

Быстрое и надежное обнаружение тетрагидроканнабинола и его метаболитов в крови

Методическая информация

Криминалистика/допинг-контроль

Автор

Стивен Бауман
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
USA (США)

Краткое содержание

Для обнаружения ТГК и его метаболитов в крови был разработан надежный метод с использованием твердофазной экстракции (ТФЭ) и газовой хроматографии с обратной продувкой в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ГХ-МС-МС). Динамический диапазон количественного определения составил от 0,1 до 50 нг/мл для ТГК и 11-ОН-ТГК и от 1 до 100 нг/мл для ТГКК при продолжительности анализа 6 минут и общей продолжительности цикла 8 минут.

Введение

За последнее десятилетие было выполнено большое количество исследований, связанных с влиянием употребления конопли на безопасность на дорогах. В частности, были опубликованы исследования о влиянии курения конопли на эффективность управления транспортным средством, а также эпидемиологические исследования и методики обнаружения конопли. В результате в нескольких странах были приняты законодательные акты об управлении автомобилем в состоянии наркотической интоксикации, в которых применяются различные подходы. Хотя для определения присутствия конопли использовались различные физиологические жидкости, анализ крови считается наиболее надежным индикатором нарушения. Анализ крови на наличие активного тетрагидроканнабинола (ТГК) также могут использовать работодатели для выявления работников, на работоспособность которых может влиять употребление конопли. Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) является стандартным методом обнаружения и количественного анализа ТГК и его метаболитов в крови.

Одним из ключевых факторов надежности определения ТГК в крови является эффективная методика экстракции. Использование tandemной масс-спектрометрии (МС-МС) также повышает чувствительность и надежность количественного определения ТГК и его метаболитов в крови за счет устранения



Agilent Technologies

интерференций. В данной методической информации описывается методика с применением патрона для ТФЭ High Flow Bond Elut Certify II, позволяющая быстро и эффективно экстрагировать ТГК и его метаболиты из крови. Экстракты химически модифицировали для улучшения летучести и анализировали на трехкврупольной системе ГХ-МС Agilent 7890А, оборудованной модулем низкой теплоемкости (LTM) с отдельным термостатом, а также системой обратной продувки. Данная система была в свою очередь объединена с трехкврупольной системой ГХ-МС Agilent 7000В, использующей возможности тандемной масс-спектрометрии (МС-МС) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) для обеспечения быстрого и чувствительного обнаружения ТГК и его метаболитов, 11-ОН-ТГК (11-гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинола) и ТГКК (11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты). Для повышения надежности и скорости использовали обратную продувку, которая позволила добиться продолжительности анализа 6 минут и общей продолжительности цикла 8 минут. Анализ МС-МС в режиме MRM на трехкврупольной системе ГХ-МС дает отличные результаты с динамическим диапазоном от 0,1 до 50 нг/мл.

Экспериментальная часть

Стандарты и реактивы

Тридейтерированный ТГК, 11-ОН-ТГК и ТГКК, использовавшиеся в качестве внутренних стандартов (100 мкг/мл в метаноле), и немеченые ТГК, 11-ОН-ТГК и ТГКК (100 мкг/мл в метаноле) были предоставлены компанией Cerilliant (Раунд-Рок, штат Техас, США). В этой методике обе концентрации внутренних стандартов составляли 10 мкг/мл.

Метанол, ацетонитрил, толуол, этилацетат, гексаны, ледяная уксусная кислота и метилхлорид были предоставлены компанией Sigma Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США). Все растворители имели степень чистоты «для ВЭЖХ» или более высокую, а все химические вещества имели степень чистоты, соответствующую стандарту ACS. Для этого метода использовали колонки для ТФЭ Agilent High Flow Bond Elut Certify II. Реагенты для химической модификации, BSTFA (N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид) и TMCS (триметилхлорсилан) были приобретены в компании Cerilliant. Нормальная человеческая цельная кровь, стабилизированная оксалатом калия и фторидом натрия, была приобретена в компании Bioreclamation (Хиксвилл, штат Нью-Йорк, США). Растворы стандартов приготовили в этой не содержащей наркотиков матрице для построения калибровочных кривых.

Приборы

Эксперименты выполняли на газовом хроматографе Agilent 7890А, оборудованном многорежимным испарителем (ММИ) и модулем низкой теплоемкости (LTM) с отдельным термостатом, объединенном с трехкврупольным ГХ-МС 7000В. Хроматографический эксперимент выполняли с использованием предколонки для обратной продувки и колонки в составе модуля низкой теплоемкости (LTM), подсоединенной с помощью соединителя Purged Ultimate Union (рис. 1). В табл. 1 приведены параметры приборов.

а.

Введение образца в предварительную колонку.



б.

Полуобратная продувка предколонки и отделение тетрагидроканнабиола и его метаболитов в основной колонке.



Рис. 1. Схема системы обратной продувки, использованной для разработки методики. Модуль электронного управления газовыми потоками; 7000В: трехкврупольная система ГХ-МС Agilent.

Таблица 1. Параметры газового хроматографа и трехквadrупольного масс-спектрометра Agilent 7890N/7000B

Параметры анализа ГХ	
Предколонка	секция 1 м от колонки Ultra Inert HP-5 ms, 15 м × 0,25 мм, 0,25 мкм (кат. номер 19091S-431UI)
Аналитическая колонка	колонка в составе модуля низкой теплоемкости (LTM) DB-17 ms, 15 м × 0,25 мм, 0,25 мкм (кат. номер 122-4712LTM)
Вводимый объем	1 мкл
Температура испарителя	изотермический режим, 280 °С
Режим ввода	0,5 мин, импульсный без деления потока при давлении 2,4 бар (35 psi)
Температуры термостата	термостат ГХ: выдерживание 6 мин при 280 °С (изотермический режим)
Модуль низкой теплоемкости (LTM):	выдерживание 50 секунд при 100 °С нагревание от 100 до 230 °С со скоростью 200 °С/мин нагревание от 230 до 280 °С со скоростью 10 °С/мин Выдерживание при 280 °С в течение 1 мин
Газ-носитель	гелий в режиме постоянного давления Предколонка: 0,069 бар (1 psi); колонка 1: 0,335 бар (5 psi); колонка 2: 0,662 бар (9,6 psi)
Температура соединительных капилляров	300 °С

Параметры МС

Настройка	автонастройка
Коэффициент усиления	20
Сбор данных	режим электронного удара (ЭУ); параметры мониторинга множественных реакций (MRM)
Газ для соударений	постоянный поток азота, 1,5 мл/мин
Газ для гашения	постоянный поток гелия, 2,25 мл/мин
Задержка для устранения эффектов растворителя	3,0 мин
Температуры МС	источник: 230 °С; квадруполь: 150 °С

Пробоподготовка

Пробу крови объемом 2 мл, содержащую 10 мкг/мл каждого из внутренних стандартов и добавки ТГК, 11-ОН-ТГК и ТГКК, перенесли с помощью пипетки в чистую пробирку и добавили 4 мл ацетонитрила. После центрифугирования при 2500 об/мин в течение 5 минут надосадочную жидкость отобрали, выпарили до объема приблизительно 3 мл с помощью азота температурой 35–40 °С и добавили 7 мл 0,1 М раствора ацетата натрия (рН 6,0).

Колонки для ТФЭ High Flow Bond Elut Certify II

кондиционировали с помощью сначала 2 мл метанола, а затем 2 мл 0,1 М буферного раствора ацетата натрия, рН 6,0 с 5% метанола. При этом не допускали высыхания патронов до введения пробы. Пробу прокачивали через колонку медленно, со скоростью от 1 до 2 мл/мин. Затем колонку промыли с помощью 2 мл буферного раствора ацетата натрия, рН 6,0, высушили при максимальном вакууме в течение приблизительно 5 минут, после чего промыли с помощью 1 мл гексанов. ТГК элюировали в нейтральных условиях с помощью 2 мл смеси гексан:этилацетат в соотношении 95:5. После этого осуществили промывку с помощью 5 мл смеси метанол:деионизированная вода в соотношении 1:1. Колонку повторно высушили при максимальном вакууме в течение приблизительно 5 минут, а затем снова промыли с помощью 1 мл гексанов. Элюирование 11-ОН-ТГК и ТГКК выполняли с помощью 2 мл 1% уксусной кислоты в смеси гексан:этилацетат в соотношении 75:25. Перед химической модификацией фракции ТГК и метаболитов объединили и высушили.

Растворитель выпарили в атмосфере азота при температуре не выше 40 °С, затем остаток растворили в 60 мкл толуола и 40 мкл BSTFA с 1% TMCS для химической модификации. Перед вводом в tandemную квадрупольную систему ГХ-МС пробирки с пробами закупорили и нагревали в течение 20 минут при 70 °С.

Таблица 2. Параметры анализа с помощью трехквadrупольной системы ГХ-МС Agilent 7000B

Соединение	Время удерживания (мин)		Время задержки (мс)	Энергия соударения (эВ)
		MRM		
ТГК (Δ9-тетрагидроканнабинол)	3.5	386→303*	25	20
		386→330	27	10
		386→289	30	25
ТГК-d3	3.5	389→306*	10	20
		389→330	11	10
		389→292	15	25
11-ОН-ТГК (11-гидрокси-Δ9-тетрагидроканнабинол)	4.5	371→289*	24	20
		371→305	26	15
		371→265	27	15
11-ОН-ТГК-d3	4.5	374→292*	10	20
		374→308	12	15
		374→268	12	15
ТГКК (11-нор-Δ9-Тetraгидроканнабинол-9-карбоновая кислота)	5.6	371→289*	23	15
		488→297	44	20
		488→371	29	20
ТГКК-d9	5.5	380→292*	15	15
		497→306	30	20
		497→380	22	20

* Целевой переход для количественного определения. Все остальные переходы служат для качественного подтверждения.

Параметры анализа

Использовавшиеся параметры трехкврупольной системы ГХ-МС Agilent показаны в табл. 2.

Результаты

Пробоподготовка для ТФЗ с использованием колонок High Flow Bond Elut Certify II

Скрининг на наличие наркотиков в биологических жидкостях требует применения надежных методик, обеспечивающих высокую степень очистки и извлечения. Продукты Bond Elut Certify были разработаны специально для быстрой и эффективной экстракции соединений, имеющих как неполярную, так и анионную природу, из мочи и других биологических матриц [1]. Сорбент смешанного типа (неполярная фаза С8 и сильная анионообменная фаза) сочетает в себе преимущества неполярных, полярных и ионообменных свойств, обеспечивая быструю, воспроизводимую, простую и не осложненную загрязнениями экстракцию наркотиков многих классов. Эти колонки позволяют быстро и с высоким выходом извлекать ТГК, 11-ОН-ТГК и ТГКК из цельной крови.

Обратная продувка

Обратная продувка делает эту методику очень надежной и быстрой, предотвращая накопление высококипящих соединений в колонке и, таким образом, уменьшая дрейф времени удерживания, искажение формы пиков и уровень шума, вызванного нежелательными химическими соединениями, вместе с тем улучшая характеристики количественного анализа. Загрязнение источника МС и связанная с этим необходимость очистки также уменьшилась, при этом время анализа сократилось. Конечным результатом стала надежная методика, обеспечивающая отличный динамический диапазон при продолжительности анализа 6 минут (без учета пробоподготовки) и общей продолжительностью цикла 8 минут.

Линейка модулей технологии капиллярных потоков Agilent обеспечивает простую и быструю обратную продувку с минимальными мертвыми объемами для поддержания высокого хроматографического разрешения. Во время ввода блок управления газовыми потоками (РСМ) в течение необходимого времени поддерживает повышенное давление в испарителе, чтобы обеспечить перенос целевых веществ из предколонки в аналитическую колонку (рис. 1а). При обратной продувке давление в испарителе опускается до 0,069 бар (1 psi), вынуждая поток двигаться в обратном

направлении через предколонку и выходить через клапан деления потока (рис. 1б). Таким образом, ТГК, 11-ОН-ТГК и ТГКК переходят в основную колонку для дальнейшего разделения, а высококипящие соединения выводятся обратно через клапан деления потока.

Модули низкой теплоемкости

В этой методике также используется колонка в составе модуля низкой теплоемкости (LTM), находящегося вне термостата ГХ и обеспечивающего независимое оптимальное регулирование температуры аналитической колонки (рис. 1). Уникальная конструкция этих модулей делает возможным задавать очень высокую скорость нагрева и обеспечивать быстрое охлаждение. Возможно добавление модулей колонки LTM к ГХ Agilent, причем не потребуются внесения каких-либо изменений в устройства для ввода проб, автосамплеры и детекторы.

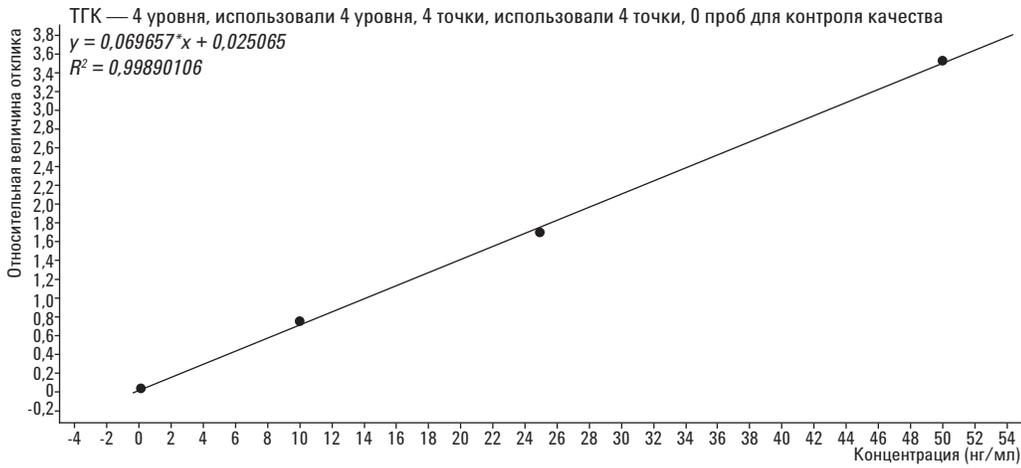
Динамический диапазон

Эта методика характеризуется динамическим диапазоном от 0,1 до 50 нг/мл для ТГК и 11-ОН-ТГК и от 1 до 100 нг/мл для ТГКК (рис. 2), что соответствует отраслевым нормам. Точность количественного анализа также является достаточно высокой, с $R^2 = 0,999$ для всех трех аналитов.

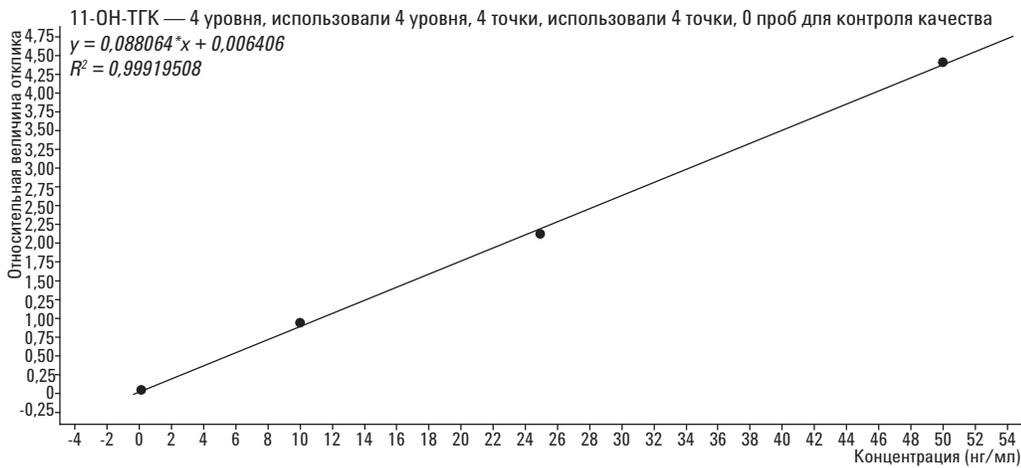
Результаты MRM

С помощью шаблона отчета для судмедэкспертизы программы MassHunter были быстро и просто подготовлены отчеты о результатах количественного анализа для ТГК и его двух аналитов (рис. 3–5), где представлены хроматограммы по полному ионному току и спектры для всех переходов, в том числе для внутреннего стандарта. Обратите внимание на отсутствие интерференций для всех переходов, даже в нижнем конце динамического диапазона для каждого аналита.

а.



б.



с.

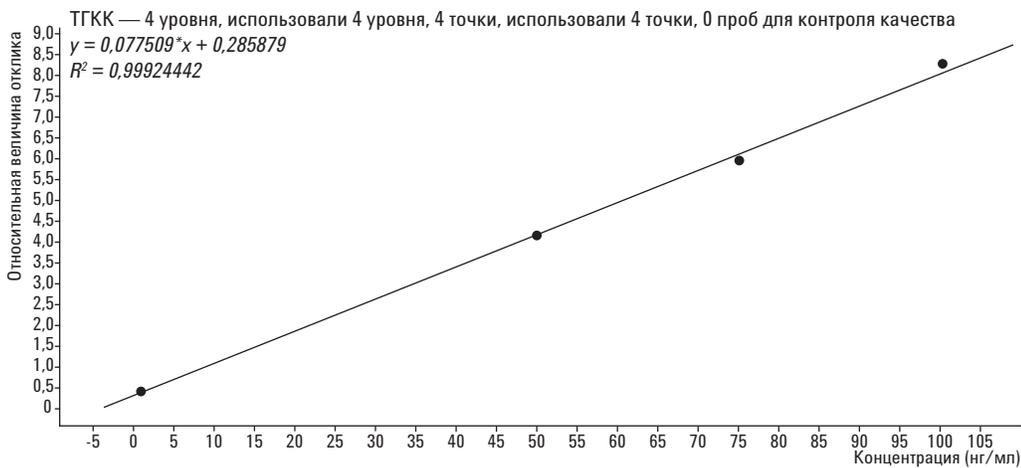
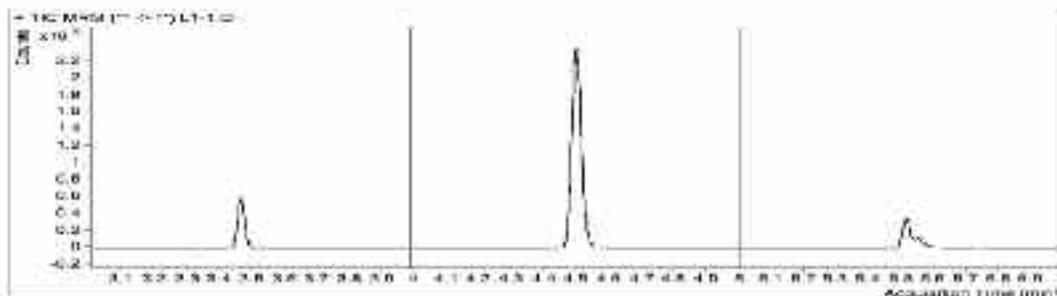


Рис. 2. Калибровочные кривые для ТГК (а), 11-ОН-ТГК (б) и ТГКК (с) в крови. Данные были взяты при концентрациях 0,1, 10, 25 и 50 нг/мл для ТГК и 11-ОН-ТГК и при 1, 50, 75 и 100 нг/мл для ТГКК.

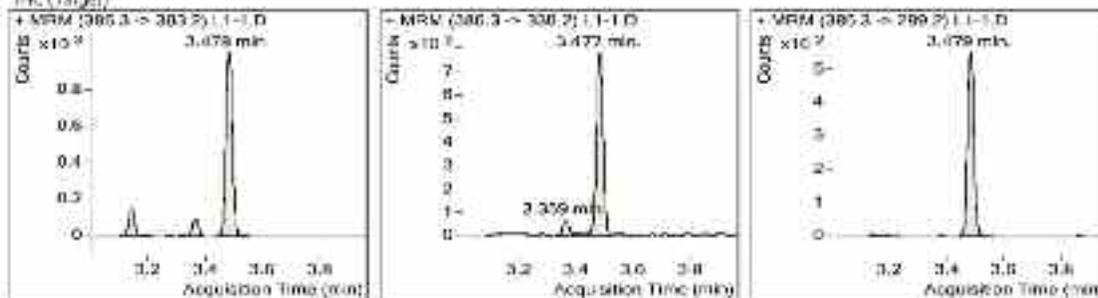
Quantitative Analysis Sample Report

Data File : L1-1.D
 Operator : DATASYSTEM\wmm
 Acq Method Name : LTM.THC.QMRL7000.dia.m
 Acquisition date : 2011-05-28 18:19
 Sample Name & Path : L1-1, 0:\New folder\GCMS\data\04-18-2011-mcb\
 Vial : 3
 Dilution : 0.0
 Sample Info :
 Last Calib update : 2011-05-06 13:57

Compnd	Signal	RT	Limits	Response	QRatio	Limbs	Final Conc
DO THC	389.3 → 306.2	3.46		37096			
	399.2 → 330.2			20051	95.6	64.3-104.3	
	380.3 → 292.2			18037	47.5	23.6-53.8	
THC	359.3 → 303.2	3.48	3.29-3.64	1551			0.105
	389.2 → 330.2			1237	79.7	67.4-107.4	
	386.3 → 289.2			898	51.6	23.6-53.6	



TIC (Target)



DO-THC (Inst)

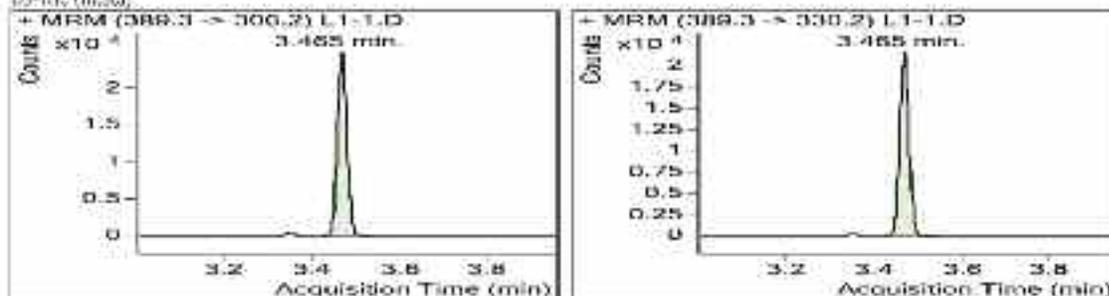
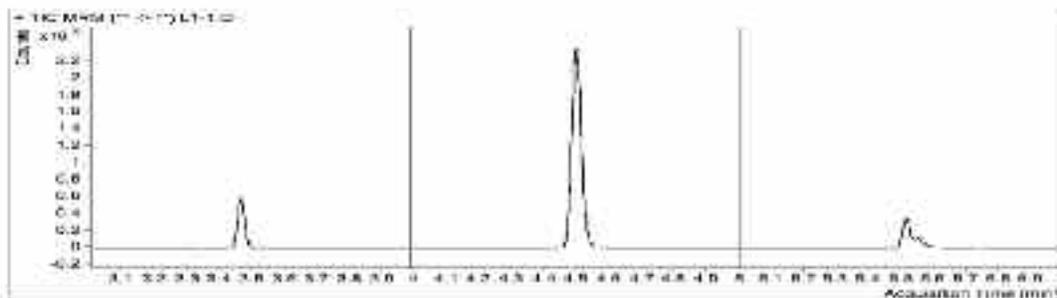


Рис. 3. Отчет о количественном анализе пробы с 0,1 нг/мл ТГК в крови. Среднеквадратичное значение соотношения «сигнал — шум» составляет 175:1, измерение шума осуществляли в промежутке от 3,6 до 3,9 мин.

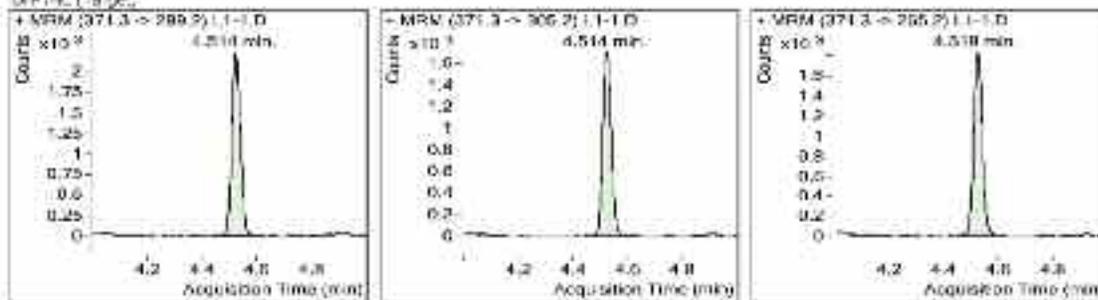
Quantitative Analysis Sample Report

Data File : L1-1.D
 Operator : DATASYSTEM\wmm
 Acq Method Name : L1\TIC.METHOD\17000.dia.m
 Acquisition date : 2011-05-28 18:19
 Sample Name & Path : L1-1_0:\New folder\GCMS\data\04-18-2011-mcb
 Vial : 3
 Dilution : 0.0
 Sample Info :
 Last Calib update : 2011-05-06 13:57

Compnd	Signal	RT	Limits	Response	QRatio	Limbs	Final Conc
11-OH-TTC	374.3 -> 292.2	4.5		175705			
	374.3 -> 308.2			157952	99.9	69.9-100.8	
	374.3 -> 268.3			148545	84.5	50.4-10.4	
OH-TTC	371.3 -> 289.2	4.51	4.27 - 4.72	4921			0.099
	371.3 -> 305.2			2707	75.3	67.4-107.4	
	371.3 -> 265.2			4050	82.3	55.2-10.2	



11-OH-TTC Target



OH-TTC (Unstd)

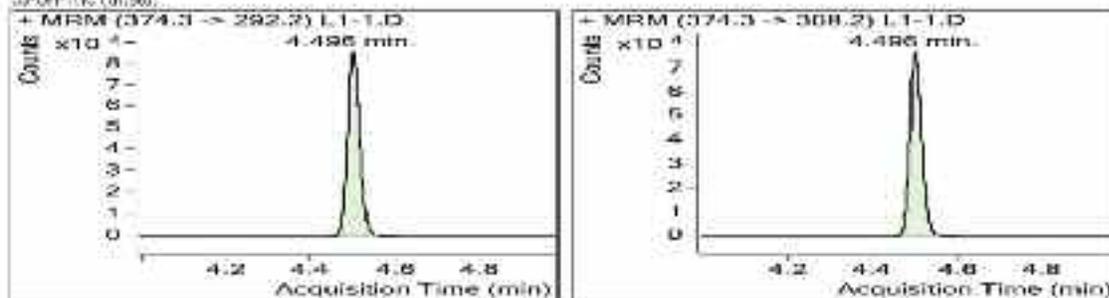
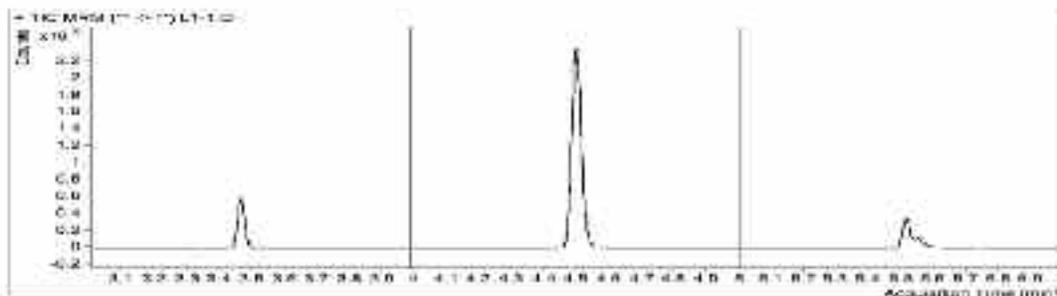


Рис. 4. Отчет о количественном анализе пробы с 0,1 нг/мл 11-ОН-ТТК в крови. Среднеквадратичное значение соотношения «сигнал — шум» составляет 46:1, измерение шума осуществляли в промежутке от 4,6 до 4,9 мин.

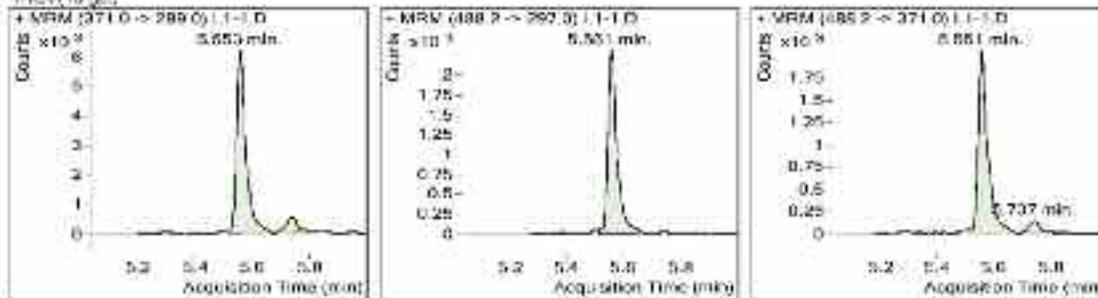
Quantitative Analysis Sample Report

Data File : L1-1.D
 Operator : DATASYSTEM\wmm
 Acq Method Name : LTR.THC.QMRM.L7000.dia.m
 Acquisition date : 2011-05-28 18:19
 Sample Name & Path : L1-1_0:\New folder\GCMS\1\data\04-18-2011-mcb\
 Vial : 3
 Dilution : 0.0
 Sample Info :
 Last Calib update : 2011-05-06 13:57

Compnd	Signal	RT	Limits	Response	QRatio	Limbs	Final Conc
d9-THCA	390.0 -> 292.2	5.51		38258			
	467.0 -> 300.1			9070	23.0	5.0-75.0	
	407.0 -> 380.1			11762	30.7	12.5-52.5	
THCA	371.0 -> 289.0	5.55	5.25 - 5.82	43984			1.015
	460.7 -> 297.0			2174	35.6	8.1-45.1	
	468.2 -> 371.0			4758	31	11.1-54.1	



THCA (Target)



d9-THCA (metab)

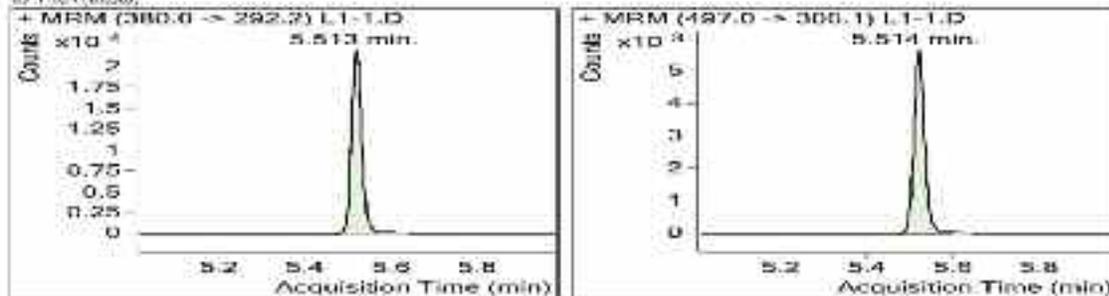


Рис. 5. Отчет о количественном анализе пробы с 1 нг/мл ТГКК в крови. Среднеквадратичное значение соотношения «сигнал — шум» составляет 39:1, измерение шума осуществляли в промежутке от 5,1 до 5,3 мин.

Выводы

Сочетание газового хроматографа Agilent 7890A, использующего систему с модулем низкой теплоемкости, с трехкврупольной системой ГХ-МС Agilent 7000B позволяет получить быстрый и надежный метод для анализа ТГК и его метаболитов в крови. Использование патрона для ТФЭ High Flow Bond Elut Certify II, обратная продувка колонки для газовой хроматографии и режим MRM устраняют все интерференции, вследствие чего динамический диапазон количественного анализа составляет от 0,1 до 50 нг/мл для ТГК и 11-ОН-ТГК и от 1 до 100 нг/мл для ТГКК. Модуль низкой теплоемкости и обратная продувка позволяют добиться повышения скорости анализа, причем его продолжительность составляет 6 минут, а общая продолжительность цикла — 8 минут.

Литература

1. R.M Sears, Solid Phase Extraction of THC, THC-COOH and 11-OH-THC from Whole Blood, Agilent Technologies Application Note 00315. (Твердофазная экстракция THC, THC-COOH и 11-ОН-THC из цельной крови, Agilent Technologies, методическая информация 00315)

Дополнительная информация

Представленные данные отражают типичные результаты. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу: www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2011
Напечатано в США
5 июля 2011 г.
5990-8456RU



Agilent Technologies