

气相色谱-质谱法同时分析运动营养品中的大麻酚、 大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚

王占良 张建丽 张亦农

国家体育总局反兴奋剂中心食品药品兴奋剂检测实验室(北京 100029)

摘要 目的:建立气相色谱-质谱法同时分析运动营养品中大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚的检测方法。方法:样品采用液液萃取,提取液经过正相固相萃取柱(Silica)纯化,洗脱液氮气吹干,N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺衍生化后,采用HP-1MS柱(17 m \times 0.2 mm i.d. \times 0.11 mm)色谱分离,程序升温,质谱检测, D_3 - Δ^9 -四氢大麻酚为内标。结果:大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚的衍生化产物实现基线分离,三个定性特征离子的峰度比计算结果可以满足世界反兴奋剂机构(WADA)要求。该方法的检测限为1 μ g/kg,定量限为2 μ g/kg,在添加的高、中、低三种浓度的相对回收率分布在94%~119%之间。结论:该方法满足常规检测要求,样品前处理简单、快速、可靠。

关键词 大麻酚;大麻二酚; Δ^9 -四氢大麻酚;运动营养品;气相色谱-质谱法

DOI:10.16038/j.1000-6710.2015.04.014

Simultaneous Determination of the Cannabinol, Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Athletic Nutrition by Gas Chromatography-mass Spectrometry

Wang Zhanliang, Zhang Jianli, Zhang Yinong

China Food and Drug Anti-doping Laboratory, Beijing, China 100029

Corresponding Author: Wang Zhanliang, Email:wangzhanliang@chinada.cn

Abstract Objective To introduce a method for determining cannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) simultaneously. **Methods** The target compounds were prepared by liquid-liquid phase extraction and purified by Silica Oasis solid prepared extraction column, the elution was dried by nitrogen, the analytes were completely separated by HP-1MS column (17m \times 0.2mm i.d. \times 0.11 μ m thickness) in linear temperature program and detected by GC-MS. Quantitative analysis was corrected by an isotope internal standard D_3 - Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Results** The relative recovery of target compounds spiked in blank sample in high, moderate and low concentrations ranged from 94 to 119%. 1 μ g/kg of detection limits for target analytes and 2 μ g/kg of quantification limits were achieved. **Conclusion** The method introduced in this study is simple, rapid, reliable and suitable for routine analysis of athletic nutrition.

Key words cannabinol, cannabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, athletic nutrition, gas chromatography - mass spectrometry

大麻有镇静和兴奋功能,在医学上可用作止痛剂,亦有研究用作医疗癌症和精神科疾病。吸食大麻有迷幻效果,可影响人的精神和生理,在大部分国家属于违法。大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚是大麻的主要化学成分。 Δ^9 -四氢大麻酚酸作为大麻的主要代谢产物,在体内大部分迅速形成葡萄糖结合物,是检测人体

服用大麻的主要指标。大麻作为兴奋剂的一类被世界反兴奋剂机构(World anti-doping agency, WADA)列入2014年版禁用清单^[1],最新版WADA技术文件规定尿中大麻的主要代谢物 Δ^9 -四氢大麻酚酸的限量浓度不得高于150 μ g/L^[2],与2007版技术文件^[3](15 μ g/L)相比,检测限提高了一个数量级,放宽了尿中大麻代谢物的检

收稿日期:2014.03.11

通信作者:王占良,Email:wangzhanliang@chinada.cn

测要求。

运动营养品如能量补充剂、体力恢复冲剂、蛋白粉、减肥胶囊等在运动员日常训练恢复体力和控制体重中常用。近些年来,含有刺蒺藜植物皂甙的运动营养品多次在实验室的日常检测中被发现有大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚等违禁成分。如果运动员服用了含有大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚等违禁成分的营养品,其尿中大麻的代谢物 Δ^9 -四氢大麻酚酸存在被检出的可能,运动员接受兴奋剂检查存在很大违规风险。目前国内外对于大麻的相关检测方法研究主要集中在大麻产品、大麻吸食者的尿液、头发等样品,检测方法采用了气质联用、液质联用等技术,而关于能量补充剂、体力恢复冲剂、蛋白粉、减肥胶囊等运动营养品中大麻类成分检测的报道很少,现有方法无法满足运动营养品快速检测的要求。本文主要详述利用固相萃取柱纯化的快速样品前处理结合气相色谱-质谱联用建立的运动营养品中大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚的分析方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Agilent 7890GC-5975MS 气相色谱-质谱仪;美国安捷伦公司产品,配有化学电离离子源(EI)及MSD Chemstation 数据采集处理系统;Waters 20孔固相萃取装置;美国沃特世公司产品;Sigma X3R高速冷冻离心机;美国西格玛奥德里奇公司产品;伊尔姆真空泵;德国伊尔姆真空泵制造有限公司产品;Dri-block DB-3D 氮气吹干装置;英国TECHNE公司产品;MILIQ纯水机;美国密理博公司产品。

1.2 主要材料与试剂

大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚购买自中国药品生物制品研究院,浓度为0.1 mg/ml的甲醇溶液,化学结构式见图1; D_3 - Δ^9 -四氢大麻酚:100 mg/L,美国Cerilliant公司;碳酸钠、碳酸氢钠为分析纯;北京化学试剂厂产品;Silica 6cc 500 mg固相萃取柱;美国沃特世公司产品;正己烷、叔丁基甲醚;色谱纯,美国DIKMA公司产品;50 ml离心管;美国labcon公司产品;进样小瓶、玻璃内衬管、进样小瓶铝盖;美国National公司产品;N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA)衍生化试剂;美国西格玛奥德里奇公司产品;实验样品包括能量补充剂、体力恢复冲剂、蛋白粉、减肥胶囊,不含油状样品。

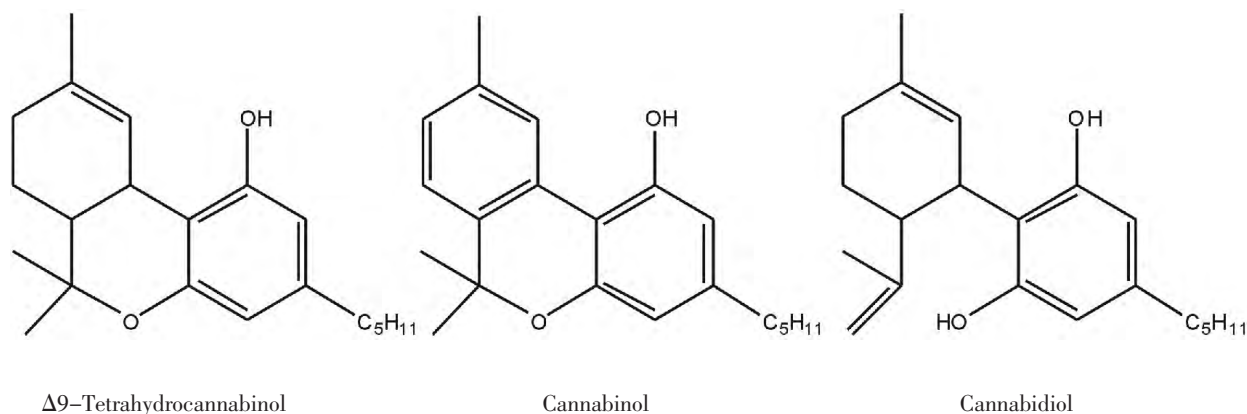


图1 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻酚和大麻二酚的结构

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent HP-1 石英毛细柱(17 m \times 0.2 mm \times 0.11 μ m);升温程序:起始温度120 $^{\circ}$ C,保持1 min,以4 $^{\circ}$ C/min 升至160 $^{\circ}$ C,然后以13 $^{\circ}$ C/min 升至310 $^{\circ}$ C,保持5 min;进样口温度280 $^{\circ}$ C;检测接口温度300 $^{\circ}$ C;载气(He)恒压模式,压力85 kPa,进样量2 μ L;分流比10:1。

1.3.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源;电子能量70 eV;离子源温度230 $^{\circ}$ C;四级杆温度150 $^{\circ}$ C;质谱SIM模式,扫描范围m/z 40~500;溶剂延迟时间6 min。

1.4 样品前处理方法

称取2.0 g 样品(粉末或胶囊内容物,准确至0.1 g)

置于50 ml的具塞塑料离心管内,加入质量浓度2 μ g/L的 D_3 -THC标准溶液50 μ L、纯净水20 ml、3 g的固体碱(碳酸钠:碳酸氢钠=3:2)、正己烷6 ml和叔丁基甲醚6 ml,速度200转/min水平往复振荡提取30 min后温度-10 $^{\circ}$ C下10000 r/min转速离心8 min,吸取上清液于10 ml的玻璃离心管内。在温度65 $^{\circ}$ C下氮气吹干,加入50 μ L的叔丁基甲醚,涡旋10 s后加入10 ml的正己烷稀释样品,待净化。

Silica 6cc 500 mg的固相萃取柱(6 ml的丙酮,6 ml的正己烷依次活化),将玻璃离心管内溶液全部上柱,6 ml的正己烷-叔丁基甲醚溶液(体积比为100:1)淋洗,6 ml的正己烷-叔丁基甲醚溶液(体积比为20:1)洗脱,收集洗脱液6 ml,在温度65 $^{\circ}$ C下氮气吹干,加入MSTFA

溶液 100 μ L, 涡旋 10 s 后, 转移至 100 μ L 瓶芯中, 加盖封严, 转移入恒温烘箱内, 70 $^{\circ}$ C 反应 20 min, 待分析。

2 结果与讨论

2.1 样品纯化

大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚的极性较低, 可以采取液液萃取的形式提取; 采取正己烷、叔丁基甲醚或乙酸乙酯作为提取溶剂时, 提取效率无明显差别, 而且三种试剂提取液的基质效应均很大。对于某些类样品如蛋白粉, 正己烷、叔丁基甲醚或乙酸乙酯作为提取溶剂时, 样品有明显的乳化现象, 而采取正己烷-叔丁基甲醚(体积比为 1:1)时, 液液萃取的乳化现象不明显, 分层较清晰, 因此提取溶剂选择正己烷-叔丁基甲醚(体积比为 1:1)。

液液萃取溶液中含有很多极性与大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚相似的成分, 正相固相萃取柱 Silica 6cc 500 mg 在纯化萃取溶液时, 基质消除效应明显, 显著提高了大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚在样品中的检测能力。为了清晰地了解大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚在正相固相萃取柱 Silica 的保留情况, 配制了正己烷与叔丁基甲醚不同体积比(1:0, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50) 的洗脱溶液, 实验结果发现: 正己烷-叔丁基甲醚体积比为 100:1 时, 三种成分得到很好的保留, 低极性成分去除明显; 正己烷-叔丁基甲醚体积比为 20:1 时, 三种成分全部洗脱, 极性较大成分保留在固相萃取柱上, 见图 2。由此确定了样品前处理的淋洗和洗脱溶液比例。

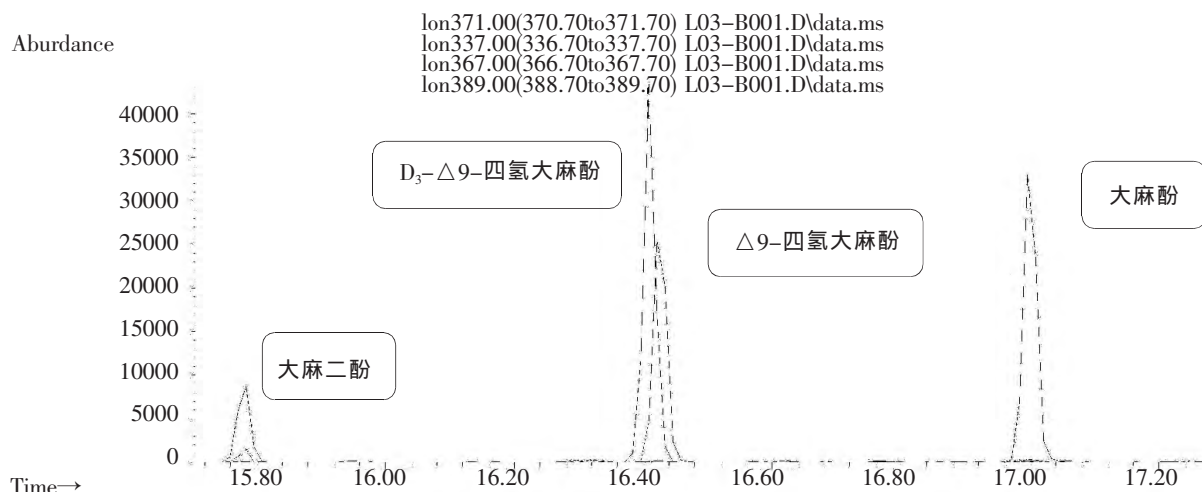


图 2 样品中大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚衍生化产物的色谱分离图

2.2 仪器方法优化

色谱分离条件优化: 大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚的游离和衍生化进样分析时, 分离效果都很理想, 完全基线分离。但是, 在相同浓度下, 衍生化形式的分析物的响应高出一到两个数量级, 灵敏度更好。色谱柱的选择, 大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚在 HP-5 和 HP-1 上的分离没有很大差异, 完全基线分离, 相同浓度时分析物的响应在色谱柱为 HP-1 好于 HP-5。

大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚定性离子的选择: 大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚衍生化后的质谱图(见图 3)中主要碎片离子见表 1, 这些离子的百分比均高于 5%, 适合作为定性离子使用; 根据 WADA 技术文件《WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification Criteria for Qualitative Assays》^[4] 的要求, 至少需要三个离子作

为定性鉴别特征离子, 同时特征离子的相对峰度百分比要满足要求。因此, 大麻酚、大麻二酚和 Δ 9-四氢大麻酚的定性离子选择符合常规检测需要。

表 1 目标化合物的质谱采集参数

名称	保留时间 (min)	基峰特征离子 M/Z	特征离子 M/Z	特征离子 M/Z
大麻酚	17.009	367*	382	310
大麻二酚	15.784	390*	337	301
Δ 9-四氢大麻酚	16.421	371*	386	303
D ₃ - Δ 9-四氢大麻酚	16.409	374	389	306

*为定量离子

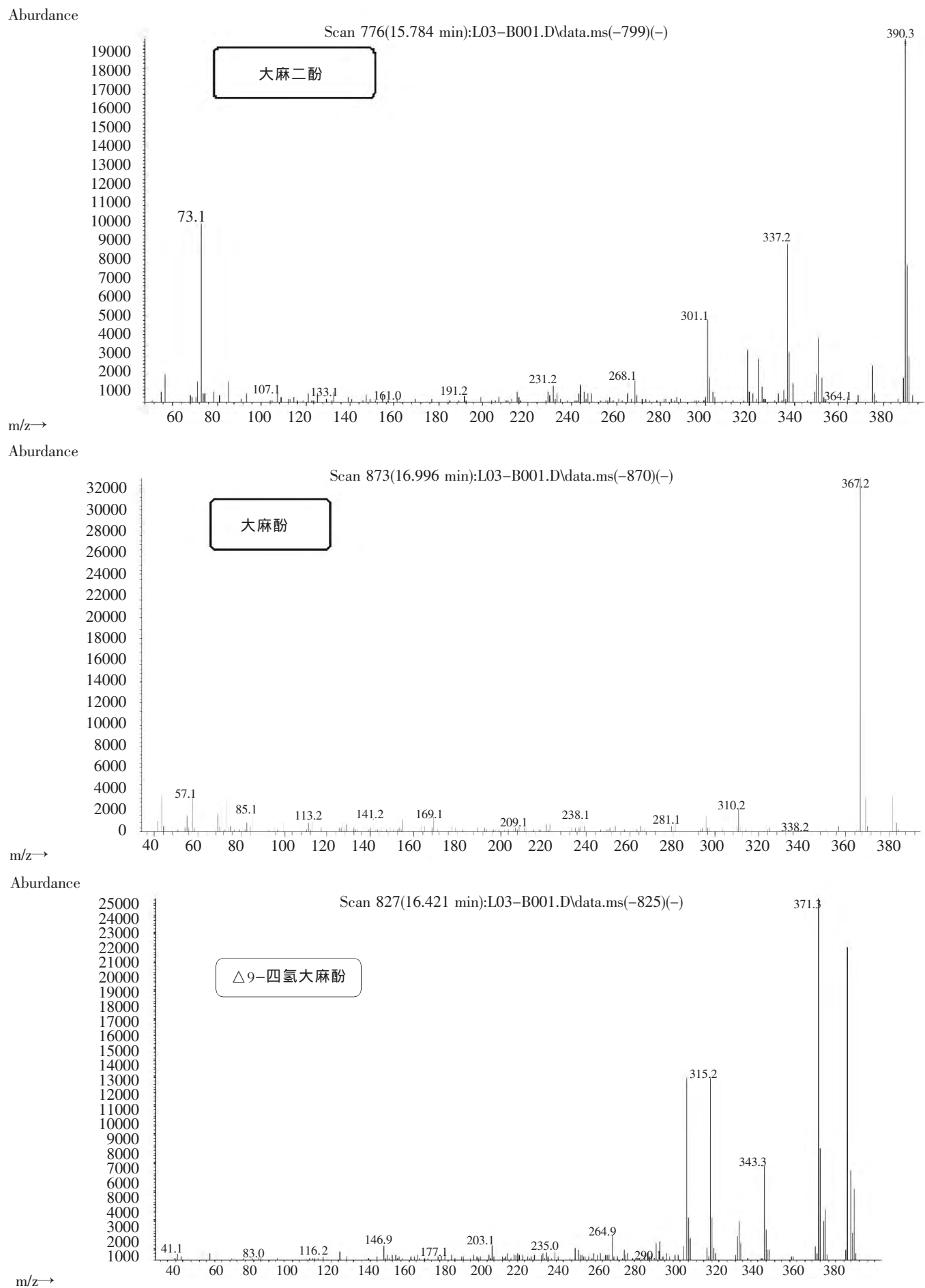


图3 大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚的质谱图

2.3 校准曲线、检出限及定量限

配制质量浓度为 2~500 μg/L 的系列混合标准溶液,加入空白样品中,经 1.4 的前处理方法处理并仪器分析后,以各分析物的定量离子色谱峰面积与 D₃-THC 的基峰离子色谱峰面积之比(Y)为纵坐标,分析物标准溶液的质量浓度(X)为横坐标做校准曲线,结果见表 2。由表 2 中数据可看出,各分析物校准曲线相关系数平方均大于 0.99,表明目标分析物在质量浓度 2~500 μg/kg 内具有良好的线性关系,且无背景干扰。

检出限(LOD)和定量限(LOQ)采用向空白样品中逐级降低加标浓度的方法来确定。以 3 倍信噪比(S/N=3)对应的目标物浓度作为检出限,以 S/N=10 对应的目

标物浓度作为定量限,获得的各目标物的检出限和定量限见表 2。

表 2 大麻酚、大麻二酚和 Δ⁹-四氢大麻酚的线性方程、检出限和定量限

名称	线性方程	相关系数 R ²	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
大麻酚	y = 0.0577x - 0.141	0.9989	1.0	2.0
大麻二酚	y = 0.0344x - 0.101	0.9988	1.0	2.0
Δ ⁹ -四氢大麻酚	y = 0.0401x - 0.111	0.9987	1.0	2.0

表 3 不同添加水平下各目标物的加标回收率、日内及日间精密度(RSD)(n=6)

名称	添加浓度 (μg/kg)	日内精密度			日间精密度		
		实测值	平均回收率%	RSD%	实测值	平均回收率%	RSD%
大麻酚	20	20.2	100.8%	5.8%	20.3	101.5%	6.9%
	100	117.8	117.8%	4.9%	114.3	114.3%	6.8%
	500	518.5	103.7%	2.0%	523.4	104.7%	4.2%
大麻二酚	20	18.9	94.7%	4.3%	18.4	92.0%	5.8%
	100	118.4	118.4%	6.9%	121.2	121.2%	8.2%
	500	540.5	108.1%	3.3%	560.3	112.1%	7.9%
Δ ⁹ -四氢大麻酚	20	20.9	104.5%	5.4%	21.8	109.0%	6.9%
	100	115.4	115.4%	4.8%	119.9	119.9%	8.7%
	500	519.0	103.8%	3.4%	530.2	106.0%	7.9%

2.4 回收率、日内及日间精密度

日内精密度中每个质量浓度点做 6 个平行样本,日间精密度也是每个质量浓度点做 6 个平行样本,连续 4 天进样。表 3 是添加水平为 20、100 及 500 μg/kg 时的回收率、日内及日间精密度。由数据可以看出,大麻酚、大麻二酚和 Δ⁹-四氢大麻酚在 3 种添加水平下平均回收率为 94%~119%,日内精密度为 2%~7%,日间精密度为 4%~9%,能够满足常规检测需要。

2.5 样品中大麻酚、大麻二酚和 Δ⁹-四氢大麻酚确证

样品中大麻酚、大麻二酚和 Δ⁹-四氢大麻酚的确证包括空白、样品三份(分别从三个独立包装中分别称取)、质控样品(空白中添加相似浓度的大麻酚、大麻二酚和 Δ⁹-四氢大麻酚),样品前处理程序按照如 1.4 所述的前处理方法进行,仪器分析部分则按照 1.3 中方法进行,样品进样顺序采取空白、样品、空白、质控样品的进样序列进行仪器分析。近年来检出样品汇总见表 4,从检测的结果看,阳性样品中以检出 Δ⁹-四氢大麻酚为主,7 例样品都含有,这可能与大麻中的化学成分以 Δ⁹-四氢大麻酚为主有直接关系;大麻酚和大麻二酚只在 1

例样品中检出,而且浓度比较高。

表 4 样品中检出的大麻酚、大麻二酚和 Δ⁹-四氢大麻酚

名称	大麻酚 (μg/kg)	大麻二酚 (μg/kg)	Δ ⁹ -四氢大麻酚 (μg/kg)
样品 01	N/A	N/A	24.3
样品 02	244.6	234.9	215.4
样品 03	N/A	N/A	45.3
样品 04	N/A	N/A	11.3
样品 05	N/A	N/A	3.8
样品 06	N/A	N/A	66.9
样品 07	N/A	N/A	19.6

3 结论

本研究建立了气相色谱-质谱法初筛和确证运动营养品中大麻酚、大麻二酚和 Δ⁹-四氢大麻酚的快速检测方法,考察了样品提取方法并采用固相萃取净化消除基质效应,获得良好效果。该方法可以满足运动营养

品中大麻酚、大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚的常规检测需要。

4 参考文献

[1] World anti - doping agency. World anti - doping agency Prohibited list 2014. 2014: 1-9.

[2] World anti -doping agency. TD2013 MRPL -Minimum Required Performance Levels. 2013: 1-4.

[3] World anti-doping agency. TD2007 MRPL - Minimum Required Performance Levels. 2007: 1-4.

[4] World anti-doping agency. WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification Criteria for Qualitative Assays. 2010: 1-9.



(上接第 393 页)

[15] 郑希付. 不同情绪模式的图片刺激启动效应. 心理学报, 2003(3):352-357.

[16] 王塘. 表象训练在湖北高校散打教学中应用的研究. 武汉体育学院硕士学位论文, 2009.

[17] Cooper LA. Demonstration of a mental analog of an external rotation. Perception & Psychophysics, 1976, 7: 20-43.

[18] Nunez-Pena MI, Aznar JA, Linares D, et al. Effects of dynamic rotation on event-related brain potentials. Brain Res Cogn Brain Res, 2005, 24(2): 307-316.

[19] 刘练红. 心理旋转的事件相关电位研究. 第四军医大学硕士学位论文, 2004.

[20] 祁乐瑛, 梁宁建. 场依存性—独立性认知方式对心理旋转的影响. 心理科学, 2009, 32(2): 262-265.

[21] 吴彦文, 游旭群. 双任务情境下心理旋转的并行加工机制. 心理学报, 2007, 39(5):785-794.

[22] 刘练红,等.分类任务与心理旋转任务的事件相关电位P300比较. 中国行为医学科学, 2005, 14(11):1013-1015.

[23] 周成林, 冯琰, 王小春. 高水平男子击剑运动员空间知觉特性的事件相关电位研究. 中国运动医学杂志, 2011, 30(2): 121-127.

[24] 欧小凡, 潘速跃, 黄英. 事件相关电位P300与认知相关研究. 中国老年学杂志, 2010, 30(3): 833-835.

[25] Kok A. On the utility of P3 amplitude as a measure of processing capacity. Psychophysiology, 2001,38(3):557-577.

[26] 郭晶晶, 杜彦鹏. 情绪词对新异刺激喜好度变化的调节机制. 心理学报, 2011, 43(4): 364-372.