

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化产品对毛发中的羧基-THC 进行 LC/MS/MS 测定

作者

Mariá Del Bianco Luppi
JM BioAnalises
巴西圣保罗州博图卡图
Simone Nascimento 和
Leonardo Valentin
安捷伦科技有限公司
巴西圣保罗州巴鲁埃里

摘要

本应用简报比较了两种 LC/MS/MS 型号，即 Agilent 6470A 三重四极杆液质联用系统和 Agilent 6495C 三重四极杆液质联用系统。本研究总结了可用于复杂毛发基质的样品前处理技术。同时还介绍了使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 执行净化步骤时选择用于验证的最终方法，以达到毛发中羧基-THC 0.2 ng/g 的临界浓度。

前言

通过毛发测试滥用药物已有 50 多年的历史。与生物体液相比，毛发测试的一个优势在于它可提供更大的药物检测窗口期。许多药物在毛发中保存完好。一个示例是在一具距今 900 年的木乃伊的毛发中检出了可卡因。毛发测试的应用包括刑事调查，核实吸毒史，鉴定药物辅助性侵犯，在儿童监护权案件中证明毒品的使用，假释犯、药物治疗参与者或员工的戒断监测，记录宫内暴露情况，以及确定某人是否经常吸食大麻从而确定能否重新申领驾照。图 1 显示了大麻素进入人体毛发的可能途径。

由于毛发易于收集、很难掺假且具有较长的检测期限，因此工作场所检测计划包括毛发检测。许多国家/地区均发布了工作场所毛发检测指南。指南确定大麻代谢物/mg 毛发的初始测试临界浓度为 1 pg。在巴西，该限值由国际毛发分析协会 (SoHT) 规定，每毫克毛发中 11-nor-9-羧基- Δ^9 -四氢大麻酚 (THC-COOH) 的确认性临界浓度为 0.0002 ng^[2]。使用足够灵敏的特定分析流程对毛发中的药物进行检测和定量非常重要，这同时也是工作流程中的瓶颈。这对毛发中的低浓度大麻素尤其重要。免疫分析测试已得到广泛应用，但在灵敏度、选择性和成本方面仍然存在挑战。

色谱测定具有更高的特异性，可选择作为毛发中大麻素的确定方法，提供良好的检测限 (LOD) 和定量限。灵敏的免疫分析和气相色谱测定具有更高的特异性，是确定毛发中大麻素的不错选择，可提供较低的 LOD 和定量限 (LOQ)。使用灵敏的免疫分析、电子电离 (EI) 气相色谱/质谱 (GC/MS)、负化学电离 (CI) GC/MS，以及气相色谱/串联质谱 (GC/MS/MS) 检测毛发中大麻素的方法已有报道，其限值仅为 SoHT 要求的 1/100-1/20，但需要进行衍生化步骤^[3-10]。

使用 LC/MS/MS 方法最大的优势在于无需衍生化，且该方法可用于筛查和确认性测试。然而，与 GC/MS/MS 法相比，LC/MS/MS 法在大麻代谢物的检测和定量方面存在不足，GC/MS/MS 在达到检测限时可提供丰度最高的信号。这一局限性最终会因毛发基质的复杂性而在 LC/MS/MS 技术中产生，并观察到离子抑制。仅在临界浓度或更低浓度下的代谢物才会产生明显的上述效应。表 1 列出了目标分析物的特征。

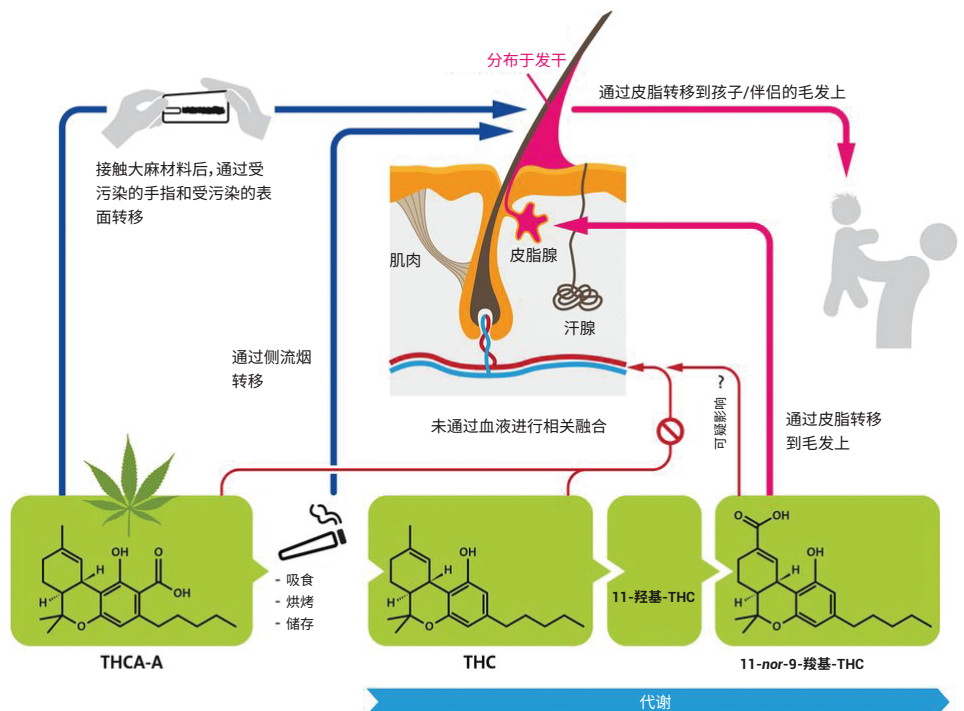


图 1. 大麻素进入人体毛发的潜在途径^[1]

实验部分

材料和试剂

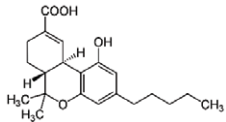
使用的材料如下：

- Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱，3 mL，300 mg (部件号 5190-1003)，用于处理 40 mg 毛发，以及 1 mL，40 mg (部件号 5190-1002) 或 96 孔板 (部件号 5190-1000)，用于处理 25 mg 毛发
- Vac Elut 20 真空萃取装置，带 16 × 100 mm 试管收集架 (部件号 12234103)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 3.0 × 150 mm, 1.9 μm (部件号 693675-312)，Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 3 × 5 mm, 1.9 μm, UHPLC 保护柱 (部件号 823750-943)
- Agilent 1290 Infinity II 在线过滤器，0.3 μm (部件号 5067-6189)

使用的化学品如下：

- 羧基-THC 和 羧基-THC-d₃ 标准品分别购自 Cerilliant 和 LGC
- GC 级正己烷和乙酸乙酯 (EtOAc)，以及 LC/MS 级甲醇 (MeOH) 均购自 J.T. Baker
- ACS 级氢氧化钠 (NaOH) 和乙酸购自 Merck/Sigma
- 超纯水购自 Milli-Q

表 1. 目标分析物、log P、分子式和化学结构

名称	Log P	分子式	结构
羧基-THC	6.21	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	

标样和溶液

- 氢氧化钠 1 mol/L (毛发消解液)：**称取 NaOH (4 g) 置于烧杯中。用 50 mL 水溶解后，将溶液转移至 100 mL 容量瓶中。用少量水洗涤烧杯 2-3 次。将溶液超声处理 1 分钟，然后用水标定至容量瓶刻度。将溶液保存在带塑料盖的瓶中

注意：当水加入氢氧化钠时会释放热量。

- 正己烷和 EtOAc (9:1 v/v) (毛发萃取溶剂)：**将 90 mL 己烷和 10 mL 乙酸乙酯混合均匀
- MeOH/水 (80:20 v/v) (Captiva EMR-Lipid 溶剂)：**将 80 mL 甲醇和 20 mL 超纯水混合均匀
- 内标 (IS) — 羧基-THC-d₃：**用 MeOH 配制含 8 ng/mL 羧基-THC-d₃ 的 IS 溶液，相当于基质中 8 ng/g
- 校准曲线标样 — 羧基-THC (CCS)：**用 MeOH 配制浓度分别为 0.15、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 ng/mL 的六个校准标样
- 质量控制 (QC) 溶液 (羧基-THC)：**用 0.2 ng/mL 的溶液对批次进行质量控制。在开始分析之前，将 0.04 ng/mL 的溶液进样至 LC/MS/MS 中评估系统适用性

样品前处理方法

依次用水、丙酮和二氯甲烷 (DCM) 对毛发样品进行 1 分钟的涡旋清洗。干燥毛发并将其剪成小块。随后，样品前处理方法包括四个阶段：1) 毛发消解和预净化，2) 液液萃取 (LLE)，3) Captiva EMR-Lipid 净化，以及 4) LC/MS/MS 进样。

1. 毛发消解

称取 40 mg 的负离子毛发置于顶空样品瓶中。建议使用硅烷化样品瓶，以防止静电作用导致毛发粘在样品瓶壁上。然后按如下方式对空白毛发样品进行加标：

- 空白 — 加入 40 μL IS
- 双空白 (无 IS)
- 标样 1-6 分别预加标 40 μL 的校准曲线标准溶液，以及 40 μL 的 IS 溶液，使毛发中羧基-THC 的最终浓度为 0.15、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 ng/g
- QC 中预加标 40 μL 的 QC 溶液和 40 μL 的 IS 溶液，生成毛发中羧基-THC 最终浓度为 0.2 ng/g
- 将 40 μL IS 溶液添加至剩余的样品中进行批量测试

将加标的毛发样品平衡 3 分钟。加入 2 mL 1 mol/L NaOH 溶液。将样品瓶加盖，于 100 °C 下温育 30 分钟，然后冷却至室温。

加入 5 mL 正己烷/EtOAc (9:1 v/v)。将样品涡旋混合 1 分钟，并在需要时以 4000 rpm 的转速离心 5 分钟，实现明显的相分离。弃去上层有机层。加入 2 mL 乙酸并混合样品。

可使用采用 25 mg 毛发和 Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱的另一种流程进行适当的体积调节。图 2 和图 3 显示了使用 40 和 25 mg 样品量的方法工作流程。

2. 液液萃取 (LLE)

加入 5 mL 正己烷/EtOAc (9:1, v/v)。将样品涡旋混合 1 分钟，并根据需要进行离心。将上层转移至另一管内。重复两次以上此 LLE 流程，转移并混合上层有机层。混合后的有机萃取液在 50 °C N₂ 流吹扫下挥干。然后用 1.5 mL MeOH/水 (8:2 v/v) 复溶干燥的样品，超声处理 1.5 分钟后涡旋混合 30 秒。

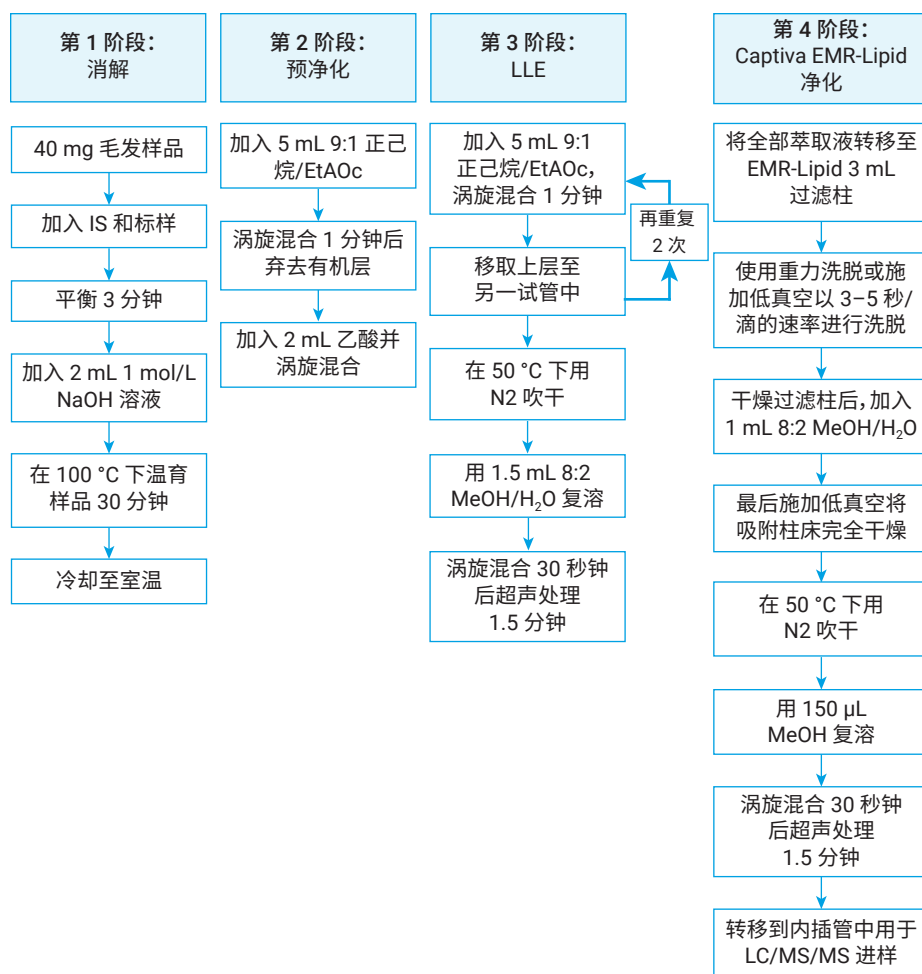


图 2. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL 过滤柱分析 40 mg 毛发的样品前处理工作流程

3. Captiva EMR-Lipid 净化

将 1.5 mL 复溶样品转移至 Captiva EMR-Lipid 3 mL 过滤柱中。通过重力以 3-5 秒/滴的速率洗脱样品。根据需要使用低真空。当过滤柱内无可见液体时，加入 1 mL MeOH/水 (8:2 v/v) 进行二次洗脱。根据需要使用真空。洗脱液在 50 °C N₂ 流吹扫下挥干。用 150 μL MeOH 复溶干燥的样品，涡旋混合 30 秒后超声处理 1.5 分钟。将样品转移至带内插管的 2 mL 样品瓶中，用于 LC/MS/MS 进样。

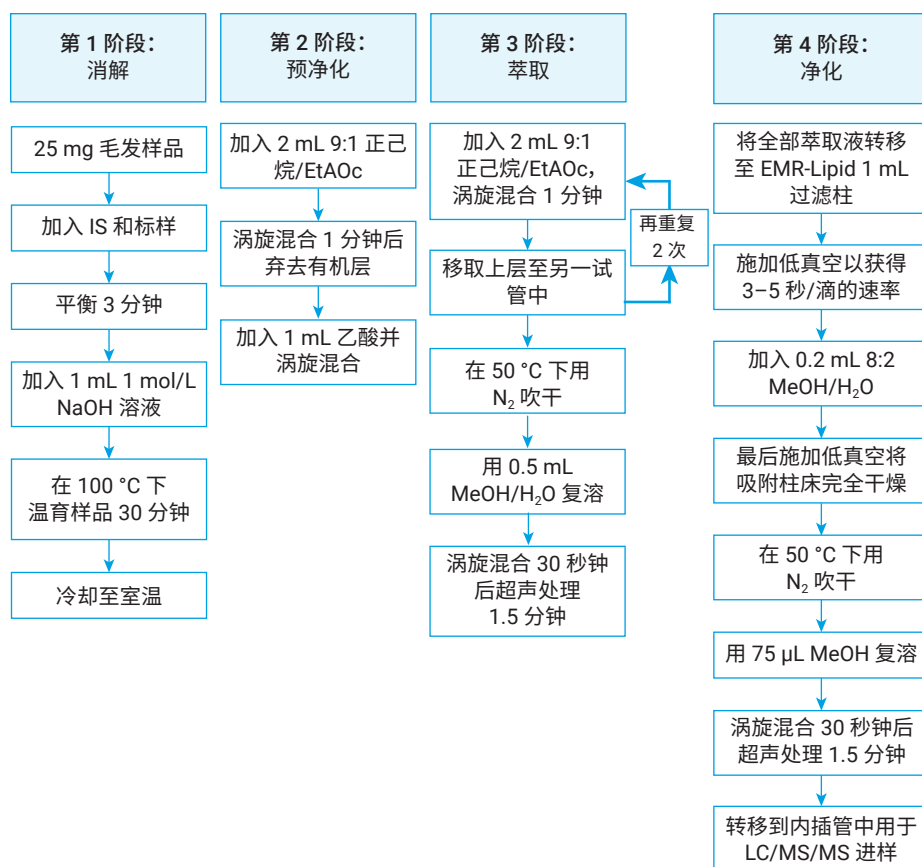


图 3. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱分析 25 mg 毛发的样品前处理工作流程

仪器方法

样品在 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱上运行，该系统与配备安捷伦喷射流 iFunnel 电喷雾离子源的 Agilent 6495C 三重四极杆液质联用系统联用。表 2 和表 3 显示了仪器方法的详细信息。

在每日的样品分析之前，通过进样 0.04 ng/mL 的 MeOH 标准溶液进行系统适用性测试。

表 2. LC/MS/MS 条件

参数	值																														
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (3.0 × 150 mm; 1.9 μm) 和保护柱。自动进样器上的在线过滤器。																														
柱温	50 °C																														
进样量	5 μL																														
流动相	A) 含 0.01% 乙酸的水溶液 B) 含 0.01% 乙酸的甲醇溶液																														
流速	0.5 mL/min																														
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.00</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr><td>0.50</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr><td>2.00</td><td>25</td><td>75</td></tr> <tr><td>5.00</td><td>25</td><td>75</td></tr> <tr><td>8.00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>9.00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>9.01</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.00</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.01</td><td>55</td><td>45</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%A	%B	0.00	55	45	0.50	55	45	2.00	25	75	5.00	25	75	8.00	20	80	9.00	20	80	9.01	0	100	12.00	0	100	12.01	55	45
时间 (min)	%A	%B																													
0.00	55	45																													
0.50	55	45																													
2.00	25	75																													
5.00	25	75																													
8.00	20	80																													
9.00	20	80																													
9.01	0	100																													
12.00	0	100																													
12.01	55	45																													
结束运行时间	12.02																														
后运行时间	3 分钟																														
总运行时间	15 分钟																														

表 3. 数据采集参数

Agilent 6495C 质谱条件	
模式	MRM
干燥气温度	300 °C
气化温度	450 °C
干燥气流速	13 L/min
雾化器压力	50 psi
毛细管电压	4500 V
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	385 °C
喷嘴电压	2000 V
高压 RF (+)	0
高压 RF (-)	130
低压 RF (+)	0
低压 RF (-)	140
Delta EMV (-)	800

化合物名称	母离子	子离子	CE	CAV	极性
羧基-THC	343.2	245.1	32	4	负
	343.2	191.1	33	3	负
羧基-THC d ₃	346.2	302.2	20	3	负
	346.2	194.1	20	3	负

结果与讨论

已发表了多种萃取毛发中羧基-THC 的样品前处理方法。这些方法通常包括三个预处理步骤：1) 毛发样品的清洁，2) 切割或粉碎，以及 3) 称取 10–50 mg 毛发用于样品分析。然后，将毛发置于酸性或碱性溶液中温育，并使用有机溶剂进行萃取。

本研究选择 NaOH 进行碱性消解。然后使用 LLE 萃取毛发消解混合物，并用 Captiva EMR-Lipid 过滤柱进行净化。整个方法由于可有效去除盐、蛋白质和脂质，因此可提供较高的回收率和较低的离子抑制。表 4 显示了用于毛发萃取和净化的典型样品前处理技术的比较。

如图 4 所示，在毛发 0.15–3.2 ng/g 的校准范围内，四次重复进样的校准曲线呈线性， $R^2 > 0.99$ 。加标浓度 0.2 ng/g 毛发七次重复进样的回收率平均值保持在 110%，RSD 为 8.8%，加标浓度 0.8 ng/g 毛发七次重复进样的回收率平均值保持在 101%，RSD 为 7.8%。如图 5 所示，6495C 三重四极杆液质联用系统对羧基-THC 加标浓度为 0.2 ng/g 的毛发的响应是 6470A 三重四极杆液质联用系统的三倍。图 6 显示了两种 MRM 下的毛发基质空白和处于临界浓度的五个重复样品。

表 4. 毛发基质中羧基-THC 的低定量限 (0.0002 ng/mg) 样品前处理方法的比较

样品前处理方法	优点	缺点
LLE	<ul style="list-style-type: none"> 在消解步骤中去除盐和蛋白质 易于应用 可萃取多种化合物 	<ul style="list-style-type: none"> 与目标分析物共萃取的脂质会导致仪器出现分析问题 高离子抑制，缺乏方法稳定性
进行 LLE 和不进行 LLE 的 SPE 阴离子交换	<ul style="list-style-type: none"> 在消解步骤中去除盐和蛋白质 最终的进样萃取物比 LLE 的更干净 更高的分析物回收率 	<ul style="list-style-type: none"> 虽然萃取物比 LLE 的更干净，但仍存在高离子抑制 萃取和净化方案中包含更多步骤
进行 LLE 和不进行 LLE 的 SPE 阳离子交换	<ul style="list-style-type: none"> 在消解步骤中去除盐和蛋白质 最终的进样萃取物比 LLE 的更干净 更低的离子抑制 	<ul style="list-style-type: none"> 与 LLE 和阴离子交换相比，萃取物更干净，但分析物回收率较低 萃取和净化方案中包含更多步骤
利用 Agilent Captiva EMR-Lipid 的 LLE	<ul style="list-style-type: none"> 在消解步骤中去除盐、蛋白质和脂质 最终的进样萃取物比 LLE 的更干净 更低的离子抑制 	<ul style="list-style-type: none"> 萃取和净化方案中包含更多步骤

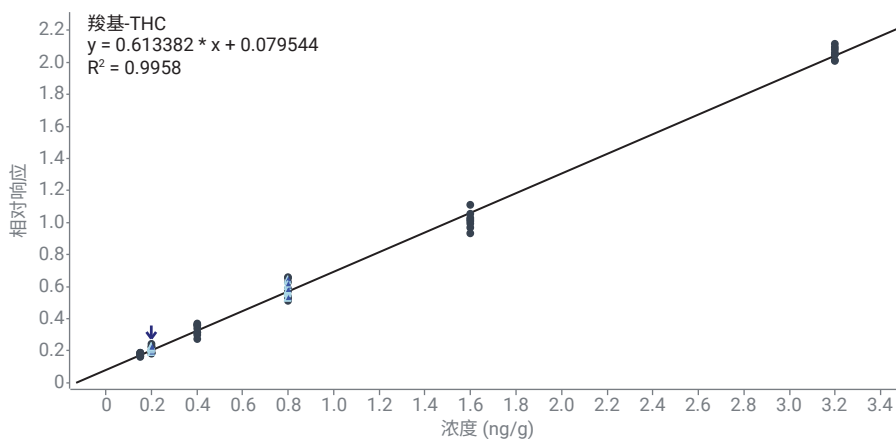
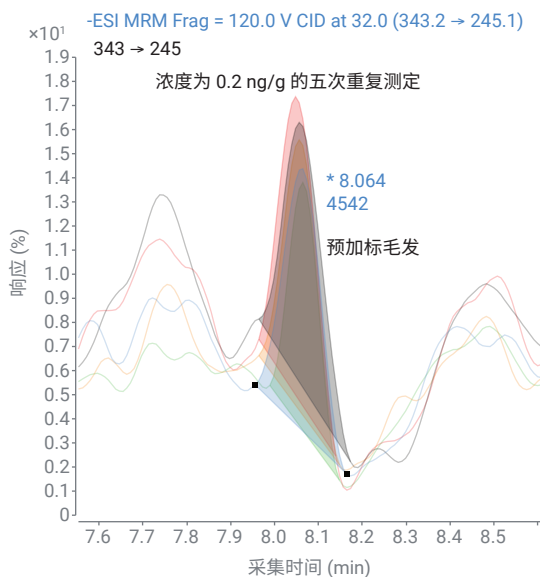
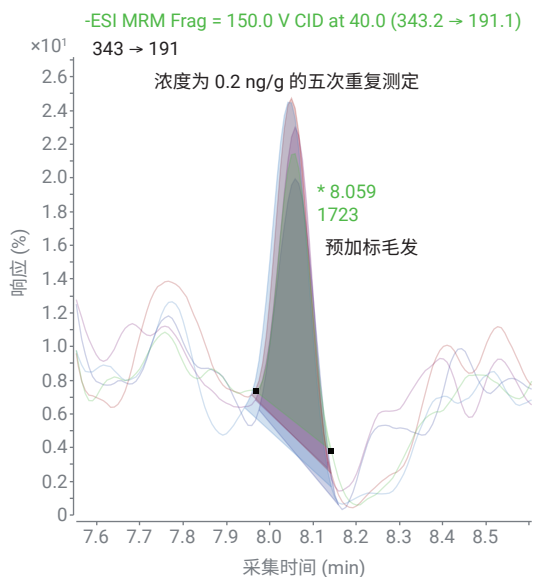


图 4. 毛发中 0.15–3.2 ng/g 羧基-THC 的校准曲线。蓝色三角形表示在毛发 QC 样品 0.2 ng/g 和 0.8 ng/g 的临界浓度下重复萃取 7 次

Agilent 6470A



Agilent 6495C

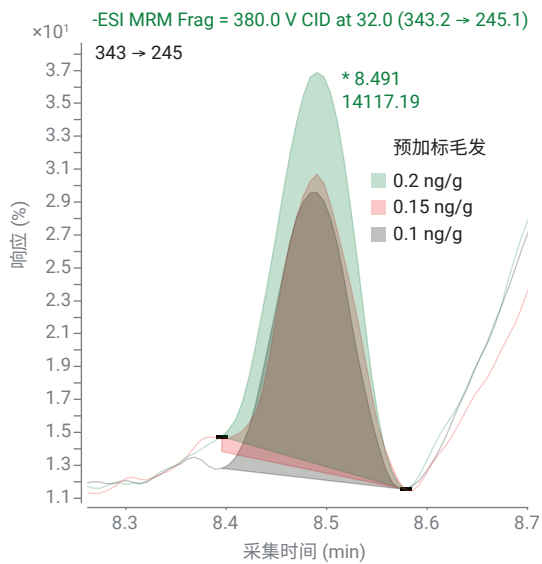
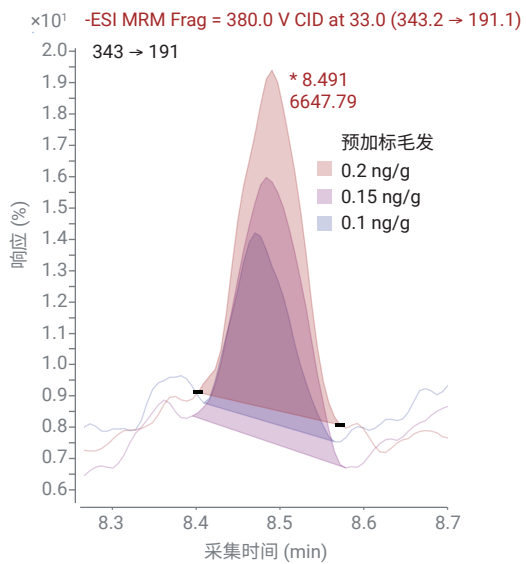
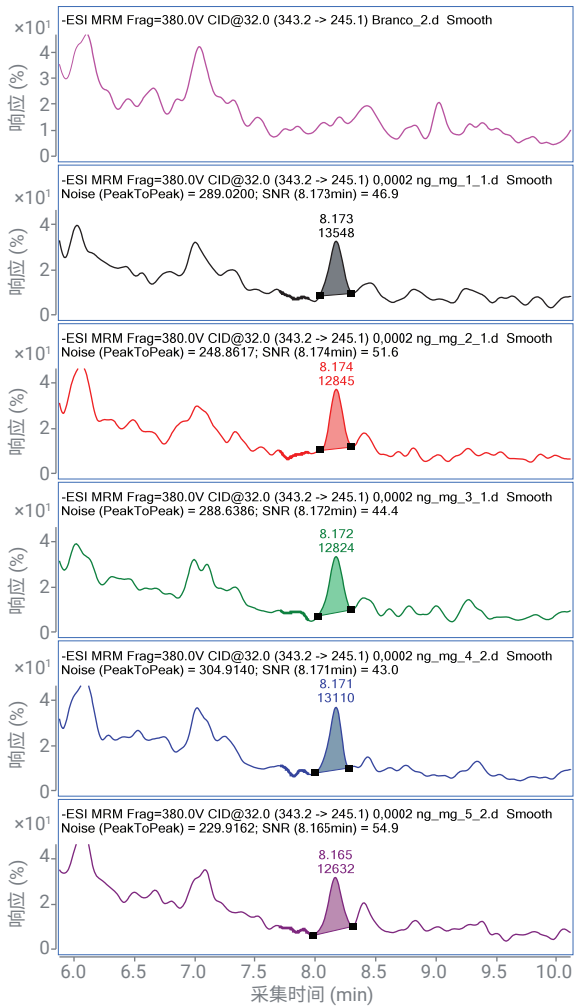


图 5. 分别使用 Agilent 6470A 和 6495C 三重四极杆液质联用系统测定 0.2 ng/g 的毛发中羧基-THC 的结果



毛发空白

毛发加标浓度为
0.2 ng/g 的第 1 次萃取

毛发加标浓度为
0.2 ng/g 的第 2 次萃取

毛发加标浓度为
0.2 ng/g 的第 3 次萃取

毛发加标浓度为
0.2 ng/g 的第 4 次萃取

毛发加标浓度为
0.2 ng/g 的第 5 次萃取

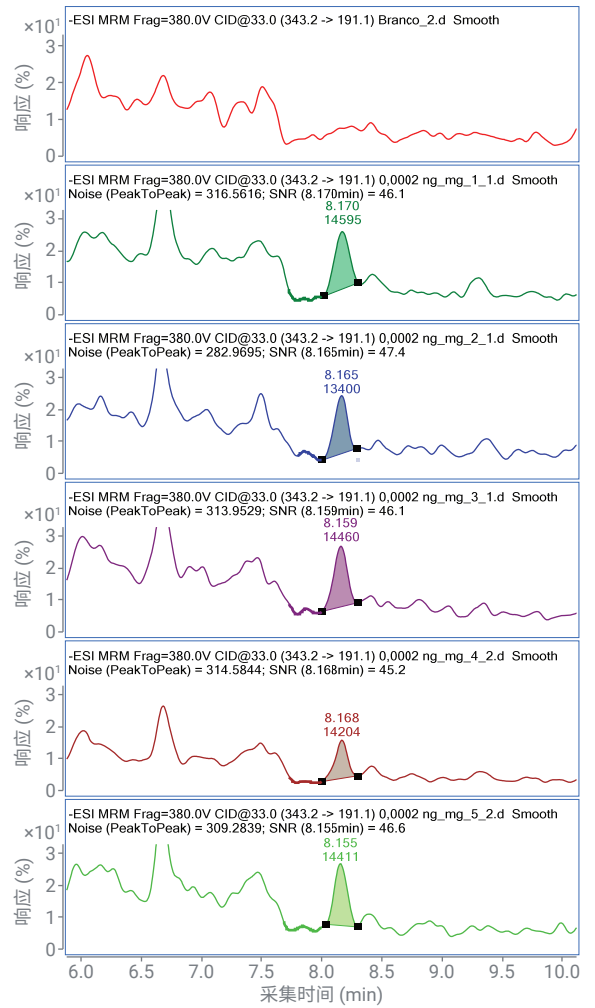


图 6. 在 MRM 343.2 → 245.1 和 343.2 → 191.1 下的毛发空白和五个预加标浓度为 0.2 ng/g 的毛发样品

结论

开发了一种使用 LLE 与 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化的稳定样品前处理方法，并通过 LC/MS/MS 分析毛发中的羧基-THC 对其进行了验证。还使用 Agilent 6495C 和 6470A 三重四极杆液质联用系统运行了毛发基质样品，并对两种系统的灵敏度进行了比较，结果表明前者的灵敏度比后者更佳。该方法经验证具有出色的方法稳定性和灵敏度。已使用开发的方法对数百个样品进行了常规分析。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

用于司法鉴定。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2019
2019 年 12 月 16 日, 中国出版
5994-1635ZHCN
DE.1844212963

参考文献

1. Bjoern, M.; Nadine, R.; Auwarter, A. Finding Cannabinoids in Hair Does Not Prove Cannabis Consumption. *Sci. Rep.* **2015**, 14906
2. SoHT (Society of Hair Testing) official website: <https://www.soht.org/statements/9-nicht-kategorisiert/85-statement-2011>
3. Baumgartner, W. A.; Hill, V. A.; Bland, W. H. Hair Analysis for Drugs of Abuse. *J. Forensic Sci.* **1989**, 34(6), 1433–1453
4. Cirimele, V.; Kintz, P.; Mangin, P. Testing Human Hair for Cannabis. *Forensic Sci. Int.* **1995**, 70(1–3), 175–182
5. Wilkins, D. et al. Quantitative Analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in Human Hair by Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, 19(6), 483–491
6. Moore, C.; Guzaldo, F.; Donahue, T. The Determination of 11-Nor-Delta(9)-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid (THC-COOH) in Hair Using Negative Ion Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Volume Injection. *J. Anal. Toxicol.* **2001**, 25(7), 555–558
7. Baptista, M. J.; et al. Hair Analysis for Delta(9)-THC, Delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-El. Comparison with GC/MS-NCI for Delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci. Int.* **2002**, 128(1-2), 66–78
8. Mieczkowski, T. Assessing the Potential of a “Color Effect” for Hair Analysis of 11-Nor-9-carboxydelta(9)-tetrahydrocannabinol: Analysis of a Large Sample of Hair Specimens. *Life Sci.* **2003**, 74(4), 463–469
9. Uhl, M.; Sachs, H. Cannabinoids in Hair: Strategy to Prove Marijuana/Hashish Consumption. *Forensic Sci. Int.* **2004**, 145(2–3), 143–147
10. Engelhart, D. et al. 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, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-7535CHCN, **2014**
11. Stevens, J.; Zhao, L. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对人血浆中的 THC 和代谢物进行高效定量分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-8636ZHCN, **2017**