월 31일, 한국에서 인쇄
5990-7535KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies