

快速、稳定、灵敏地测定头发中的 11-羟基- Δ^9 -四氢大麻酚-9-羧酸 (THCA)

应用报告

法医/兴奋剂控制

作者

David Engelhart
Omega Labs Inc.
摩加多尔, 俄亥俄州 44260
美国

Fred Feyerherm
Stephan Baumann
Bernhard Rothweiler
安捷伦科技公司
圣克拉拉, 加利福尼亚州 95051
美国

摘要

本文介绍了一种使用色谱柱切换和反吹技术开发的头发中 THCA 大麻代谢物的快速、稳定的测定方法，运行时间和循环时间分别为 7 min 和 9 min。方法检出限为 0.002 pg/mg，定量限为 0.01 pg/mg。

前言

通过检测头发来监测滥用药物已有 50 多年的历史了，很大程度上是由于其能够监测很长一段时间内的用药情况，与其他生物基体相比，很多药物能够在头发中得到良好保存。头发检测在犯罪调查中广泛使用，比如监视假释犯的戒毒情况，查证吸毒史，识别吸毒诱导型侵犯等。头发药检还普遍用于筛查和监测下列人群的涉毒情况，如公司雇员、参与药物治疗的患者和涉及孩子抚养权的各方。工作场所执行程序即包括头发药检，其优点为样品易于采集、难于造假以及可监测毒品摄入时间更长。

大麻是法医和毒品筛查中经常检测的药物之一。其母体化合物四氢大麻酚(THC)在头发中含量较高，但是为消除吸抽大麻引起的环境空气污染，经常选取其代谢产物 11-羟基- Δ^9 -四氢大麻酚-9-羧酸 (THCA) 作为检测物。美国药物滥用和精神健康服务管理局(SAMHSA)尚未通过相应的工作场所头发检测标准，但建议的nor-9-羰基- Δ_9 -四氢大麻酚指导限值 0.05 pg/ (mg 头发)，这一限值将成为该监管机构进一步研究和分析的主题。毛发测试学会建议的 THCA 定量限为 LOQ \leq 0.2 pg/ (mg 头发)。



Agilent Technologies

该应用报告介绍了一种使用 Agilent 7890A 气相色谱联用 7000B 三重串联四级杆质谱系统开发的测定头发中 THC 代谢物的方法。该方法使用二维气相色谱和负离子化学电离源 (CI) MS/MS，在多反应监测 (MRM) 模式下（也称为 SRM，选择性反应监测模式）获得了优异的灵敏度和快速的检测速度。该方法改良于之前的报道过的 GC/MSD 方法【1】，充分利用了三重串联四级杆质谱的低化学背景和高灵敏度的优势。利用反吹提高了方法的耐用性，低热容 (LTM) 色谱柱模块加速了色谱分析过程，使运行时间仅为 7 min，循环时间也仅为 9 min。建立在三重串联四级杆质谱上的 MRM MS/MS 分析表现出了卓越的灵敏度，LOD 和 LOQ 分别仅为 0.002 pg/mg 和 0.01 pg/mg。

实验部分

标准和试剂

使用三-氘代 THCA 作为内标物(浓度为 100 µg/mL 的甲醇溶液)，无同位素标记的 THCA (浓度为 100 µg/mL 的甲醇溶液) 购自 Cerilliant 公司, (Round Rock, TX)。头发中的内标浓度为 0.05 pg/mg。

甲醇、乙腈、甲苯、乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸和二氯甲烷购自 Spectrum Chemicals 公司(Gardena, CA)。所有溶剂均为 HPLC 级或更高，所有化学试剂均为 ACS 级。Bond Elut Certify I 固相萃取柱(130 mg)购自安捷伦科技公司(Walnut Creek, CA)，或者使用 Clean Screen ZSTHC02 萃取柱(200 mg) ，购自 United Chemical Technologies, Inc. (Bristol, PA)。衍生化试剂全氟丙酸酐(PFPA)和六氟异丙醇(HFIP)分别购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO) 和 Campbell Science 公司 (Rockton, IL)。

仪器

实验使用配备多模式进样口 (MMI) 和 LTM 系统的安捷伦 7890N 气相色谱及安捷伦 7000B 三重串联四级杆质谱联用系统。使用三通管 Purged Ultimate Union 连接预柱实现反吹和 Deans Switch 连接两个低热容 (LTM) 色谱柱，实现二维色谱模式运行 (图 1)。仪器条件列于表1。

表 1. 安捷伦 7890N/7000B 气相色谱和三重串联四级杆质谱条件

GC 运行条件	
预柱	1 m × 0.15 mm × 1.2 µm DB-1 (部件号 12A-1015)
分析柱	
色谱柱 1	15 m × 0.25 mm × 0.25 µm DB-1ms LTM 色谱柱模块 (部件号 122-0112LTM)
色谱柱 2	15 m × 0.25 mm × 0.25 µm DB-17ms LTM 色谱柱模块 (部件号 122-4712LTM)
进样体积	2 µL
进样口温度	250 °C 恒温
进样口模式	0.75 分钟脉冲不分流，35 psi
柱箱温度	
GC 柱箱温度	250 °C(恒温)保持 7 min
色谱柱 1 LTM 模块	100 °C 保持 50 s 从 100 °C 以 200 °C/min 速率升至 210 °C 从 210 °C 以 10 °C/min 速率升至 267 °C 267 °C 保持 2 min 100 °C 保持 324 s 从 100 °C 以 200 °C/min 速率升至 230 °C 从 230 °C 以 10 °C/min 速率升至 240 °C 240 °C 保持 2 min
色谱柱 2 LTM 模块	氦气，恒压 预柱: 1 psi; 色谱柱 1: 26.6 psi; 色谱柱 2: 19.6 psi
载气	
传输管线温度	300 °C
质谱条件	
调谐	自动调谐
EMV Delta	1200 V
数据采集参数	NCI; 多反应监测模式 (MRM)
试剂气体	氨， 35%
碰撞气体	氩气，恒流，0.9 mL/min
淬灭气体	氩气，恒流，0.5 mL/min
溶剂延迟	6.2 min
MS 温度	离子源 150 °C; 四级杆 150 °C

样品制备

样品按前述方法制备【2】。将校准样、质控样或 20 mg 头发样本称量至硅烷化玻璃试管中，用 1.5 ml 二氯甲烷进行清洗。弃去洗液，将头发晾干。按 0.05 pg/mg 的浓度向头发样本中加入 THCA-d3 内标物。分别向头发中按 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 和 0.5 pg/mg 的比例加入无同位素标记的 THCA 校准标准系列。

向试管中加入 0.5 mL 去离子水和 0.5 mL 2N 的 NaOH，在 75 °C 的温度下加热 15 min。样品冷却后在 2500 rpm 速度下离心 15 min。将上清液倒入到预先装有 1 mL 冰醋酸和 3 mL 1M 冰醋酸和 2 mL 0.1M 醋酸钠组成的缓冲体系中(pH 4)。加盖混匀。

SPE 柱预先经正己烷/乙酸乙酯(75:25, v/v; 2 mL), 3 mL 甲醇, 3 mL 去离子水和 1 mL 0.1M 盐酸进行活化处理。将酸化的样品加到 SPE 柱上，待干。然后用 2-3 mL 去离子水淋洗 SPE 柱，静置 5 min。再用 0.1 M 盐酸/乙腈(70:30 v/v; 3 mL)继续淋洗 SPE 柱，在 30 psi 下静置 10 min。最后用正己烷/乙酸乙酯(75:25 v/v; 3 mL)洗脱，将 THCA 洗脱到硅烷化玻璃试管中。

40 °C 下将洗提液氮吹至干。使用 PFPA (70 μL) 和 FIP (30 μL) 进行衍生化。将混合液转移到自动进样器上装有玻璃内插管和密封盖的样品瓶上。将样品瓶在 80 °C 加热 20 min，在室温下静置 10 min。在真空腔中将洗提液蒸发至干。最后用甲苯(50 μL)复溶，然后用 GC/MS 分析。

分析参数

安捷伦三重串联四极杆 GC/MS 的参数如表 2 所示。

表 2. Agilent 7000 B 三重串联四极杆 GC/MS 的分析参数

化合物	RT (min)	MRM	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (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—羟基— Δ^9 —四氢大麻酚—9—羧酸

结果

使用中心切割的二维气相色谱

使用双色谱柱分离背景和目标化合物作为一项完善的技术广泛用于实现基体干扰和目标物的优异分离。一旦被分析物的保留时间在第一根色谱柱上得到确认，气路转换开关 (Deans Switch) 就会在那个时间开启并将气流切换到第二根色谱柱，并在短时间后关闭。这种切换可使第一根色谱柱上的流出物形成窄的中心切割“窗口”，在保证包含被分析物的同时，确保流入背景最小化，以在第二根色谱柱上实现进一步分离（图 1）。应使两根色谱柱的固定相尽量不同，以使双柱配置的作用达到最大化。

优异的稳定性和分析速度

反吹功能和低热容(LTM)色谱柱模块相结合使该方法与传统单色谱柱方法相比性能更稳定，分析速度更快。三个相互独立的程序压力控制区可与三个相互独立的程序温度控制区结合（图 1）使用。预柱和第一根 LTM 色谱柱装填非极性 DB-1ms 固定相，第二根 LTM 色谱柱装填极性较强的 DB-17ms 固定相。中心切割视窗宽度仅为 0.2 min (5.5 到 5.7 min)。

一种独一无二的系统，用于头发中 THCA 的高效快速检测

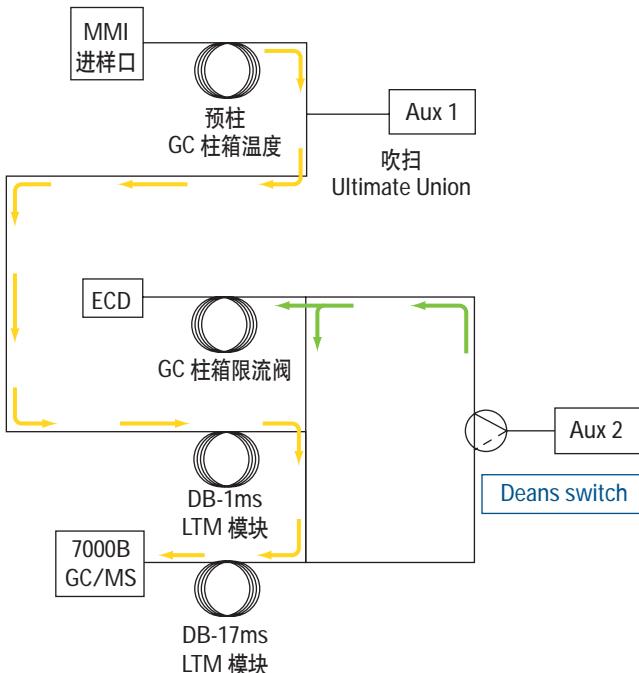


图 1. 用于 THCA 方法开发的色谱/质谱系统结构图

预柱和辅助压力控制模块(AUX EPC)为系统提供反吹功能以保护 LTM 分析柱。运行过程中，预柱以 1 psi 恒压模式进行反吹。在最初的 0.75 min，进样口的脉冲压力将反吹覆盖。使用反吹防止高沸点化合物在色谱柱上聚集，从而减少保留时间漂移、色谱峰变形和化学噪声，提高了定量的准确性；反吹还降低了离子源遭受污染的几率以及随之而来的清洗频率，同时缩短了运行时间。

方法同样将 LTM 色谱柱模块外接到 GC 色谱柱箱，可以分别对两个分析柱进行独立优化的温度控制（图 2）。这些独特的模块设计使迅速升温和降温成为可能。LTM 色谱柱模块可随时接入到安捷伦气相色谱，无需对进样口和自动进样器或检测器进行任何改变，而且可以通过 GC 软件进行控制。

这种独特的反吹和 LTM 技术增强了方法的性能，在 7 min 运行时间和 9 min 循环时间内即可获得准确的定量结果和卓越的灵敏度（参见下文）。

独特的 LTM 色谱柱模块确保系统实现快速升温和降温



图 2. 低热容(LTM)色谱柱模块与安捷伦 7890A 嵌接

卓越的灵敏度和准确的定量性能

该方法检出限 (LOD) 为 0.002 pg/mg, 远低于推荐的限值 0.05 pg/mg, 充分说明了其卓越的灵敏度 (图 3)。方法的准确度也表现不俗, 从 0.002 到 0.5 pg/mg 范围内的 R^2 为 0.995 (图 4)。方法定量限为 (LOQ) 0.01 pg/mg, 同样比毛发检测协

会 (图 5) 推荐的指导值 0.2 pg/mg 低一个数量级之多。方法同样提供了适应性定量分析报告, 包括保留时间 (包括保留时间上下限), 响应水平, 定量离子比 (包括比值上下限) 和计算结果。样品和 THCA-d3 内标物的总离子流图和定量离子及限定离子的 MRM 谱图同样列于报告中 (图 6)。

LOD 为 0.002 pg/mg

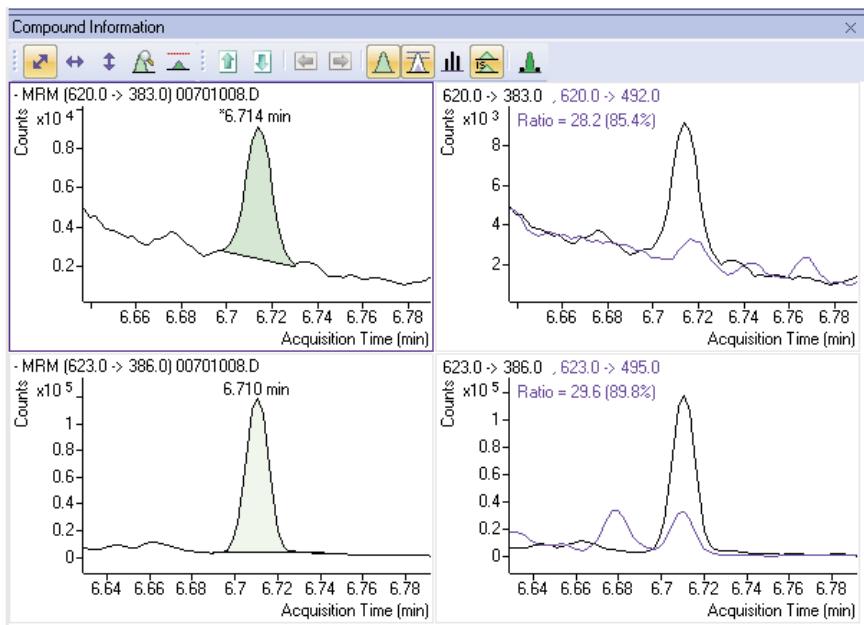


图 3. 头发样品加标 0.002 pg/mg LOD 水平的 THCA (上排) 和内标物 (下排) 的定量离子 MRM 谱图 (左列) 和定量离子及限定离子 MRM 叠加谱图 (右列)

可靠的校准结果

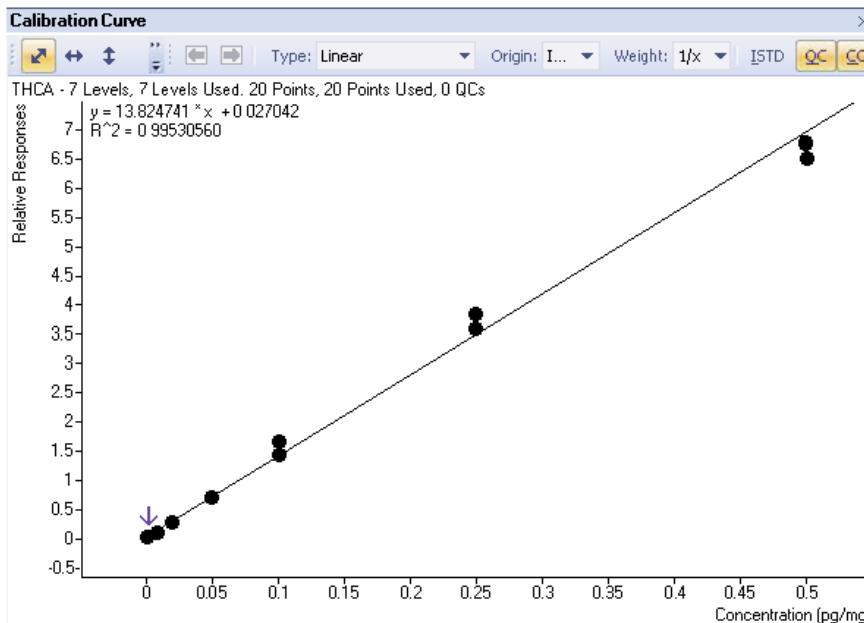


图 4. 头发样品 THCA 加标量分别为 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 和 0.5 pg/mg 的校准曲线

LOQ 为 0.01 pg/mg

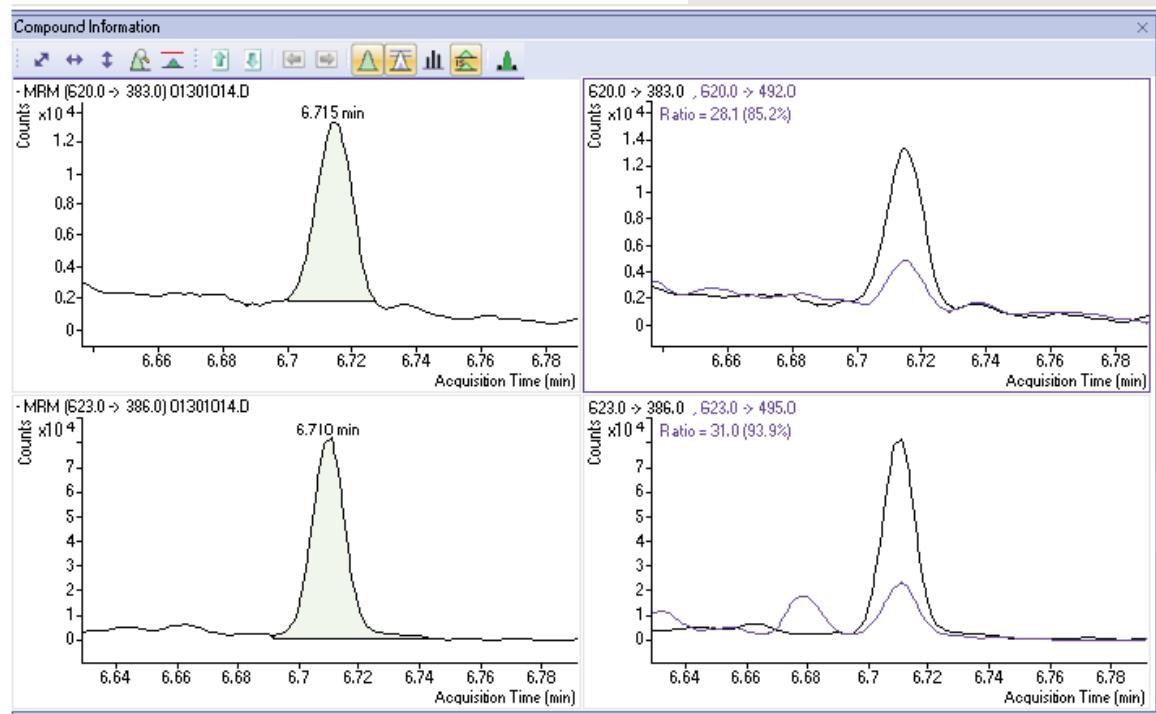


图 5. 头发样品加标 0.01 pg/mg LOQ 水平的 THCA (上排) 和内标物 (下排) 的定量离子 MRM 谱图 (左列) 和定量离子及限定离子 MRM 叠加谱图 (右列)

数据文件	01401015.D	样品瓶	14
操作者	DATASYSTEM01/Admin	稀释倍数	0.0
采集方法名称		样品信息	
数据采集时间	2010-10-08 16:24	校准最近更新时间	2010-11-28 09:34
样品名称和路径	0.01 pg/mg, D:/MassHunter/GCMS/1/data/PFAA Curve Extracted/		

化合物	Signal	RT	RT 范围	响应	QRatio	比值范围	计算结果
THCA-d3	623.0 -> 386.0	6.71		82558		35770 - 143081	
	623.0 -> 495.0			24962	30.2	23.1 - 42.9	
THCA	620.0 -> 383.0	6.71	6.38 - 7.05	10999			0.008
	620.0 -> 492.0			3908	35.5	23.1 - 42.9	

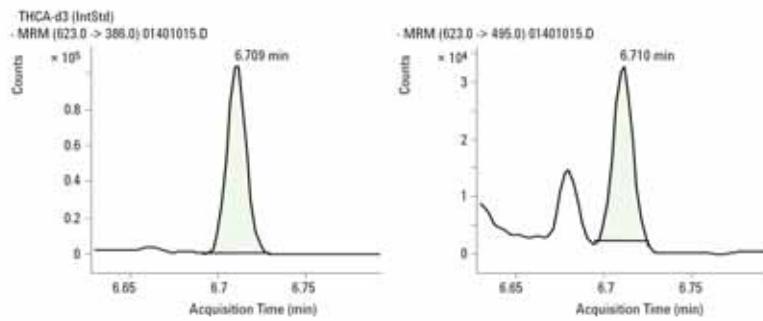
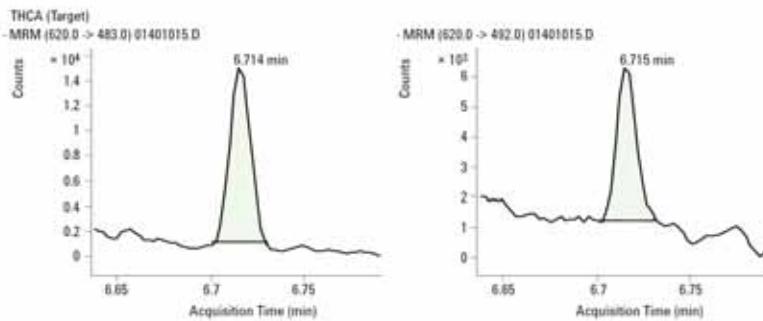
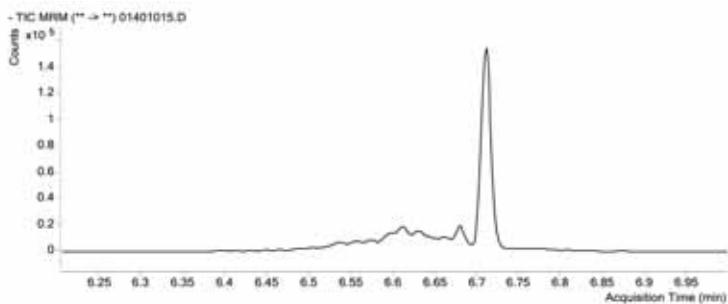


图 6. 0.01 pg/mg (定量限) 加标头发样本的定量分析报告

结论

中心切割是一种经过时间考验的技术，能提高色谱分离性能，在本文介绍的方法中，将其与微板流路辅助反吹和低热容色谱柱程序升温模块相结合，发挥了更高的作用，运行时间 7 min，循环时间 9 min 的时间内能够提供对头发中 THCA 分析卓越的灵敏度 (LOD 0.002 pg/mg; LOQ 0.01 pg/min) 和稳定性。

参考文献

1. F. Feyerherm, R. Lowe, J. Stuff, D. Singer, "Rapid Multidimensional GC Analysis of Trace Drugs in Complex Matrices", Gerstel publication AN-2007-8.
2. C. Moore, S. Rana, C. Coulter, F. Feyerherm, H. Prest, "Application of Two-dimensional Gas Chromatography with Electron Capture Chemical Ionization Mass Spectrometry to the Detection of 11-nor-D9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) in Hair", J. Anal. Toxicol. 30, 171–177 (2006).

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的直接或间接损失不承担任何责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2011
2011年3月21日中国印刷
5990-7535CHCN



Agilent Technologies