

GC-MS/MS für den gezielten Nachweis von Cannabinoiden in der Forensischen Toxikologie



Wolfgang Weinmann, Julia Jung, Volker Auwärter
 Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Universitätsklinikum Freiburg

Einleitung

Das GC-MS/MS *EVOLUTION* der Firma Chromtech/Idstein basiert auf dem Agilent MSD 5973 bzw. 5975 GC-Quadrupol-MS-System. Bei Verwendung der bewährten EI-Ionenquelle und des hyperbolischen goldbedampften Quarz-Quadrupols wurde durch zusätzlichen Einbau einer IonRail Kollisionszelle (Q2) sowie eines weiteren Hochpräzisions-Quadrupols das Single-Stage GC/MS Agilent 5973 zu einem Triple-Quadrupol-MS aufgerüstet [1].

Wegen der hohen Selektivität ist GC-MS/MS für forensische Fragestellungen hervorragend geeignet, insbesondere für den Nachweis von illegalen Drogen und deren Metaboliten aus stark Matrix-belastetem biologischen Material im Spurenbereich.



CHROMTECH EVOLUTION GC-MS/MS: Links: Außenansicht. Rechts: Ionenpfad bestehend aus Original-Ionenquelle, hyperbolischem goldbedampften Quarz-Quadrupol (Q1), IonRail Kollisionszelle (Q2) und Hochpräzisions-Quadrupol (Q3).

Probenaufarbeitung

1 ml Serum
 + 25 µl int. Standard (5, 5 bzw. 25 ng THC-D₃, 11-OH-THC-D₃, THC-COOH-D₃)
 + 2 ml 0,1 M Essigsäure

SPE (Chromabond C₁₈, 3 ml, 500 mg):

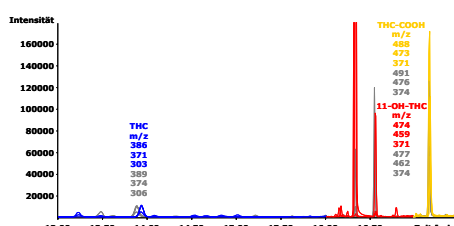
Konditionieren: 2 ml Methanol,
 2 ml 0,1 M Essigsäure
 Beladen: 3 ml verdünnte Probe
 Waschen: 2 ml 0,1 M Essigsäure
 2 ml Acetonitril:H₂O (70:30, V/V)
 Trocknen: 2 min (Stickstoffstrom)
 Eluieren: 1,5 ml Acetonitril
 Eindampfen: unter Stickstoff bei 40°C

Derivatisierung:

25 µl MSTFA und 25 µl Ethylacetat
 Inkubation für 45 min bei 90°C, Injektion 1 – 2 µl

Ergebnisse

Für den quantitativen Nachweis von Cannabinoiden in Serum bzw. Blut hat sich in den letzten 15 Jahren die Analyse mit GC-EI-SIM-MS bewährt [2, 3].

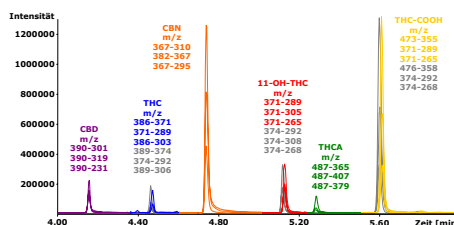


Extrahierte Ionenchromatogramme in einer Serumprobe mit 5 ng/ml Δ9-THC, 5 ng/ml 11-OH-Δ9-THC und 25 ng/ml Δ9-THC-COOH (Agilent 5973 MSD, SIM-Modus).

Die Nachweisempfindlichkeit eines GC-Single-MS-Gerätes (Agilent 5973 MSD) im SIM-Modus reichte bislang bis etwa 0,2 ng/ml Δ9-THC, 0,1 ng/ml 11-OH-Δ9-THC und 2,0 ng/ml Δ9-THC-COOH im Serum bei Aufkonzentrierung der Probe mittels Festphasenextraktion und anschließender Trimethylsilylierung.

Die Bestimmung der LOD erfolgte nach forensischen Richtlinien mit linearer Regression durch drei charakteristische Ionen [3].

Eine Steigerung der Empfindlichkeit für THC war mit Hilfe des *CHROMTECH EVOLUTION* GC-MS/MS zwar nicht möglich, was möglicherweise auf die bereits sehr „sauberen“, d.h. wenig Matrix-belasteten Probenextrakte und die hohe chromatographische Trenneffektivität eines ca. 14-minütigen Temperaturgradienten (bis zur Elution von THC) zurückzuführen ist. Bei schnellerer Chromatographie bestand jedoch bislang das Problem, dass Störkomponenten mit den Analyten überlagerten.



Extrahierte Ionenchromatogramme in einer Serumprobe mit 5 ng/ml CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-Δ9-THC und Δ9-THCA sowie 25 ng/ml Δ9-THC-COOH (Chromtech Evolution, MRM-Modus).

Mit der höheren Selektivität des GC-MS/MS konnte die Analysenzeit deutlich reduziert werden.

Um aber bei verringerter Transmission des Triple-Quadrupol-Gerätes im Vergleich zum Single-Quadrupol-MS eine ähnliche Nachweisgrenze erreichen zu können, war es notwendig, die Auflösung in Q1 und Q3 jeweils auf 1,5 amu PWHH einzustellen. Außerdem musste der Detektor 1000 V über die Tuning-Spannung gesetzt werden.

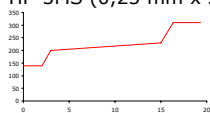
Ein wesentlicher Vorteil für die quantitative Bestimmung von Cannabinoiden in Serum ist der deutliche Zeitgewinn bei der GC-MS/MS-Analyse von Δ9-THC, dessen Metaboliten und anderen Cannabinoiden. Während die ursprüngliche GC-MS-Methode eine Laufzeit von ca. 24 min erforderte, konnte die Zeit mit GC-MS/MS auf 6,5 Minuten reduziert werden, ohne dass ein negativer Einfluss von koeludierenden Matrixsubstanzen zu beobachten war, was bei GC-SIM-MS bei schnelleren Gradienten sicher zu erwarten wäre.

Analytische Methoden

GC-(SIM)-MS

GC-Bedingungen:

GC: Agilent 7683B Autosampler
 Agilent 6890N Network GC
 Säule: HP-5MS (0,25 mm x 30,0 m, 250 nm)
 Gradient:



Trärgas: Helium, 1 ml/min

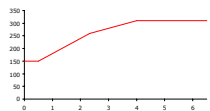
MS-Einstellungen:

Agilent 5973 Network MSD, SIM-Modus (Δ9-THC: m/z 386, 371, 303; Δ9-THC-D₃: m/z 389, 374, 306; 11-OH-Δ9-THC: m/z 474, 549, 371; 11-OH-Δ9-THC-D₃: m/z 477, 462, 374; Δ9-THC-COOH: m/z 488, 473, 371; Δ9-THC-COOH-D₃: m/z 491, 476, 374), ChemStation Software D.03.00.611

GC-MS/MS

GC-Einstellungen:

GC: CTC Analytics Combi Pal Autosampler
 Agilent 6890N Network GC
 Säule: HP-5MS (0,25 mm x 30,0 m, 250 nm)
 Gradient:



Trärgas: Helium 1 ml/min

MS-Einstellungen:

CHROMTECH EVOLUTION, MRM-Modus (CBD: m/z 390→301, 390→319, 390→231; Δ9-THC: m/z 386→371, 371→289, 386→303; Δ9-THC-D₃: m/z 389→374, 374→292, 389→306; CBN: m/z 367→310, 382→367, 367→295; 11-OH-Δ9-THC: m/z 371→289, 371→305, 371→265; 11-OH-Δ9-THC-D₃: m/z 374→292, 374→308, 374→268; Δ9-THCA: m/z 487→365, 487→407, 487→379; Δ9-THC-COOH: m/z 473→355, 371→289, 371→265; Δ9-THC-COOH-D₃: m/z 476→358, 374→292, 374→268), Evolution Software 2.04.002 (Chromtech), ChemStation Software D.03.00.611 (Agilent)

Zusammenfassung

- Durch Verwendung des MRM-Modus war eine deutliche Verkürzung der Analysenzeiten auf eine Gesamtlaufzeit von 10 min möglich (anstatt bisher ca. 30 min).
- Für die spezielle Fragestellung der Serumanalytik auf THC war durch GC-MS/MS gegenüber GC-SIM-MS keine Verbesserung der Nachweisgrenze erzielbar – möglicherweise aufgrund des bereits sehr guten Signal-Rausch-Verhältnisses im SIM-Modus (ohne Störkomponenten im entsprechenden Retentionszeitfenster für THC). Ein näher zu untersuchender Anwendungsbereich der GC-MS/MS ist die Analyse von Vollblutproben oder anderen biologischen Matrices, welche üblicherweise zu mehr Störkomponenten im SIM-Modus führen, wodurch die Nachweisgrenze für THC erheblich ansteigt.

Literatur

- [1] www.chromtech.de
- [2] Nadulski T et al.: Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. J Anal Tox. 29 (2005) 782-789.
- [3] Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie: Analysen mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation. http://www.gtfc.org/tk67_1/akqual.pdf