Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用UPLC/MS/MS定量分析尿液中的11-去甲-9-羧基Δ9-THC

Rob Lee[1]、Allan Traynor[2]、Jane LeCount[2] and Michelle Wood[1]
[1]沃特世公司MS技术中心（英国曼彻斯特）.[2]Concateno plc（英国伦敦）

应用优势

- 扩展线性范围
- 无需分析前的衍生化处理步骤
- 缩短分析运行时间，提高样品通量

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®

Xevo® TQ MS

ACQUITY® BEH C_{18} 色谱柱

沃特世最大回收样品瓶

关键词

大麻素，UPLC®/MS/MS

简介

大麻是世界上使用最为广泛的违禁药物，长期使用可能导致依赖。大麻素是最常检出的非法药物之一，因此其分析对于法医检测而言极其重要。

Δ-9四氢大麻酚（THC）是大麻植物中主要的精神作用成分[1]。

THC可产生一系列代谢物，其中最重要的尿液检测药物是11-去甲-9-羧基-Δ9-四氢大麻酚（THC-COOH），它是以游离酸或酯联β-葡糖苷酸的形式通过尿液排出的主要代谢物[2]。分析之前，通常要在碱性条件下将葡糖苷酸水解为游离酸。

由于检测窗口期较长，THC-COOH可以在尿液中进行监测，并且可作为之前使用过大麻的标记。

此前发表的一些文章介绍了在固相萃取（SPE）和预柱衍生化后使用GC/MS测定尿液中的大麻素[3,4]。本应用报告的是一种基于液液萃取（LLE）和UPLC/MS/MS的大麻素测定方法。该方法已通过验证，并使用真实样品进行了性能评估。所得数据也与GC/MS方法取得的结果进行了对比。

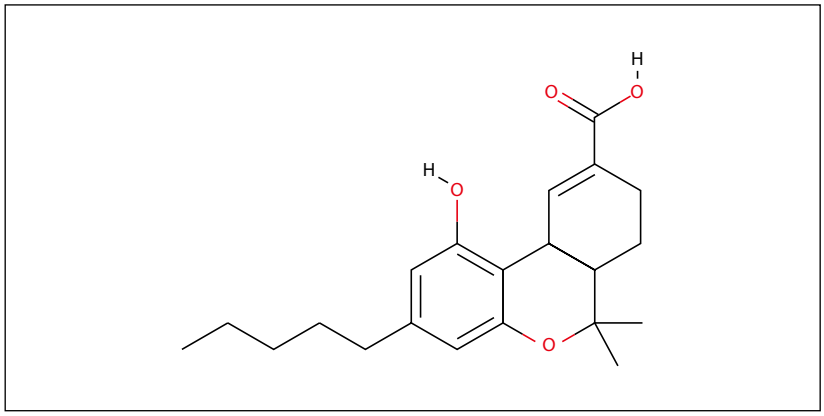

图1. 11-去甲-9-羧基Δ9-四氢大麻酚（THC-COOH）的结构。

实验

ACQUITY UPLC条件

色谱柱:	ACQUITY BEH C_{18}, 1.0 × 50 mm
柱温:	55 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	10 µL (PLNO)
强清洗液:	甲醇/乙腈 (1/1 v/v)
弱清洗液:	50%甲醇
流速:	200 µL/min
流动相A:	5 mM醋酸铵+0.05%甲酸
流动相B:	甲醇
梯度:	线性，流动相B在2 min内从50%增加至60%，在3 min时增加至80%，并在4 min时增加至95%。在95%保持5 min，然后在5.5 min时降低至50%。

MS条件

MS系统:	Xevo TQ MS
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	3.0 V
脱溶剂气温度:	550 °C
脱溶剂气:	1000 L/h
采集模式:	多反应监测(MRM)

材料

THC-COOH(1 mg/mL)及其内标(ISTD)的氘代(d-3)类似物(0.1 mg/mL)均购自 LGC Standards(英国特丁顿)。用甲醇将 ISTD 稀释至 1.25 µg/mL。

用于方法开发的尿液样本来自沃特世公司的捐赠者，使用 0.5 M 氢氧化钾溶液将样本的 pH 值调整至 7.0。

103 个含有预分析 THC-COOH 的匿名样本来自 Concateno(英国伦敦)。

样品制备

葡糖苷酸水解：在玻璃样品瓶中，向 500 µL 样品或校准品加入 10 µL (12.5 ng) ISTD 和 15 µL 10 M 氢氧化钠，然后涡旋混匀，并在 70 °C 下加热 30 分钟。待样品冷却后，向其中加入 85 µL 冰醋酸，然后涡旋混匀。

液液萃取 (LLE)：向水解后的样品中加入 3 倍体积的己烷 / 乙酸乙酯 (9/1 v/v)，然后涡旋混匀 30 秒。离心分离各层，然后将上清液移至洁净试管中。重复提取步骤，合并提取物。在 40 °C 下，用无氧氮气流干燥合并后的提取物，再用70%甲醇进行复溶，然后移至沃特世最大回收样品瓶。取 10 µL进行 UPLC/MS/MS 分析。

表1. MRM通道和条件。

MRM通道	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
THC-COOH (ESI+)		
345.2 > 193.2	32	30
345.2 > 299.1	32	20
348.2 > 196.2 (d3-ISTD)	32	30

数据管理

MassLynx 4.1版 SCN714结合 TargetLynx™ 应用软件。

结果与讨论

方法验证

THC-COOH和ISTD的MRM通道和最佳MS条件如表1所示。THC-COOH通过两个通道(定量离子和定性离子)进行监测。对于THC-COOH，两个通道的面积比应当在预计比率的20%误差范围内，该比率基于整个校准品范围内的比率平均值。ISTD通过单个通道进行监测。

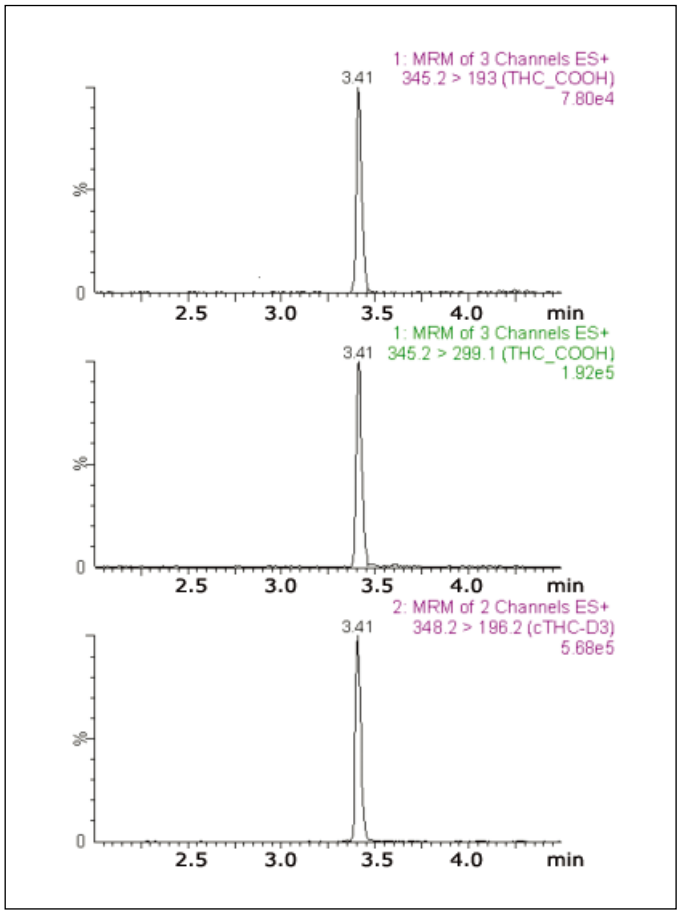

图2. 来自5 ng/mL加标尿液和25 ng/mL ISTD的THC-COOH定量离子（上）、定性离子（中）和ISTD离子（下）图谱。

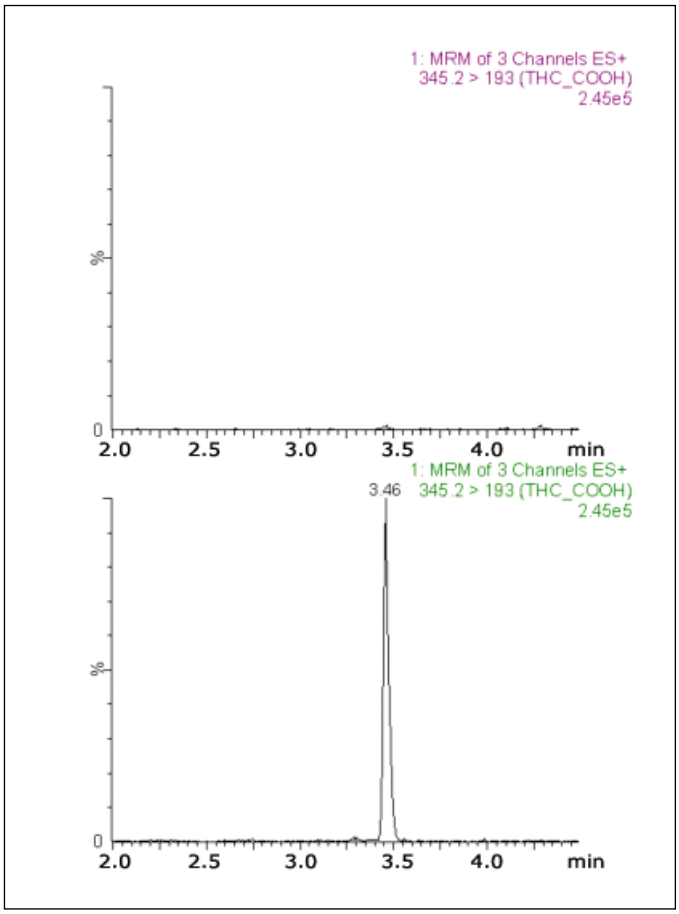

图3. 16 ng/mL THC-COOH的阳性结果。上方图谱为空白尿液校准品，下方图谱为真实样品，两条迹线均只显示定量离子。

图2显示了THC-COOH加标尿液的定量和定性离子图谱，包括ISTD图谱。

为了对THC-COOH的响应进行线性研究，平行制备了两组浓度分别为0、1、5、10、25、50、100、250和500 ng/mL的尿液校准品，并且如上所述进行水解和提取，然后通过UPLC/MS/MS分析。

使用TargetLynx应用软件处理数据，然后通过1/x加权绘制校准曲线。日间确定系数(五日评估值)大于0.995。

检测限(LOD)定义为产生大于10:1信噪比(对于定量离子和定性离子)时的尿液提取物浓度，并确定为1 ng/mL。

对THC-COOH和ISTD在以下浓度的回收率(源自3个不同空白尿液样品)和基质效应(源自6个不同空白尿液样品)进行分析：5、50、500 ng/mL(ISTD为25 ng/mL)。回收率通过比较提取前后的加标尿液确定。

通过比较提取后加标尿液的响应与流动相的标准响应确定基质效应。THC-COOH的结果如表2所示，ISTD的回收率和基质效应与对应的THC-COOH相符。

表2. THC-COOH加标尿液在低、中、高浓度下的平均回收率% (n=3)和基质效应(n=6)。

回收率(%)				基质效应(%)			
5 ng/mL	50 ng/mL	500 ng/mL	ISTD (25 ng/mL)	5 ng/mL	50 ng/mL	500 ng/mL	ISTD (25 ng/mL)
61	66	69	61	-22	-20	-18	-19

通过分析三个质量控制(QC)浓度(7.5、75和375 ng/mL)评估日内精度和准确度。对五个不同日期的QC样品平行分析四次以评估日间精度。结果表明，日内和日间精度，以及日间准确度均在预期值的10%误差范围内，如表3所示。

表3. THC-COOH加标尿液在三个QC水平下的日间准确度和精度(n=20)，以及日内精度(n=4)。

QC浓度(ng/mL)	日间准确度(%)	日内精度CV(%)	日间精度CV(%)
7.5	101.1	3.2	5.0
75	101.9	2.4	6.3
375	97.4	3.7	4.1

为评估提取样品稳定性，对10 ng/mL加标尿液进行多次提取，合并复溶提取物，然后将样品在ACQUITY自动进样器中于10 ℃下存储24小时。每60分钟进样一次。在研究过程中，THC-COOH或ISTD均未观察到明显的峰面积改变；THC-COOH和ISTD的RSD%均小于2%。

真实样品分析

全部103个尿液样品经LLE方法水解处理，然后进行UPLC/MS/MS分析并计算THC-COOH的浓度。

UPLC/MS/MS方法的阳性鉴别标准如下：分析物峰在预期保留时间的0.2 min误差范围内，且定性/定量离子比率在预计比率的20%误差范围内。

图3所示为16 ng/mL的THC-COOH阳性尿液样品与阴性对照的对比。

103个样本中有101个检出THC-COOH，其中99个样品的结果在校准范围内。将所得值与其它实验室的SPE GC/MS分析结果进行对比。两组数据之间的相关性（$r^2 > 0.945$）如图4所示。

使用ACQUITY UPLC®代替GC可以免除衍生化处理步骤；此外，GC方法的运行时间比本文所述UPLC/MS/MS方法长14分钟，后者的运行时间只需7分钟。样品制备时间和分析运行时间的缩短可提高样品通量。

本研究的进一步计划是扩展本方法的应用，包括如全血等其它基质中THC和其它代谢物的测定。

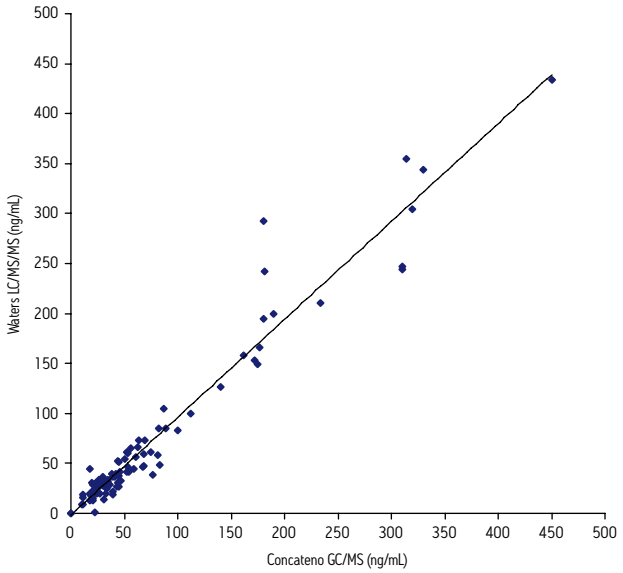

图4.使用UPLC/MS/MS和GC/MS分析尿液中THC-COOH的对比。

结论

大麻素是一种需进行法医药物检测监控的药品。因此，需要一种准确、可靠且稳定的方法来对生物样品中的这类化合物进行定量分析。

Xevo TQ MS可满足特定基质中THC-COOH检测的灵敏度要求，并且不必进行提取后的富集过程。Xevo TQ MS还具有更宽的线性范围，无需稀释即可测定THC-COOH浓度较高的样品。不同于GC/MS方法，使用UPLC/MS/MS进行THC-COOH分析时，无论使用何种样品制备方法，提取后都无需再进行衍生化处理。

ACQUITY UPLC方法的分离过程只需7分钟，可实现较高的样品通量，运行时间明显少于目前常用于THC-COOH分析的GC方法。

本研究对103个人体尿液样本进行了THC-COOH分析，UPLC/MS/MS与GC/MS方法之间表现出极佳的相关性。

将本方法应用在实验室之前，用户有必要对方法进行一次完整的验证。

致谢

感谢Concateno plc（英国伦敦）提供匿名真实尿液样本。

参考文献

1. Dewey WL. Pharmacol. Rev. 1986; 38: 151.
2. Pallente S *et al.* Drug Metabolism and Disposition, vol.6. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, USA. 1978:p.389.
3. Kemp PM *et al.* J. Anal. Toxicol. 1995; 19:285-291.
4. Foltz RL *et al.* Biomed. Mass Spectrom. 1983; 10: 316-323.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、XEVO和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。TargetLynx是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2012年 沃特世公司。印制于中国。 2012年3月 720004280ZH IH-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com