

快速耐用的检测血中THC及其代谢物的方法

应用报告

法医/毒品控制

作者

Stephan Baumann
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
USA

摘要

使用SPE萃取及带反吹功能的GC/MS/MS，开发了一种耐用的检测血中THC及其代谢物的方法。THC和11-OH-THC的定量动态线性范围为0.1-50 ng/mL，THCA的则为1-100 ng/mL。分析运行时间6 min，实验循环周期8 min。

引言

过去十年里，已进行了大量有关服用大麻对道路安全影响的研究。特别是研究了吸食大麻对驾驶能力的影响，其流行病学研究及相关大麻检测技术工作也多有发表。因此，一些国家针对药后驾驶（DUID）进行立法，措施各不相同。虽然已有许多类型的体液样品用于大麻检测，但血液样品分析仍被认为是能够发现这种危害最可靠的方法。血液中活性四氢大麻酚（THC）的检测也被雇主用于判断雇员服用大麻对工作表现的损害。气相色谱-质谱（GC/MS）联用是检测和定量分析血中THC及其代谢物的标准方法。

可靠检测血中THC的关键在于有效的THC萃取方法。由于串联质谱（MS/MS）可以消除干扰，从而可以提高血中THC及其代谢物检测的灵敏度和定量分析的可靠性。本应用报告介绍了采用高流量 Bond Elut Certify II SPE柱快速有效地萃取血中THC及其代谢物的方法。萃取物经过衍生化以提高其挥发性，衍生产物随后采用具备低热容（LTM）柱模块及反吹功能的Agilent 7890A三重串联四极杆GC/MS系统进行分析。然后再联接Agilent 7000B三重串联四极杆 GC/MS系统，多反应监测（MRM）模式下采用 MS/MS快速灵敏地检测THC及其代谢物11-OH-THC（11-羟基- Δ 9-四氢大麻酚）和THCA（11-正- Δ 9-四氢大麻



Agilent Technologies

酚-9-羧酸)。反吹功能可以提高系统的耐用性和分析速度，一次分析只需6 min的运行时间和8 min的循环时间。采用三重串联四极杆GC/MS系统的MRM MS/MS分析，得到了优良的结果，动态线性范围0.1- 50 ng/mL。

实验部分

标准品和试剂

作为内标物使用的三氘代THC、11-OH-THC和THCA (100 µg/mL 甲醇溶液)，以及未标记THC、11-OH-THC和THCA (100 µg/mL 甲醇溶液) 来自Cerilliant公司 (Round Rock, TX)。方法中内标溶液的浓度均为10 µg/mL。

甲醇、乙腈、甲苯、乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸和二氯甲烷来自Sigma Aldrich公司 (St. Louis, MO)。所有溶剂为高效液相色谱 (HPLC) 级或更高纯度，所有化学品为ACS级。实验中使用安捷伦高流量Bond Elut Certify II固相萃取柱。衍生试剂BSTFA (N, O-双(三甲硅基)三氟乙酰胺)和TMCS (三甲基氯硅烷) 购自Cerilliant公司。带有稳定剂草酸钾和氯化钠的普通人全血来自Bioreclamation公司 (Hicksville, NY)，用此空白基质制备标准品溶液，绘制校正曲线。

仪器

实验在装备有多模式进样口 (MMI) 和LTM柱模块的Agilent 7890N 气相色谱仪上进行，联用7000B三重串联四极杆GC/MS。色谱分析采用一个用于反吹的预柱，以及通过一个吹扫Ultimate Union连接的低热容 (LTM) 色谱柱 (图1)。仪器条件列于表1。

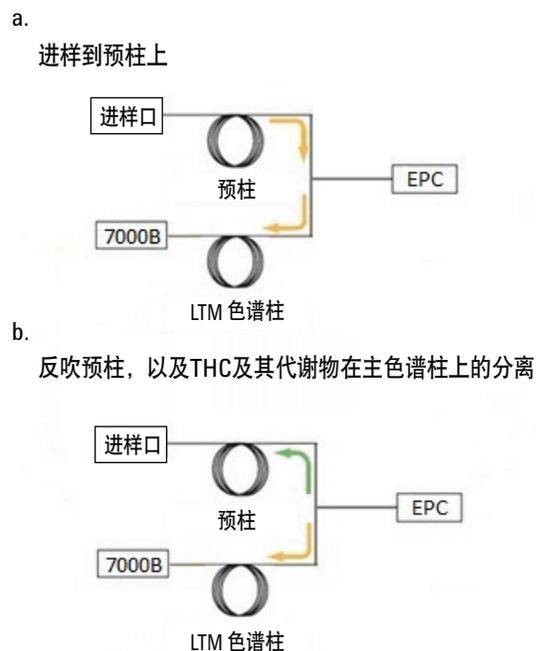


图1. 建立此方法所采用的反吹系统示意图。EPC: 电子气动控制模块; 7000B: Agilent三重串联四极杆GC/MS系统

表1. Agilent 7890N/7000B气相色谱和三重串联四极杆质谱条件

GC 运行条件	
预柱	从15 m × 0.25 mm, 0.25 μm HP-5 ms超高惰性柱 (部件号19091S-431UI) 上截取1 m
分析柱	15 m × 0.25 mm, 0.25 μm DB-17 ms LTM 柱模块 (部件号122-4712LTM)
进样量	1 μL
进样口温度	恒温 280 °C
进样模式	0.5 min 脉冲不分流, 35 psi
柱温箱温度	GC 柱温箱: 280 °C保持6 min (恒温)
LTM 模块:	100 °C保持50 s 以200 °C/min的速度从100 °C升到230 °C 以10 °C/min的速度从230 °C升到280 °C 280 °C保持1 min
载气	氦气, 恒压模式 预柱: 1 psi; 柱1: 5 psi; 柱2: 9.6 psi
传输线温度	300 °C
MS 条件	
调谐模式	自动调谐
增益	20
采集参数	EI 模式; 多反应监测 (MRM)
碰撞气	氮气, 恒流, 1.5 mL/min
冷却气	氮气, 恒流, 2.25 mL/min
溶剂延迟	3.0 min
MS温度	离子源 230 °C; 四极杆150 °C

样品制备

将包含10 μg/mL 各内标 (ISTD), 并添加THC、11-OH-THC和THCA的2 mL血样移取到样品管中, 加入4 mL乙腈混匀。以2500 rpm的转速离心5 min后, 取上清液在35-40 °C下氮气吹至约3 mL, 加入0.1 M醋酸钠溶液 (pH 6.0) 7 mL。

高流量Bond Elut Certify II SPE柱依次用2 mL甲醇、2 mL 0.1 M醋酸钠缓冲液 (pH 6.0, 含5%甲醇) 冲洗。上样前保持柱填料湿润。以1-2 mL/min的速度缓慢上样。然后用2 mL pH 6.0的醋酸钠缓冲液冲柱, 在保持最大真空度的情况下干燥5 min, 然后用1 mL正己烷冲洗。在中性条件下, 采用2 mL正己烷-乙酸乙酯 (95:5) 混合液洗脱THC。然后柱子用5 mL甲醇-去离子水 (1:1) 冲洗。再次在最大真空度下干燥柱子约5 min, 并用1 mL正己烷冲洗。用2 mL含1%醋酸的 正己烷-乙酸乙酯 (75:25) 溶液洗脱11-OH-THC和THCA。将洗脱下来的THC及其代谢物合并, 衍生前干燥。

洗脱液在温度不超过40 °C的条件下氮气吹干, 残留物用60 μL甲苯复溶, 然后加入含1%TMCS 的40 μL BSTFA进行衍生。样品管加盖密封, 70 °C下加热20 min, 然后进样至串联四极杆GC/MS系统分析。

分析参数

所设置安捷伦三重串联四极杆 GC/MS 系统参数列于表 2。

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

化合物	RT (min)	MRM	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (EV)
THC (Δ9-四氢大麻酚)	3.5	386→303*	25	20
		386→330	27	10
		386→289	30	25
THC-d3	3.5	389→306*	10	20
		389→330	11	10
		389→292	15	25
11-OH-THC (11-羟基-Δ9-四氢大麻酚)	4.5	371→289*	24	20
		371→305	26	15
		371→265	27	15
11-OH-THC-d3	4.5	374→292*	10	20
		374→308	12	15
		374→268	12	15
THCA (11-正-Δ9-四氢大麻酚-9-羧酸)	5.6	371→289*	23	15
		488→297	44	20
		488→371	29	20
THCA-d9	5.5	380→292*	15	15
		497→306	30	20
		497→380	22	20

*定量离子。所有其它离子对为定性离子

结果

采用高流量Bond Elut Certify II小柱对样品进行SPE处理

筛选生物体液样品中的滥用药物需要有耐用的、具有高的纯化效率和高回收率的分析方法。Bond Elut Certify固相萃取柱正是专为快速高效地从尿液及其它生物基质中提取非极性阴离子化合物而开发的[1]。混合型（非极性C8及强阴离子交换剂）吸附剂同时具有非极性、极性和离子交换性质，这种特性优势保证了用它萃取多种类型药物时具有快速、简单、重现性好和净化能力强的特点。这些小柱可以快速高效地从全血中萃取THC、11-OH-THC 和THCA，且具有高回收率。

反吹

反吹可以使所建立的分析方法非常耐用并且运行周期短，它可以防止高沸点化合物在色谱柱中积聚，从而减少了组分保留时间的漂移、峰形扭曲和化学噪声，提高了定量准确性。反吹也减少了MS源的污染及仪器的日常全面清洗工作，同时运行时间得以缩短。这最终使分析方法的耐用性增强，具有优良的动态线性范围，运行时间仅需6 min（不包括样品制备时间），循环周期仅需8 min。

为保持色谱分离度，安捷伦微板流路控制技术组件能够以最小的死体积实现简便快速的反吹操作。在进样阶段，进样口动力控制模块（PCM）在足够长的时间里保持较高的压力，确保分析物从预柱转移到分析柱中（图1a）。反吹时，进样口压力降到1 psi，迫使气流反向通过预柱并从分流口放空（图1b）。THC、11-OH-THC 和THCA 就以这种方式进入分析柱进一步分离，而高沸点化合物被反吹并通过分流口被清除。

低热容模块

本方法还于GC柱温箱外使用了一个低热容（LTM）柱模块，它可单独优化控制分析柱柱温（图1）。这些组件的独特设计可以实现色谱柱非常快速的升温和冷却。LTM柱模块可以方便地加在安捷伦GC上，而无需对进样器、自动进样器或检测器做任何改动。

动态线性范围

本方法THC和11-OH-THC的动态线性范围是0.1-50 ng/mL，THCA的是1-100 ng/mL（图2），符合行业规范要求。定量准确度高，三种分析物的R²均为 0.999。

MRM 结果

使用MassHunter法医报告模板，THC及其两个代谢物的样品定量分析报告可以方便快捷地输出，报告附有包括内标在内的总离子流（TIC）色谱图和所有转换离子的谱图（图3-5）。请注意图中并没有干扰物的转换离子峰，甚至在每种分析物动态线性范围的浓度最低端也没有。

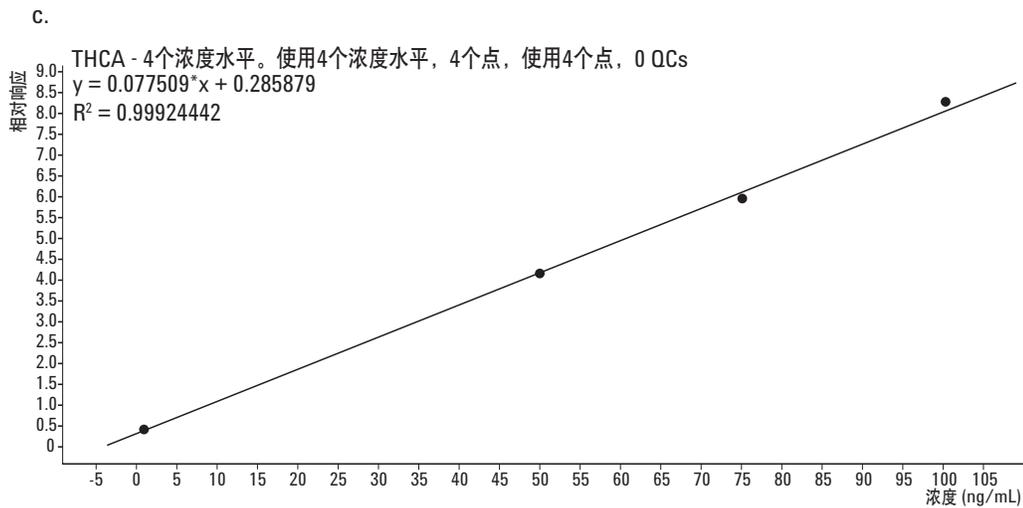
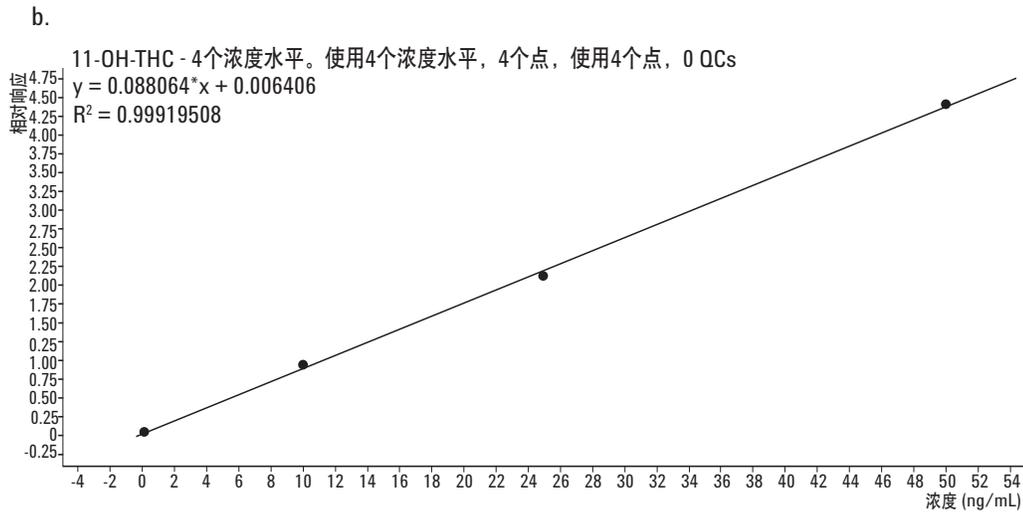
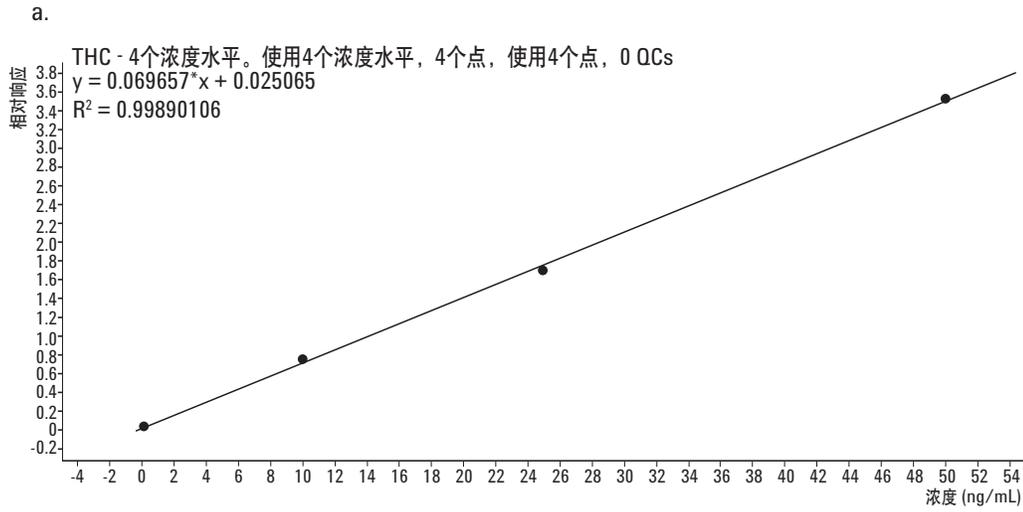
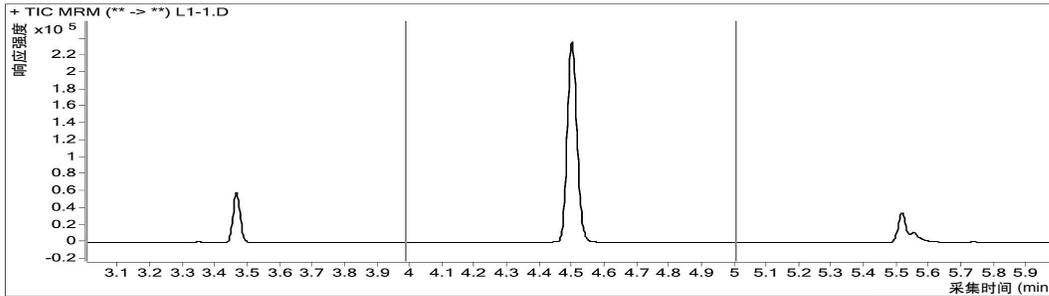


图2. 血液中THC (a)、11-OH-THC (b) 和THCA (c) 的校正曲线。THC和11-OH-THC采用 0.1、10、25和 50 ng/mL浓度点, THCA 采用1、50、75和 100 ng/mL浓度点

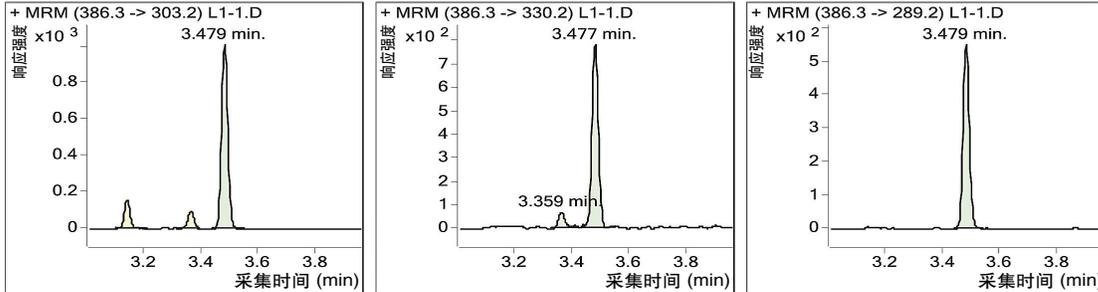
样品定量分析报告

数据文件 : L1-1.D
 操作者 : DATASYSTEM01/Admin
 采集方法名称 : LTM.THC.OMRM.7000.elex.m
 采集时间 : 2011-04-28 18:19
 样品名称及保存路径 : L1-1, D:/MassHunter/GCMS/1/data/04-28-2011-redo/
 样品瓶 : 3
 稀释倍数 : 0.0
 样品信息 :
 最后校正更新 : 2011-05-05 13:57

化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
D3-THC	389.3 -> 306.2	3.46		37956			
	389.3 -> 330.2			32853	86.6	64.3-104.3	
	389.3 -> 292.2			18032	47.5	22.8-62.8	
THC	386.3 -> 303.2	3.48	3.29 - 3.64	1554			0.100
	386.3 -> 330.2			1237	79.7	62.4-102.4	
	386.3 -> 289.2			848	54.6	23.6-63.6	



THC (目标)



D3-THC (内标)

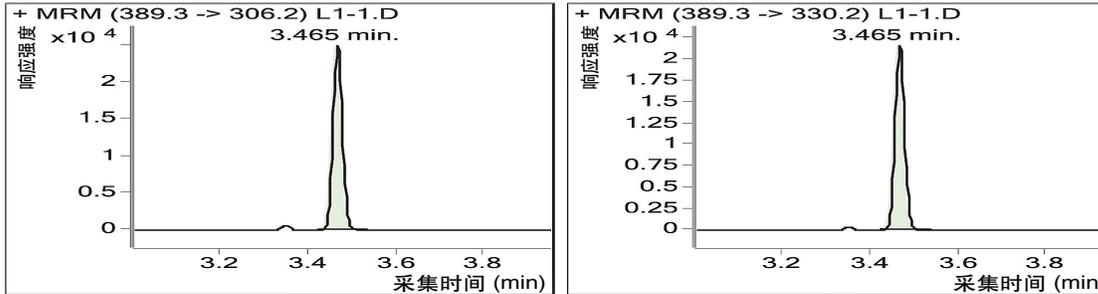
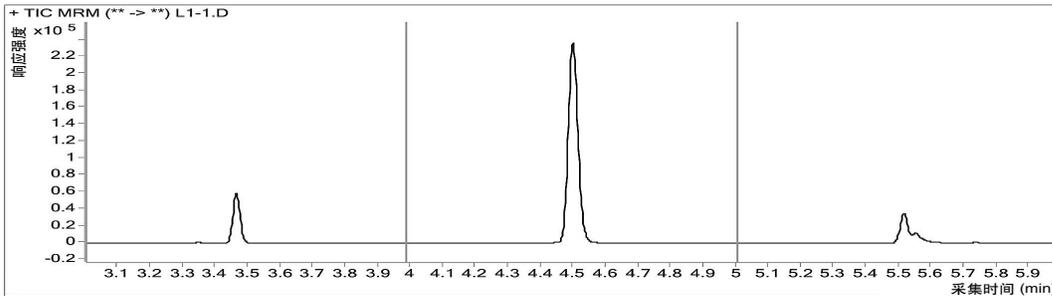


图3. 含0.1 ng/mL THC血液样品定量分析报告。RMS的信噪比为175:1, 噪音区间 3.6 - 3.9 min

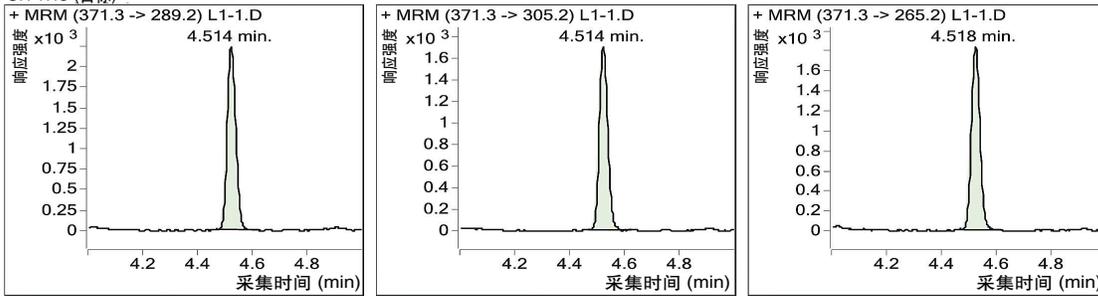
样品定量分析报告

数据文件 : L1-1.D
 操作者 : DATASYSTEM01\Admin
 采集方法名称 : LTM.THC.OMRM.7000.eie.xm
 采集时间 : 2011-04-28 18:19
 样品名称及保存路径 : L1-1, D:\MassHunter\GCMS\1\data\04-28-2011-redo\
 样品瓶 : 3
 稀释倍数 : 0.0
 样品信息 :
 最后校正更新 : 2011-05-05 13:57

化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
d3-OH-THC	374.3 -> 292.2	4.5		175705			
	374.3 -> 308.2			157882	89.9	68.8-108.8	
	374.3 -> 268.3			148545	84.5	59.4-99.4	
OH-THC	371.3 -> 289.2	4.51	4.27 - 4.72	4924			0.099
	371.3 -> 305.2			3707	75.3	67.4-107.4	
	371.3 -> 265.2			4050	82.3	58.2-98.2	



OH-THC (目标)



d3-OH-THC (内标)

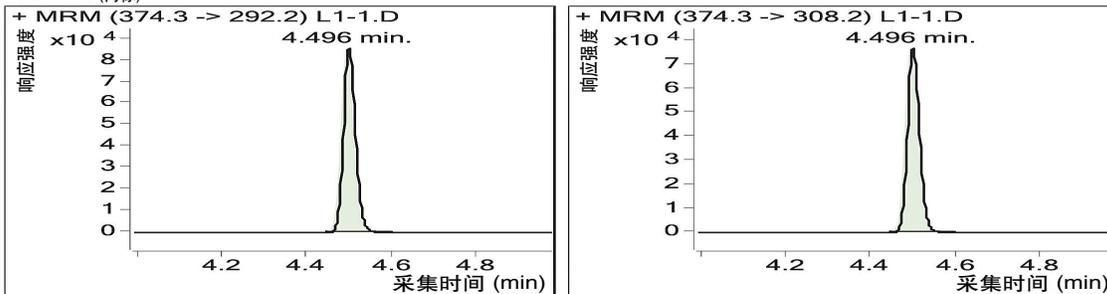
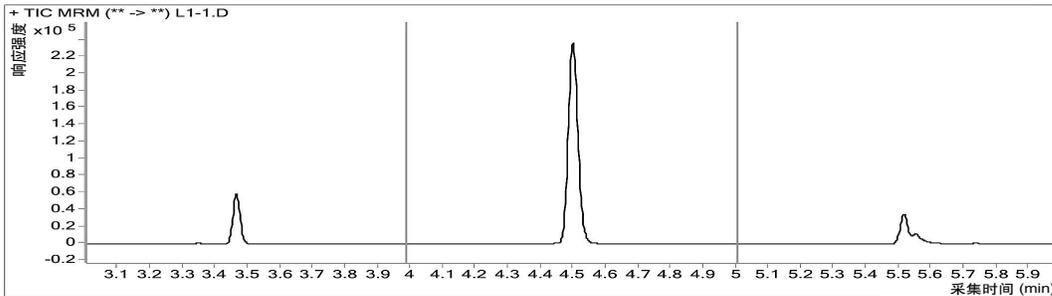


图4. 含0.1 ng/mL 11-OH-THC血液的样品定量分析报告。RMS信噪比为46:1，噪音区间4.6 -4.9 min

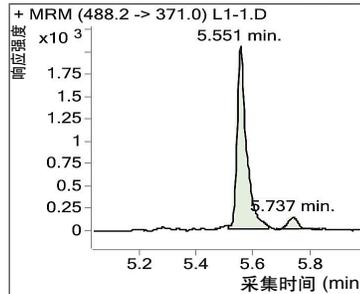
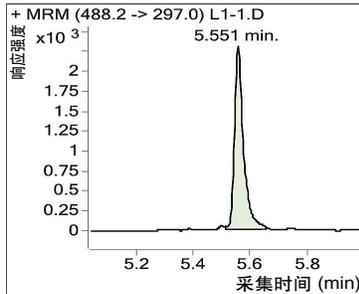
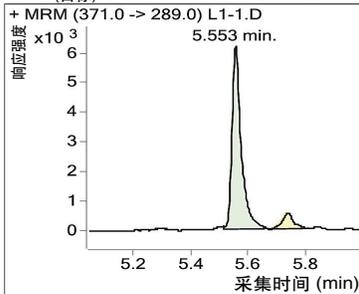
样品定量分析报告

数据文件 : L1-1.D
 操作者 : DATASYSTEM01\Admin
 采集方法名称 : LTM.THC.OMRM.7000.eiex.m
 采集时间 : 2011-04-28 18:19
 样品名称及保存路径 : L1-1, D:\MassHunter\GCMS\1\data\04-28-2011-redo\
 样品瓶 : 3
 稀释倍数 : 0.0
 样品信息 :
 最后校正更新 : 2011-05-05 13:57

化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
d9-THCA	380.0 -> 292.2	5.51		38358			
	497.0 -> 306.1			9800	25.5	5.6-45.6	
	497.0 -> 380.1			11765	30.7	12.5-52.5	
THCA	371.0 -> 289.0	5.55	5.26 - 5.82	13985			1.015
	488.2 -> 297.0			5124	36.6	9.1-49.1	
	488.2 -> 371.0			4758	34	14.4-54.4	



THCA (目标)



d9-THCA (内标)

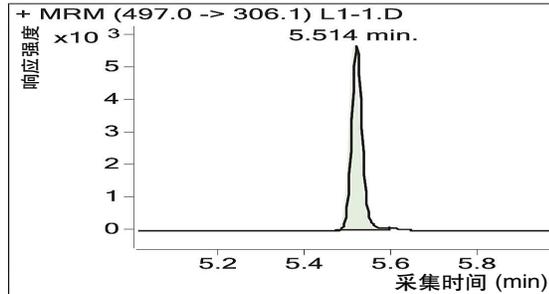
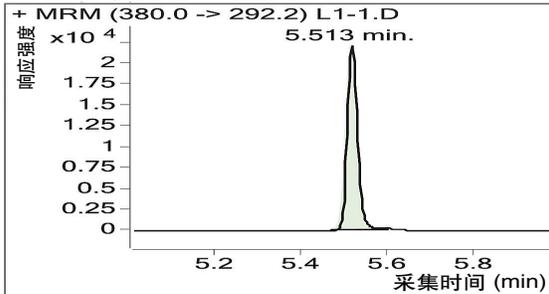


图5. 含1 ng/mL THCA血液样品的定量分析报告。RMS信噪比为39:1, 噪音区间5.1-5.3 min

结论

带有LTM的Agilent 7890N 气相色谱系统与Agilent 7000B三重串联四极杆GC/MS系统联用，建立了快速耐用的分析血中THC及其代谢物的方法。采用高流量Bond Elut Certify II SPE柱、GC柱反吹技术及MRM检测，可有效消除所有干扰，THC和11-OH-THC的定量动态线性范围是0.1-50 ng/mL，THCA的是1-100 ng/mL。LTM组件和反吹技术可以实现快速分析，分析运行时间6 min，实验循环周期8 min。

参考文献

1. R.M Sears, Solid Phase Extraction of THD, THC-COOH and 11-OH-THC from Whole Blood, Agilent Technologies Application Note 00315.

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、描述及技术规格等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

中国印刷

2011年7月5日

5990-8456CHCN



Agilent Technologies