

ANALYSIS OF 11-NOR-9-TETRAHYDROCANNABIOL-9-CARBOXYLIC IN HAIR SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

NGUYEN VIET CHINH^{1,✉}, HOANG KHANH LINH¹, DANG DUC KHANH¹, PHAM NGOC TUAN¹
LE MINH DUYEN²

¹Military Institute of Forensic Medicine

²National Institute of Drug Quality Control

✉Corresponding author: nguyenvietchinh0301@gmail.com

Received October 18th, 2023

Accepted November 22nd, 2023

ABSTRACT: In this study, we developed a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis method for the qualification and quantification of 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic (THC-COOH) in hair samples was reported. The method was used THC-COOH-d₃ as internal standard. The following validation parameters were evaluated: selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision and accuracy. The limit of quantitation for 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic (THC-COOH) was 0,01 ng/mg. The method was applied to analyse 20 positive hair samples with THC-COOH. The concentration of THC-COOH ranged from 0,11 ng/mg to 3,04 ng/mg.

Keywords: 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic, THC-COOH, hair samples, liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

PHÂN TÍCH 11-NOR-9-TETRAHYDROCANNABIOL-9-CARBOXYLIC TRONG MẪU TÓC BẰNG SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ

NGUYỄN VIỆT CHÍNH^{1,✉}, HOÀNG KHÁNH LINH¹, ĐẶNG ĐỨC KHANH¹, PHẠM NGỌC TUẤN¹
LÊ MINH DUYÊN²

¹Viện Pháp y Quân đội

²Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương

✉Tác giả liên hệ: nguyenvietchinh0301@gmail.com

Nhận bài ngày 18 tháng 10 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 22 tháng 11 năm 2023

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển một phương pháp phân tích sử dụng sắc ký lỏng kết nối hai lần khối phổ (LC-MS/MS) để định tính và định lượng 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic (THC-COOH) trong các mẫu tóc đã được báo cáo. Phương pháp đã sử dụng THC-COOH-d₃ làm chất nội chuẩn. Các chỉ tiêu đã thẩm định như: độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ đúng, độ lặp lại. Giới hạn định lượng đối với 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic (THC-COOH) là 0,01 ng/mg. Phương pháp này đã áp dụng để phân tích 20 mẫu tóc dương tính với THC-COOH. Nồng độ THC-COOH dao động từ 0,11 ng/mg đến 3,04 ng/mg.

Từ khóa: 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic, THC-COOH, hair samples, liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

“Cần sa” là tên một loại ma túy được chế biến từ hoa và lá khô của cây cần sa Cannabis Sativa. Trong cây cần sa tự nhiên chứa Tetrahydrocannabinol (THC) là chất có hoạt tính chính. Nhưng khi vào trong cơ thể THC nhanh chóng bị chuyển hóa, trong đó 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic (THC-COOH) là chất chuyển hoá chính có gốc acid tồn tại ở dạng liên kết với acid glucuronic. Các chất chuyển hoá được đào thải qua nước tiểu, mồ hôi... Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy THC, THC-COOH được lưu giữ trong tóc người sử dụng cần sa [3].

Hiện nay, các nghiên cứu chủ yếu tập trung trên mẫu máu, nước tiểu, phủ tạng và các mẫu tạng vật thu giữ như bột, dung dịch... mà chưa tập trung đến phân tích mẫu tóc. Trong khi trên thế giới, sử dụng mẫu tóc để phân tích ma túy đã rất phổ biến.

Kỹ thuật sắc ký lỏng ghép nối với detector khối phổ nối tiếp 2 lần (LC-MS/MS) được xem là kỹ thuật hiện đại, có độ ổn định, chính xác và độ nhạy cao. Quá trình xử lý mẫu trước khi phân tích nhanh và đơn giản, lượng mẫu dùng trong phân tích rất ít.

Vì vậy, việc xây dựng quy trình phân tích nhanh 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic có trong mẫu tóc là cần thiết khi mà Bộ y tế chưa có quy trình giám định [1].

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu có đưa ra quy trình và kết quả phân tích 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic trong 20 mẫu tóc thực tế được gửi giám định.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ phân tích

Hệ thống sắc ký lỏng kết nối detector 2 lần khối phổ (LC-MS/MS 8045) của hãng Shimadzu; cân phân tích Sartorius (độ chính xác 10-4 g); bể rung siêu âm Elmasonic S100; Máy ly tâm Rotina 380, bộ làm khô mẫu bằng khí nitơ; micropipet các thể tích từ 2,0-1000,0 µl; các dụng cụ thủ tinh có độ chính xác và các dụng cụ cần thiết khác trong phòng thí nghiệm.

Thiết bị và dụng cụ được hiệu chuẩn định kỳ theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

2.1.2. Dung môi, hóa chất

Dung môi, hóa chất: Các hóa chất sử dụng trong giám định là tinh khiết dùng cho phân tích sắc ký gồm: acetonitril (ACN); ethylacetat (EA); methanol (MeOH); acid clohydric (HCl); acid formic (HCOOH); nước loại ion.

2.1.3. Chất chuẩn:

Chất chuẩn: THC-COOH, nội chuẩn THC-COOH-d₃ (IS) của hãng Cayman có code lần lượt là 20754, 10009898, nguyên trạng.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là THC-COOH trong mẫu tóc.

Mẫu sử dụng nghiên cứu: mẫu tóc của 06 người không sử dụng ma túy. Mẫu tóc của 20 trường hợp thực tế gửi giám định.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên các tài liệu tham khảo, tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký để lựa chọn điều kiện sắc ký tối ưu. Việc xây dựng quy trình xử lý mẫu còn dựa trên đặc điểm lý hóa của chất phân tích.

2.2.2.1. Quy trình phân tích

* Điều kiện sắc ký

Cột ZOBAX Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm; 3,5 µm) Part No. 959793-902 của hãng Agilent dùng cho sắc ký lỏng khối phổ. Pha động: A: acid formic 0,1 % trong nước deion; B: acid formic 0,1 % trong methanol. Chương trình phân tích rửa giải gradient. Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút. Thể tích tiêm: 3 µl

* Điều kiện khối phổ

Sử dụng detector ghép nối 2 lần khối phổ Triple Quadrupole (MS/MS). Kiểu phân tích thực hiện theo chế độ ion hóa đầu phun điện tử (ESI) bắn phá ion dương. Phân tích dung dịch chuẩn và nội chuẩn ở chế độ full scan để xác định lựa chọn precursor ion. Tiếp theo sẽ tiến hành phân tích theo chế độ production để xác định mảnh con, từ đó lựa chọn mảnh ion để phân tích theo chế độ MRM (Multiple Reaction Monitoring). Tối ưu hóa phương pháp bằng phần mềm Optimazation của thiết bị.

* Phương pháp chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc: dung dịch chuẩn gốc THC-COOH và dung dịch chuẩn nội THC-COOH-d₃(IS) được pha trong methanol đều có nồng độ khoảng 1000 µg/ml.

Dung dịch chuẩn nội làm việc: từ dung dịch chuẩn nội gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn IS làm việc trong methanol có nồng độ khoảng 100 ng/ml và 1000 ng/ml.

Dung dịch chuẩn làm việc: từ dung dịch chuẩn gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc trong methanol có nồng độ khoảng 100 ng/ml và 1000 ng/ml.

*** Phương pháp xử lý mẫu**

Quy trình xử lý mẫu: Cân khoảng 100 mg tóc cho vào cốc thủy tinh, thêm 10ml nước deion, siêu âm trong 5 phút (thực hiện 2 lần) để loại tạp và bụi bẩn. Loại bỏ nước rửa và thổi khô nhẹ mẫu ở nhiệt độ phòng. Mẫu tóc được cắt thành các mảnh nhỏ kích thước khoảng 1mm và cho vào ống fancel 15 ml. Thêm 5 ml dung môi chiết ở 45 °C trong 3 giờ, rung siêu âm liên tục. Dịch chiết được lọc qua màng lọc 0,22 µm. Bay hơi dịch lọc tới chớm khô dưới dòng khí nitơ ở nhiệt độ 40 °C. Cẩn được hoà tan bằng bằng 1000µl dung dịch IS nồng độ 20 ng/ml, mẫu dùng để bơm vào hệ thống LC-MS/MS.

*** Phương pháp tính kết quả**

Xác định nồng độ THC-COOH có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic tương ứng THC-COOH/IS thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện.

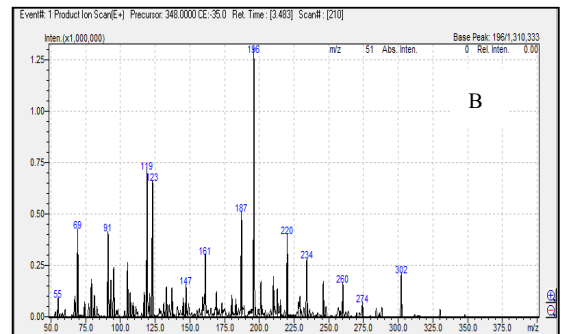
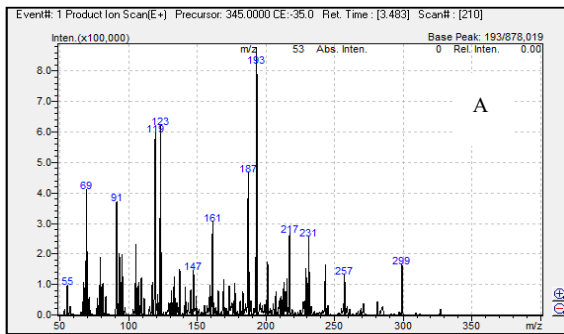
2.2.2.2. Thẩm định quy trình phân tích

Thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ANSI/ASB Standard 036 và USP với các chỉ tiêu như: Độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, độ chọn lọc, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, khoảng tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại [4],[5].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ MS/MS

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn THC-COOH, THC-COOH-d₃ có nồng độ 1000 ng/ml theo chế độ full scan để xác định lựa chọn precursor ion. Tiếp theo sẽ tiến hành phân tích theo chế độ production để xác định mảnh con. Mỗi chất lựa chọn 4 mảnh ion trong đó 1 mảnh tín hiệu cao để định lượng và 3 mảnh để định tính. Kết quả khảo sát được trình bày dưới Hình 1.



Hình 1. Mảnh con được lựa chọn phân tích của THC-COOH (A) và THC-COOH-d₃ (B)

Tiến hành tự động tối ưu hóa để tìm điều kiện MS/MS bằng phần mềm Optimazation, kết quả điều kiện khối phổ được trình bày dưới Bảng 1. Điều kiện khối phổ như sau: Nhiệt độ interface, DL, desolvate hóa lần lượt là 300 °C, 250 °C, 526 °C.

Bảng 1: Điều kiện phân tích trên khối phổ

STT	Chất	Thời gian lưu (Phút)	Precursor m/z	Product m/z	Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	Q3 Pre Bias (V)
1	THC-COOH	3,555	345	193*	50	-14	-27	-20
			345	299	50	-14	-37	-11
			345	187	50	-11	-28	-19
			345	123	50	-14	-35	-25
2	THC-COOH-d ₃	3,556	348	196*	50	-13	-29	-20
			348	302	50	-10	-28	-11
			348	187	50	-14	-36	-22
			348	123	50	-19	-29	-19

(* mảnh dùng để định lượng)

Từ kết quả bảng 1 và các điều kiện khối phổ đã khảo sát được, nhận thấy điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử chất phân tích tại chế độ $[M+H]^+$. Mỗi chất phân tích nghiên cứu lựa chọn 4 mảnh m/z ion con để định tính và định lượng.

3.2. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký lỏng

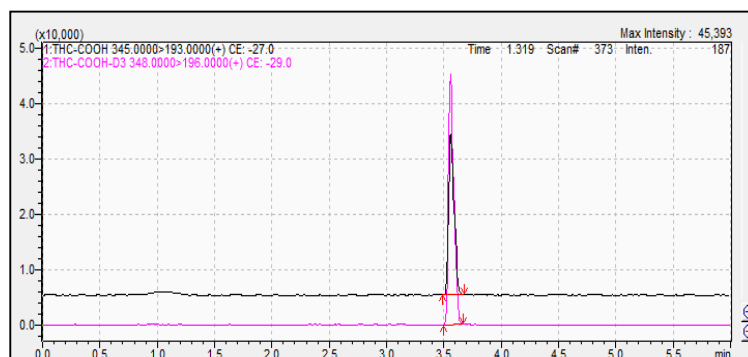
Sau khi lựa chọn được các mảnh ion phân tử mẹ, ion con và tối ưu được điều kiện phân tử. Tiến hành khảo sát chương trình pha động của phương pháp sử dụng các dung dịch chuẩn THC-COOH 100 ng/ml và nội chuẩn THC-COOH-d₃ 100 ng/ml.

Pha động: A: acid formic 0,1 % trong nước deion, B: acid formic 0,1 % trong methanol. Chạy chương trình gradient. Kết quả khảo sát pha động được trình bày dưới Bảng 2. Sắc ký đồ của THC-COOH và THC-COOH-d₃ được trình bày trong Hình 2.

Bảng 2: Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	A (%)	B (%)
0,00 - 2,50	0,25	30	70
2,51 - 5,00	0,50	0	100
5,01 - 6,00	0,25	30	70

Từ kết quả khảo sát chương trình pha động trong Bảng 2, nhận thấy với chương trình gradient trên cho kết quả các pic THC-COOH và THC-COOH-d₃ có thời gian lưu ổn định, các pic tách tốt, cân đối, không có hiện tượng dính pic. Tuy nhiên thời gian lưu của 2 chất phân tích gần sát nhau, nhưng đây không phải là vấn đề lớn khi phân tích trên detector khối phổ do có thể lựa chọn mảnh m/z theo chất nghiên cứu.



Hình 2. Sắc ký đồ THC-COOH và THC-COOH-d₃

3.3. Khảo sát dung môi chiết

Khảo sát 06 dung môi chiết thường sử dụng tại phòng thí nghiệm bao gồm acetonitril, methanol, ethylacetat, acetonitril/0,1 % HCl, methanol/0,1 % HCl, ethylacetat/0,1 % HCl tại 2 mức nồng độ 10 ng và 100 ng. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình tại mục 2.2.2. Kết quả khảo sát dung môi chiết được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Khảo sát dung môi chiết mẫu

Hệ dung môi khảo sát	Trung bình độ thu hồi (n = 6)	
	10 ng	100 ng
Methanol	89,83	91,97
Acetonitril	80,07	83,40
Ethylacetat	63,87	67,82
Methanol/0,1 % HCl	93,62	95,41
Acetonitril/0,1 % HCl	82,58	84,65
Ethylacetat/0,1 % HCl	65,44	68,33

Từ kết quả Bảng 3 cho thấy, dung môi Methanol/0,1 % HCl cho lượng chất thu hồi sau chiết lớn nhất. Do vậy, Methanol/0,1 % HCl được lựa chọn làm dung môi chiết mẫu.

3.4. Thẩm định phương pháp

3.4.1. Độ thích hợp hệ thống LC-MS/MS

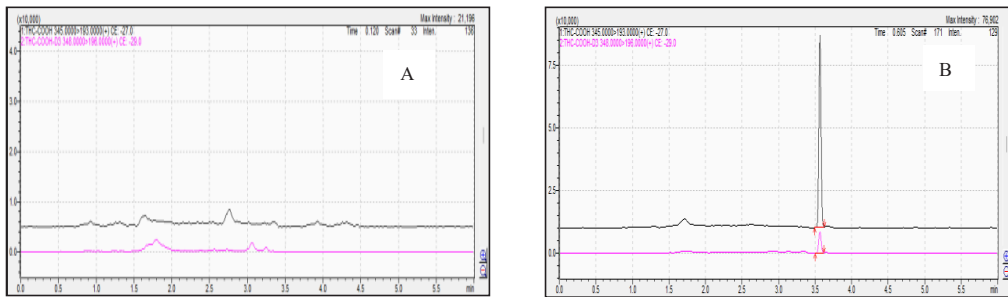
Tiến hành khảo sát độ thích hợp hệ thống ở 03 mức có nồng độ chuẩn THC-COOH là 5 ng/ml, 75ng/ml và 200 ng/ml, nồng độ chất nội chuẩn THC-COOH-d₃ trong cả 03 mức là 20ng/ml. Mỗi nồng độ bơm lặp lại 06 lần. Ghi lại thời gian lưu và diện tích pic của chất phân tích và nội chuẩn. Tỷ lệ diện tích pic trung bình của THC-COOH và THC-COOH-d₃ được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4: Kết quả độ thích hợp hệ thống

Nồng độ thí nghiệm (ng/ml)	Tỷ lệ diện tích pic trung bình của chuẩn/IS	RSD (%)	Tỷ lệ thời gian lưu trung bình của chuẩn/IS	RSD (%)
5,0	0,339	2,38	1,000	0,02
75,0	5,230	2,92	1,000	0,01
200,0	13,269	1,22	1,000	0,02

3.4.2. Độ đặc hiệu

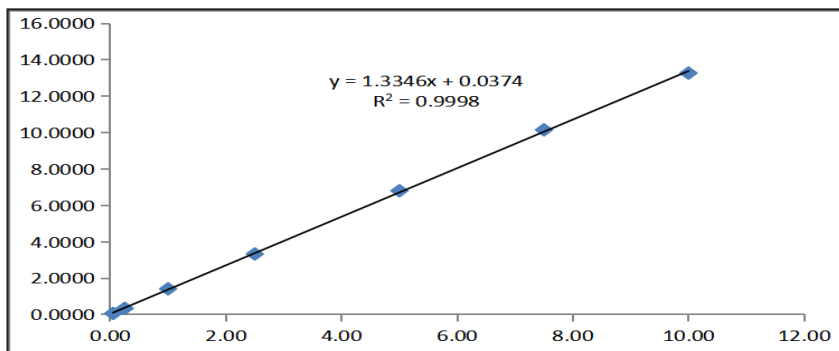
Tiến hành phân tích trên thiết bị với các điều kiện đã xây dựng trên 06 mẫu tóc trắng, 06 mẫu chuẩn và 06 mẫu tóc trắng thêm chuẩn ở nồng độ 25 ng/ml. Kết quả được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu trắng (A), Sắc ký đồ mẫu trắng thêm chuẩn và IS ở nồng độ 20 ng (B)

3.4.3. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Đường chuẩn được xây dựng dựa vào 07 điểm chuẩn. Hàm lượng chất chuẩn THC-COOH được thêm vào mẫu tóc blank tạo thành các mức 1,0 ng; 5,0 ng; 20,0 ng; 50,0 ng; 100,0 ng; 150,0 ng; 200,0 ng. Mỗi mức chuẩn đều có hàm lượng chất nội chuẩn là 20 ng. Tiến hành xử lý mẫu và phân tích theo đúng quy trình, mỗi điểm lặp lại thí nghiệm 06 lần lấy giá trị trung bình. Phương trình hồi quy được xây dựng là $y = 1,3344x + 0,0374$ với $R^2 = 0,9998$. Trong đó: Y là tỷ lệ diện tích pic. X là tỉ lệ lượng chất của THC-COOH/IS. Đường chuẩn được trình bày dưới Hình 4.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn khoảng tuyến tính của THC-COOH

Đường chuẩn xây dựng được giữa tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích so với nội chuẩn và tỷ lệ lượng chất tương ứng có hệ số tương quan $r = 0,9999$ thỏa mãn yêu cầu ($r > 0,995$) theo hướng dẫn của ANSI/ASB Standard 036 và USP [4],[5].

3.4.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

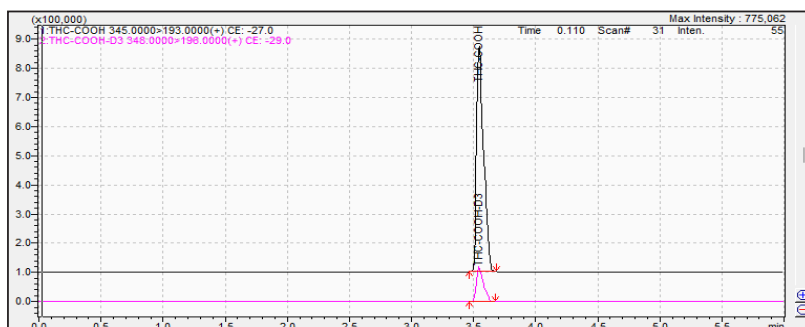
Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn và nội chuẩn có nồng độ 10 ng/ml sau đó đem phân tích theo điều kiện đã chọn. Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định khi tỷ lệ nhiễu đường nền (S/N) tại điểm nồng độ khảo sát khoảng bằng 3. Khi đó, giới hạn định lượng (LOQ) của chất phân tích có nhiễu đường nền khoảng bằng 10. Do đó, phương pháp phân tích có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của THC-COOH lần lượt là 0,004 ng/mg và 0,01 ng/mg tóc.

3.4.5. Độ đúng và độ lặp lại của quy trình phân tích mẫu

Độ đúng và độ lặp lại của quy trình được đánh giá ở 03 mức hàm lượng THC-COOH thêm vào 100 mg mẫu tóc blank là 5 ng, 25 ng và 75 ng, lượng chất nội chuẩn THC-COOH-d₃ trong cả 03 mức là 20 ng. Mỗi mức hàm lượng thêm chuẩn tiến hành thí nghiệm 06 lần lặp lại. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ thu hồi và độ lặp lại của quy trình

STT	Hàm lượng thí nghiệm (ng)	THC-COOH	
		Độ thu hồi (%)	RSD %
1	5,0	93,02	8,57
2	25,0	96,31	5,57
3	75,0	97,71	4,58



Hình 5. Sắc ký đồ phân tích mẫu tóc thực tế dương tính với THC-COOH

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đưa ra quy trình phân tích định tính, định lượng THC-COOH trong mẫu tóc bằng thiết bị LC-MS/MS có sử dụng chất nội chuẩn là THC-COOH-d₃. Thiết bị phân tích có độ chính xác cao, thời gian phân tích 6 phút 1 mẫu. Quy trình xử lý mẫu đơn giản. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ nhạy tốt, độ tin cậy cao và khả

Kết quả thẩm định cho thấy độ đúng nằm trong khoảng 93,02 đến 97,71 % với độ lệch chuẩn tương đối từ 4,58 đến 8,57 %. Do vậy, phương pháp xây dựng đạt yêu cầu về độ đúng và độ lặp lại theo hướng dẫn của ANSI/ASB Standard 036 và USP [4],[5].

3.5. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Kết quả phân tích 20 mẫu tóc của các trường hợp giám định thực tế được tiến hành theo quy trình nghiên cứu trên sắc ký lỏng khối phổ, kết quả định lượng áp dụng theo đường chuẩn đã dựng cho thấy hàm lượng THC-COOH trong khoảng từ 0,11 ng/mg đến 3,04 ng/mg. Những mẫu có hàm lượng THC-COOH cao hơn giới hạn định lượng trên của đường chuẩn được pha loãng để định lượng lại hoặc lấy lượng tóc ít hơn để phân tích lại từ đầu.

năng phát hiện được chất phân tích đến hàm lượng ng/mg.

Kết quả định lượng 20 mẫu tóc thực tế gửi giám định ma túy cho thấy hàm lượng THC-COOH có trong khoảng từ 0,11 ng/mg đến 3,04 ng/mg tóc.

Phương pháp trên có thể áp dụng để phân tích đồng thời nhiều loại ma túy ở Việt Nam phục vụ cho giám định trong phòng chống ma túy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2014), *Quy trình giám định Pháp y*, NXB Y học.
- Phạm Quốc Chinh, Lê Thu Thảo, Trần Anh Dũng, Trần Thị Thúy, Trần Việt Hùng (2016), Nghiên cứu phân tích chất ma túy tổng hợp MA và MDMA trong mẫu tóc bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ, *Tạp chí Hóa, Lý và Sinh học*, 21(2), 75-81.
- Ashton, C Heather (2001), Pharmacology and effects of cannabis: a brief review, *The British Journal of Psychiatry*, 178(2), 101-106.
- LeBeau, Marc A (2020), ANSI/ASB standard 036 for method validation in forensic toxicology has replaced SWGTOX's version, *Journal of Analytical Toxicology*, 44(4), 414-414.
- Meesters R, Voswinkel Stephan (2018), Bioanalytical method development and validation: from the USFDA 2001 to the USFDA 2018 guidance for industry, *J. Appl. Bioanal*, 4(3), 67-73.