MicroSep 无锡微色谱生物科技有限公司 WuXi MicroSep Biological Science Co.,Ltd

利用全自动分散固相萃取预处理和LC-MS/MS检测全血中Δ⁹-四氢大麻酚及其两种主要代谢物

HAMILTON

BLOOD THC

APPLICATION NOTE

大麻是美国广泛的非法滥用药物。2013年全美使用毒品和健康状况调查的结果显示，2007年至2012年间，大麻使用率从5.8%上升到7.3%。大麻使用的增多，在临床、法医，特别是酒后驾驶案件中尤为普遍。2007年，美国国家公路交通安全管理局（NHTSA）报告称，8.6%的司机夜间大麻素检测呈阳性，这一比例几乎是血液中酒精含量（≥0.8 g/L）的四倍。近期，与未发生车祸相比，使用大麻使车祸风险增加2-6倍，具体取决于剂量。

Δ⁹-四氢大麻酚 （THC）是大麻中的主要精神药物成分。使用后，THC被迅速吸收至血液中。THC主要有2种代谢物，活性代谢物11-羟基-Δ⁹ -四氢大麻酚（11-OH-THC）和非活性代谢物11-去甲-9-羧基-Δ⁹ -四氢大麻酚（THC-COOH）。开车时使用THC，会影响精神状态，改变对时间和距离的感知，甚至产生幻觉。THC在使用后20-30 分钟效力达到峰值，此时血液中浓度最高，然后浓度持续下降，并在 4小时后达到基线水平。

在确定药物或酒精影响时，通常选择血液作为基质。科罗拉多州和华盛顿州已将娱乐性大麻合法化，并采用了药物影响下驾驶（DUID）自身的THC血液浓度阈值为5 ng/mL 。由于不是现场采血，可能要在事发后几个小时才进行。因此，定量检测血液中低水平（< 5 ng/mL）的THC及其代谢物，对于确定THC使用时间和潜在危害至关重要。

工作流程

取100 µL样品加入2 mL离心管中，加入10 µL内标(溶于甲醇)，涡漩混匀。加入300 µL乙腈，13300 rpm离心 10 min 。取 350 µL 上清转移至 2.2 mL 孔板，置于Hamilton NIMBUS96®移液工作站上进行自动固相萃取

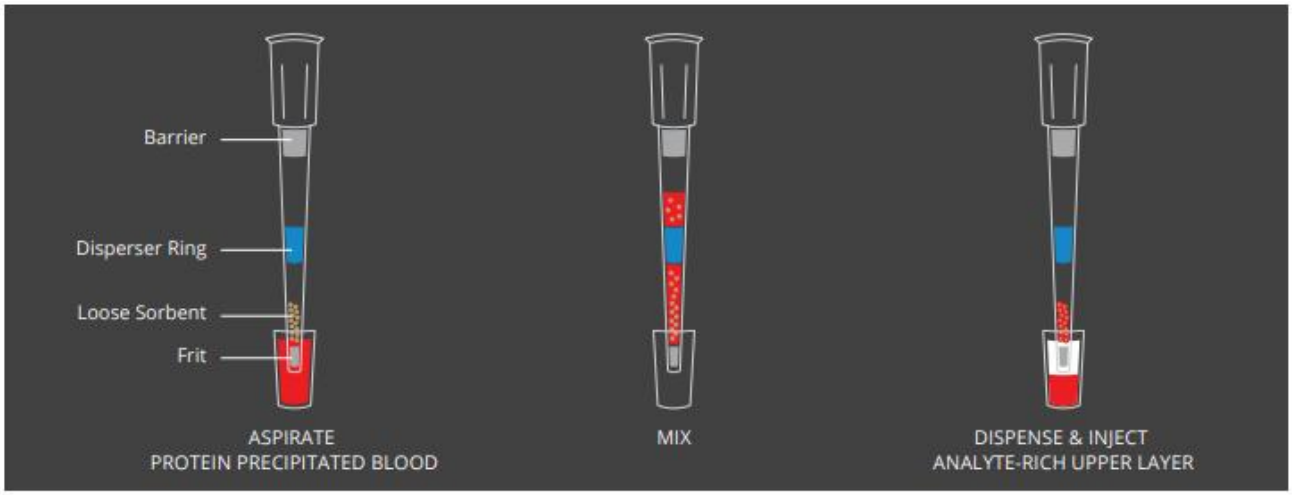


图1. DPX法提取血液中THC示意图。在SPE基础上，使用盐溶液辅助液-液萃取。最终目标物溶于上层乙腈中，用于进一步分析。

1	*血样+ I.S. + ACN* *涡漩&离心*	
2	*转移上清至孔板*	
3	*布置Hamilton NIMBUS96® 台面*	
4	*点击开始*	
	A	*向样品中添加0.1M FA*
	B	*吸打WAX-S Tips 4x*
	C	*转移上清*
5	*LC-MS进样分析*	

图2. 样品准备流程。

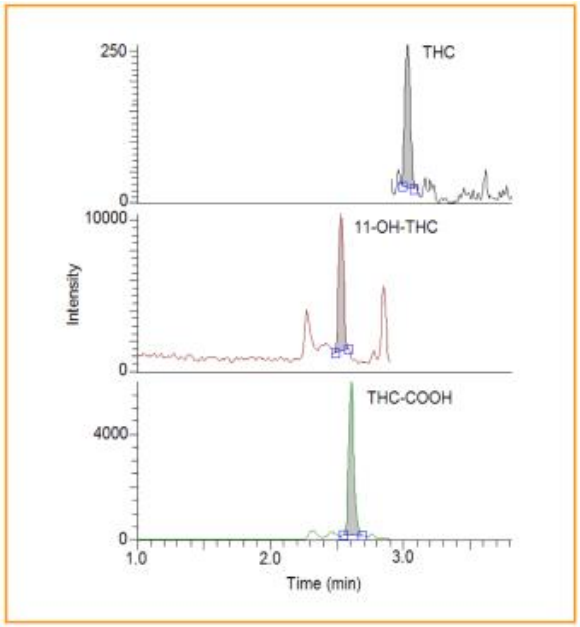


图3. 10号患者样本：THC浓度为4.8 ng/mL, 11-OH-THC浓度为3.5 ng/mL, THC- COOH浓度为27 ng/mL。

（为提高效率，请参阅DPX Tip-On-Tip技术说明）。NIMBUS®台面放置有DPX WAX- S tips，300 µL CO-RE tips，0.1 M 甲酸储液槽和一个空白孔板。首先，NIMBUS®拾取CO-RE tips向含有样品上清的孔板中添加50 µL 0.1 M甲酸。再拾取DPX WAX- S tips吸打样品溶液四次，目的是提取基质并将乙腈和水相分开。最后CO-RE tips将100 µL上清液（乙腈层）转移至空白孔板中，供LC-MS/MS分析。

结果和讨论

经线性回归分析，THC、11-OH-THC和THC-COOH的相关系数（R^2）分别为0.9984、0.9980和0.9966。使用平均斜率（Avg_m）和y截距（S_y）标准差定义每种化合物的检测限（LODs）和定量限（LOQs）（THC为0.66 ng/mL, 11-OH-THC为0.75 ng/mL, THC-COOH为1.8 ng/mL）。结果如表1所示，THC、THC-COOH和11-OH-THC的LOQ均远低于DUID规定的1, 5, and 1 ng/mL。

表2为准确度、批内精密度和批间精密度结果。结果显示，该方法准确度高，当11-OH-THC为25 ng/mL时，偏差最小为0.2%。当THC为2 ng/mL时，偏差最大为4.7%。重复实验进一步确定了批内和批间精密度。当THC为2 ng/mL时，平均批内最大精密度为6.8%，平均批间最大精密度为7.5%。

低浓度的分析物最易受到基质效应的影响。THC在5 ng/mL时，离子抑制率为31%，而20 ng/mL时仅为12%。11-OH-THC在1 ng/mL时离子抑制率为6%，而2 ng/mL时为2%。THC-COOH的基质效应不明显，10 ng/mL时离子抑制率为3%，40 ng/mL时表现为3%离子增强。DPX提取法在两个浓度下对所有化合物的提取率均>93%。蛋白质沉淀过程中的分析物损失也随浓度而变化。在25 ng/mL时，所有化合物约损失30%，在2 ng/mL时，THC、11-OH-THC和THC-COOH分别损失15%、19%和8%。

APPLICATION NOTE

表1. y-截距标准差（S_y），平均斜率（Avg_m, N=5），检测限（LOD，ng/mL），定量限（LOQ, ng/mL），相关系数（R^2, N=5）结果。

	S_y	Avg_m	LOD	LOQ	Avg R^2
THC	0.001	0.014	0.22	0.67	0.9984
11-OH-THC	0.006	0.074	0.25	0.75	0.9980
THC-COOH	0.003	0.016	0.62	1.8	0.9966

表2.. 准确度、批内精密和批间精密度根据法医毒理学科学工作组（SWGTOX）指南计算。

	准确度（%）		
	2 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL
THC	104.7	99.3	99.8
11-OH-THC	98.7	97.2	100.2
THC-COOH	96.4	99.3	99.6
	批内精密度（%）		
	2 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL
THC	6.8	4.6	2.8
11-OH-THC	5	3.5	1.8
THC-COOH	6.4	4.5	3
	批间精密度（%）		
	2 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL
THC	7.5	5.6	2.9
11-OH-THC	6.6	6	3.5
THC-COOH	7	4.4	3.1

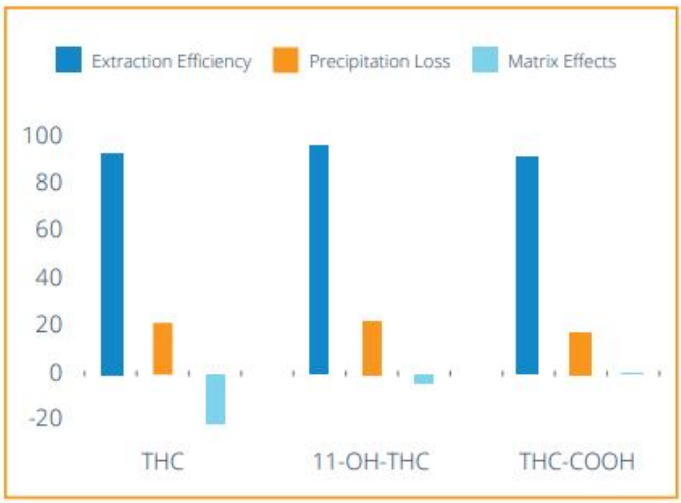


图4. THC，11-OH-THC 和THC-COOH 的平均提取率，沉淀损失率和基质效应(%)。

结论

本研究提供了一种较少样本量即可灵敏检测全血中THC，11-OH-THC和THC-COOH含量的LC-MS/MS方法。该方法简化了全血中THC及其代谢物分析前的样品制备过程，利用自动分散固相微萃取技术，无需后续稀释或溶剂蒸发。提取过程快速，基质影响较小（~ 30%或更少），分析物回收率提高（>93%）。LODs和LOQs分别低于0.75 ng/mL和2 ng/mL。以上结果显示，灵敏度和RSD值（<8%）均满足实验室临界值。所有校准曲线均在两个数量级（0.5-50 ng/mL）内呈线性（R^2 >0.99）。该方法已得到国家药物滥用研究所（NIDA）的广泛应用，包括其他大麻素代谢物的研究。

参考文献

1. Andersson, M. (2016) Simultaneous quantification of 11 cannabinoids and metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry using WAX-S tips. Analytical and Bioanalytical Chemistry 408(23): 6461-6471.
2. Scheidweiler, K. (2016) Quantification of cannabinoids and their free and glucuronide metabolites in whole blood by disposable pipette extraction and liquid chromatographytandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1453(1): 34-42.