

Application Note

Quy trình phân tích ma túy trong tóc đáp ứng khuyến nghị của SoHT

Robert Lee, Massimo Gottardi, Andrea Gardumi, Simone Donzelli, Michelle Wood

Waters Corporation, Comedical



For forensic toxicology use only.

This is an Application Brief and does not contain a detailed Experimental section.

Tóm tắt

Việc sử dụng mẫu tóc để phân tích trong các phòng thí nghiệm hình sự đang trở nên phổ biến trong thập kỷ vừa qua, và được khuyến nghị bởi các tổ chức như Hiệp hội Phân tích Mẫu tóc (SoHT) và Hiệp hội Phân tích Ma túy châu Âu (EWDTS).^{1,2} Một quy trình nhanh chóng và có độ nhạy cao, sử dụng UPLC-MS/MS đã được phát triển, cho phép các nhà phân tích xác định các loại ma túy đáp ứng các quy định. Quy trình cho phép xác định nhiều loại ma túy, ví dụ như opiate, amphetamine, cocaine, ketamine, buprenorphine, benzodiazepine và các chất chuyển hóa, cũng như tetrahydrocannabinol (THC) và dẫn xuất carboxy-THC (cTHC) chỉ từ một mẫu tóc. Sau khi được ủ với các dung dịch đệm sẵn có, các chất phân tích được tách khỏi nền mẫu tóc sử dụng chiết pha rắn SPE với cột OASIS PRiME MCX 96 giống. Hai phương pháp sử dụng hệ ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro LC-MS/MS được phát triển, một phương pháp để phân tích 29 loại ma túy thông thường và một phương pháp để xác định THC, cannabidiol và cannabinol.³ Hai phương pháp này đều cho ngưỡng phát hiện dưới khuyến nghị của hai tổ chức, với thời gian phân tích dưới 10 phút mỗi mẫu, cho phép phân tích số lượng lớn mẫu trong thời gian ngắn.

Lợi ích

- Xử lý mẫu đơn giản với hệ SPE OASIS PRiME MCX 30 mg 96 giống.
- Tách được nhiều loại ma túy trên cột ACQUITY UPLC BEH C₁₈ sử dụng hệ ACQUITY UPLC I-Class.
- Độ nhạy tốt với thiết bị khối phổ Xevo TQ-S micro cho phép phân tích ở nồng độ thấp.

Giới thiệu

Ở phần trước, chúng tôi đã nói về ưu điểm của mẫu tóc trong các phép phân tích hình sự và thể hiện phương pháp có độ nhạy cao với carboxy-THC, dẫn xuất của THC có thể sử dụng để xác định hoạt tính của cannabis.³ Quy trình sử dụng 20 mg mẫu tóc và đem chiết lấy ma túy từ nền mẫu tóc sử dụng thuốc thử M3, sau đó đem làm sạch với OASIS PRiME HLB và phân tích bằng LC-MS/MS sử dụng hệ ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro.

Trong phân tích thường quy, cTHC chỉ là một trong rất nhiều hợp chất cần phải phân tích và được liệt kê trong các quy định của SoHT hay EWDTS (bảng 1). Có thể kể tới như opiate, amphetamine, cocaine, ketamine, buprenorphine, benzodiazepine và các chất chuyển hóa cũng như tetrahydrocannabinol (THC). Ngưỡng tối thiểu các loại ma túy là khác nhau, và với một số loại ở mức rất thấp. Vì vậy, nhiều phòng thí nghiệm đã sử dụng nhiều quy trình khác nhau để đảm bảo rà soát đủ các loại ma túy. Trong thực tế, điều này có thể phát sinh việc sử dụng nhiều quy trình chiết, làm sạch mẫu, thậm chí nhiều phương pháp phân tích trên cùng một mẫu, có thể dẫn tới việc cần dùng lượng mẫu lớn, gần như không khả thi vì lượng mẫu có hạn. Vì vậy, cần một phương pháp phân tích đơn giản, nhanh chóng, chính xác để xác định đồng thời các loại ma túy trong tóc. Quy trình cũng phải phù hợp các khuyến nghị của SoHT và EWDTS.

Group	Analytes	SoHT cut-off (ng/mg)	EWDTS cut-off (ng/mg)
Amphetamines	Amphetamine	0.2	0.2
	Methamphetamine	0.2	0.2
	MDA	0.2	0.2
	MDMA	0.2	0.2
	MDEA		0.2
Cannabinoids	THC	0.05	0.05
	Carboxy-THC	0.0002	0.0002
Cocaine	Cocaine	0.5	0.5
	Ecgonine methyl ester	0.05	
	Benzoyllecgonine	0.05	0.05
	Norcocaine	0.05	
	Cocaethylene	0.05	0.05
Opiates	Morphine	0.2	0.2
	Codeine	0.2	0.2
	6-MAM	0.2	0.2
Methadone	Methadone	0.2	0.2
	EDDP	0.05	0.05
Buprenorphine	Buprenorphine	0.01	0.01
	Norbuprenorphine	0.01	0.01
Ketamine	Ketamine		0.5
	Norketamine		0.1
Benzodiazepines/Z-drugs			0.05
Alcohol	Ethyl-glucuronide		0.03

Table 1. SoHT and EWDTS recommended confirmatory cut-off concentrations for drugs in hair.

Kết quả và thảo luận

Mẫu tóc được thu thập của các tình nguyện viên, sau đó được khử tạp với DCM, MeOH và Et₂O. Sau đó đem cắt nhỏ từ 1 đến 2 mm. Thuốc thử M3 được cung cấp bởi Comedical, Trento, Italy, <http://www.comedical.biz/> <<http://www.comedical.biz/>> .

Các mẫu tóc (10 - 20 mg) được cân và chuyển vào ống li tâm thủy tinh và đậy kín và thêm các chuẩn ma túy từ 0,5 đến 200 lần ngưỡng tối thiểu. Hỗn hợp nội chuẩn được thêm ở mức 1 ng/mg (ISTD) với thuốc thử M3. Mẫu được giữ ở 100 °C trong 60 phút trong bể điều nhiệt, sau khi nguội, 100 µL mẫu được pha loãng với acid phosphoric trước khi đưa lên cột OASIS PRiME MCX 30 mg 96 giếng. Mẫu được rửa với acid formic 2% và methanol 50%. Chất phân tích được rửa giải với ACN;MeOH (9:1, v:v) chứa ammonia.

25 μ L đầu sẽ được đem đi phân tích các loại ma túy cơ bản và 25- μ L sau được dùng để phân tích THC.

Hệ ACQUITY UPLC I-Class System FTN (flow-through needle) sử dụng kim 30- μ L needle, cho phép phân tích 15 μ L mẫu. Cả 2 phép phân tích sử dụng pha động là gradient của ammonium formate/acetonitrile trên cột ACQUITY UPLC BEH C₁₈ Column với hai kiểu tiêm khác nhau nhưng chung pha động. Hai quá trình MRM được kiểm soát cho từng chất cùng với quá trình MRM cho từng nội chuẩn. Tổng thời gian cho cả 2 phép phân tích là 10 phút.

Sắc ký đồ cho 10 mg mẫu được thêm chuẩn các loại ma túy cơ bản ở mức khuyến nghị của SoHT và EWDTs thể hiện ở hình 1 và các bước MRM cho 29 chất phân tích. Trong các chất này, ngưỡng của buprenorphine và norbuprenorphine khá khó khăn. Hình 2 là đường chuẩn và đồ thị thể hiện sai khác với lý thuyết khi thêm chuẩn vào 20 mg tóc từ 0,005 đến 2 ng/mg.

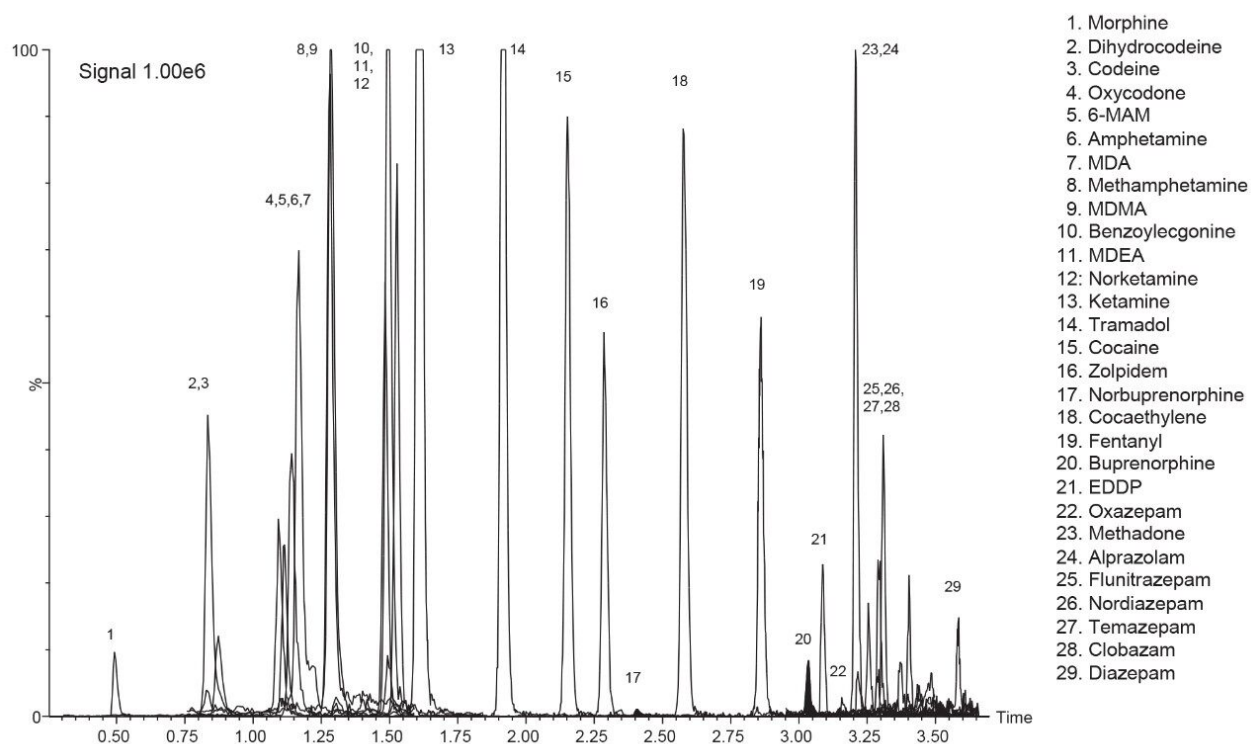


Figure 1. Chromatogram showing the quantifier MRM transitions for all analytes (except cannabinoids) spiked into 10 mg hair at SoHT/EWDTS confirmation cut-off concentrations. Norbuprenorphine (No. 17, 2.41 min) and buprenorphine (No. 20, 3.04 min) are highlighted.

Compound name: Buprenorphine
 Correlation coefficient: $r = 0.998980$, $r^2 = 0.997961$
 Calibration curve: $0.988286 \cdot x + 0.00125395$
 Response type: Internal Std (Ref 46), Area * (IS Conc./IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None

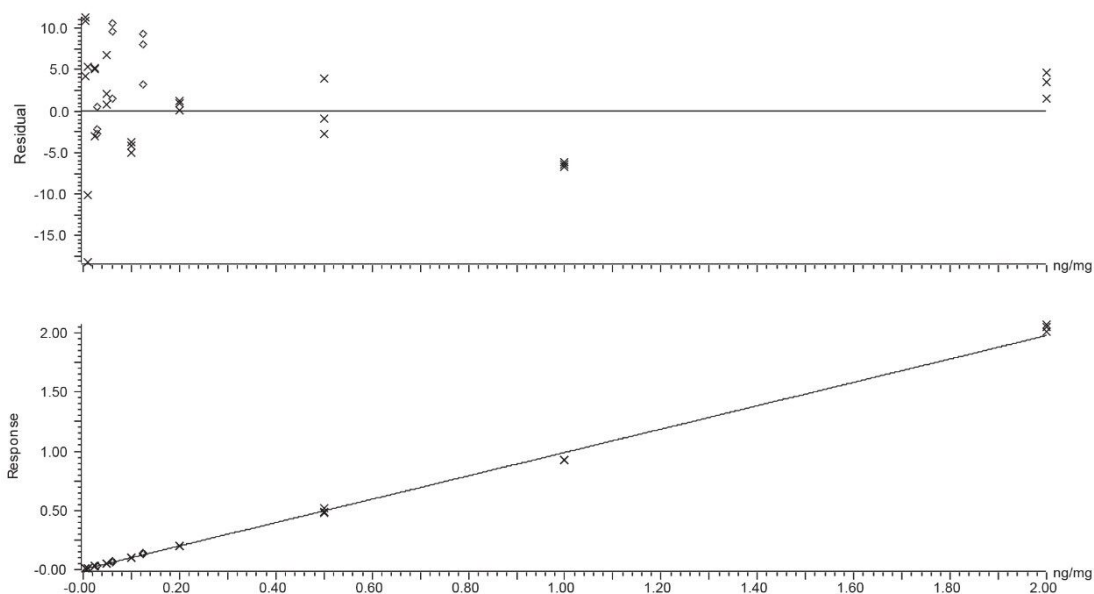


Figure 2. Calibration curve for buprenorphine spiked into 20 mg hair. Calibration range is from 0.5x cut-off to 200x. Cut-off values are those recommended for confirmation by SoHT and EWDTS.

Hình 3 thể hiện quá trình MRM cho THC, cannabidiol và cannabinol được thêm vào mẫu tóc ở mức 0,05 ng/mg. Để xác nhận sự có mặt của THC trong mẫu, phần hỗn hợp còn lại được dùng để phát hiện cTHC bằng phương pháp đã công bố trước kia. Chất đánh dấu sinh học ethyl glucuronide được đo từ hỗn hợp ủ với M3 theo phương pháp của Joya và các công sự.⁴ Quy trình đầy đủ thể hiện ở hình 4.

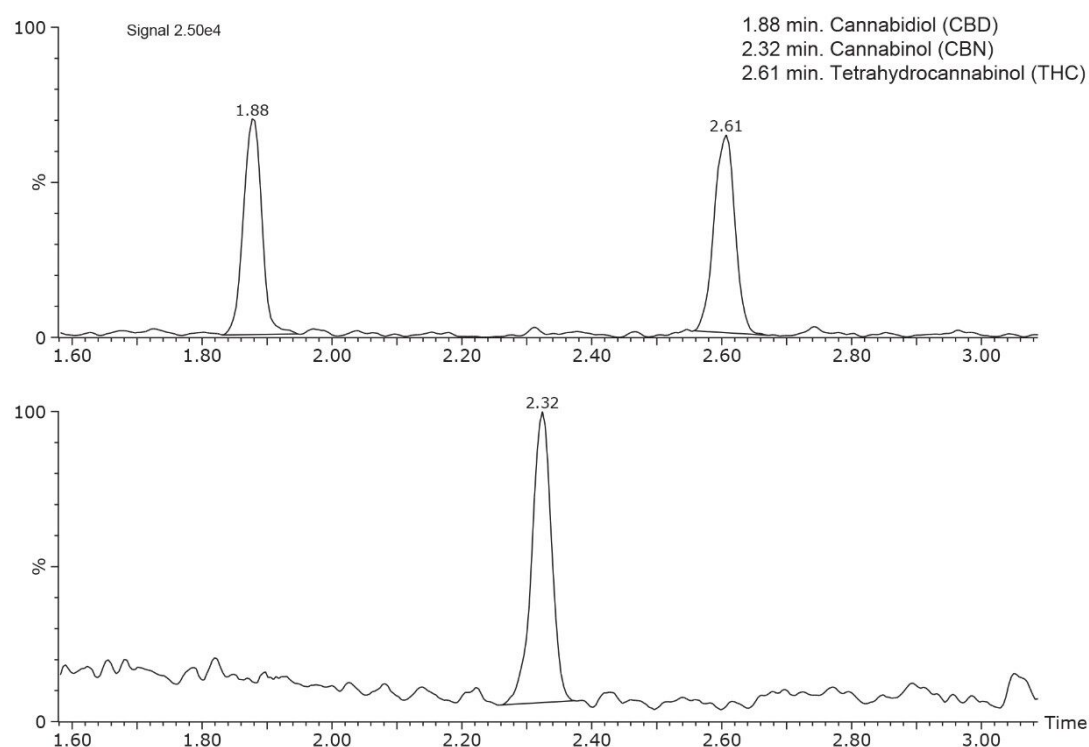


Figure 3. Chromatogram showing the quantifier MRM transition for THC spiked into 10 mg hair at SoHT/EWDTS confirmation cut-off concentration. Also shown are the quantifier MRM transitions for cannabidiol and cannabinol spiked at the same concentration (0.05 ng/mg).

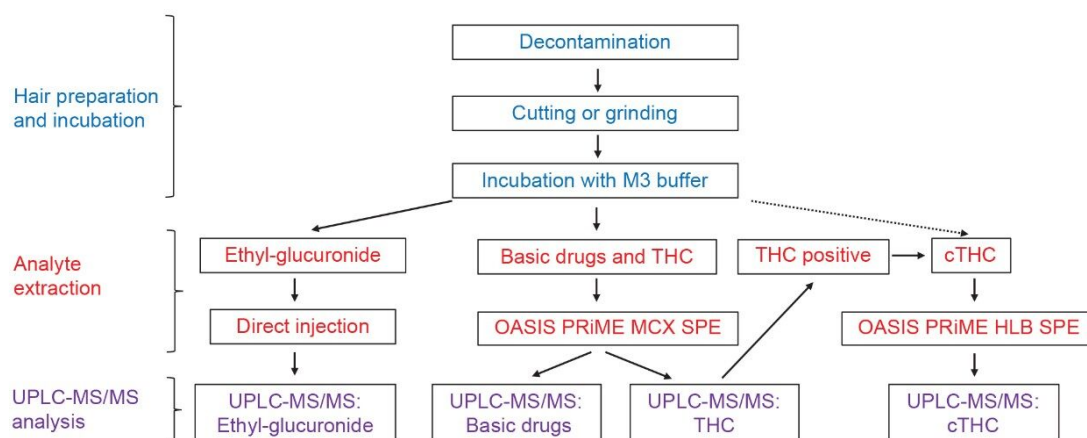


Figure 4. A potential complete workflow schematic for the analysis of drugs in hair.

Kết luận

Nhu cầu ngày càng cao sử dụng mẫu tóc để phát hiện ma túy đã đặt ra yêu cầu cần phương pháp nhanh chóng và chính xác ở mức nồng độ rất thấp. Công bố này đã thể hiện quy trình phân tích ma túy ở ngưỡng dưới ngưỡng tối thiểu của SOHT và EWDTs chỉ từ một mẫu tóc, sử dụng cột SPE OASIS PRiME MCS 96 giống. Cùng với hệ ACQUITY UPLC I-Class và Xevo TQ-S micro, nay đã có thể phân tích số lượng lớn mẫu ở mức nồng độ rất thấp.

References

1. Cooper, G.A.A.; Kronstrand, R.; Kintz, P. Society of Hair Testing Guidelines for Drug Testing in Hair. *Forensic Science International*, 2012 218: 20–24.
2. European Workplace Drug Testing Society Guidelines. <http://www.ewdts.org> <<http://www.ewdts.org/>> (accessed July 6, 2020).
3. Gottardi, M. *et al.* Using UPLC-MS/MS for the Determination of carboxy-THC (cTHC) in Hair. Waters Tech Brief, 720006363EN <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2018/uplc-ms-ms-determination-carboxy-thc-cthc-hair-forensic-toxicology.html>> , 2018.
4. Joya, X. *et al.* Fetal Exposure to Ethanol: Relationship Between Ethyl Glucuronide in Maternal Hair During Pregnancy and Ethyl Glucuronide in Neonatal Meconium. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2015 54(3): 427–435.

Featured Products

ACQUITY UPLC I-Class PLUS System <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro Triple Quadrupole Mass Spectrometry <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS Software <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720006989, Revised October 2020

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.