Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

采用Ostro样品制备板和CORTECS UPLC实心核颗粒色谱柱为法医毒理分析全血中的合成大麻素

Jonathan P. Danaceau、Erin E. Chambers和Kenneth J. Fountain
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 为合成大麻素类化合物及其代谢物建立单一、通用的分析方法
- 对所有分析物和代谢物具有线性响应
- 大多数分析物的回收率在90%以上
- 大多数化合物的基质效应低于15%
- 色谱基线分离质谱图相同的结构异构体

沃特世解决方案

Ostro™样品制备板

CORTECS™ UPLC®色谱柱

ACQUITY UPLC®系统

Xevo® TQD质谱仪

关键词

合成大麻素，设计药，香料化合物，UPLC，法医毒理学，全血，样品制备，CORTECS

简介

合成大麻素通常被称作“香料”化合物或作为“香料”化合物销售，为执法机构和司法鉴定实验室带来日益严峻的挑战。这些设计药模拟天然大麻素对神经产生的影响效应。这类药物通常会被注明“不适用于人类消费”，并作为合法的天然大麻替代品销售，在过去的几年里这些药物得到广泛接受并被大量使用[1,2]。尽管新近的法规禁止了部分这类化合物的销售和使用，但有人对现有的化合物结构稍作修饰使其成为另一种物质以规避现行法律。本应用纪要详细介绍了一种方法，该方法可成功提取和分析全血中七种不同类别的代表性合成大麻素用于法医毒理分析。结合一种快速、通用的样品制备方法，我们从全血样品中提取了22种合成大麻素和代谢物，这种样品制备方法能够有效纯化样品并且具有通用性，可适用于各种不同化学性质的化合物。实验结果表明提取回收率为73%-105%，平均回收率达92%，大多数化合物的基质效应低于15%。校准曲线的线性范围为2-500 ng/mL，并且在此浓度范围内获得了对质量控制样品的准确结果。利用沃特世(Waters®)亚2 µm实心核颗粒CORTECS色谱柱进行分析分离，可得到最佳的性能和分离效率。对于这些不同类别的药物的分析使本方法得以拓展并适用于新开发的相关化合物，必要时也可对本该方法作出适当的调整。

实验

UPLC 条件

系统: ACQUITY UPLC

色谱柱: CORTECS C18，1.6 µm，2.1 × 100 mm（部件号186007095）

柱温: 30 ℃

进样体积: 10 µL

流速: 0.6 mL/min

流动相A: 0.1%甲酸的MilliQ水溶液

流动相B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度: 初始条件为30%的流动相B。流动相B在2 min内增加至50%，达到50%后保持1 min，在4 min内增加至90%，然后在0.2 min内流动相B返回到30%。重新平衡系统0.8 min。整个循环时间为8.0 min。

样品瓶/板: Ostro 96孔样品收集板，2.0 mL（部件号186005518）

MS条件

质谱仪: ACQUITY® TQD

电离模式: ESI+

采集模式: MRM（离子对见表1）

毛细管电压: 1 kV

碰撞能量(eV): 针对各化合物优化（表1）

锥孔电压(V): 针对各化合物优化 （表1）

数据管理

MassLynx® 软件

样品描述

AM2233、JWH-015、RCS-4、JWH-203、RCS-8、JWH-210、JWH-073和JWH-018均购自Cerilliant（德克萨斯州圆石）。所有其它化合物和代谢物购自Cayman Chemical（密歇根州安阿伯）。

各种储液(1 mg/mL)采用甲醇、DMSO或DMSO/甲醇(50:50)配制。所有化合物的混合储液(10 µg/mL)用甲醇配制。工作溶液每天用标准品新鲜配制于基质（全血）中，并进行连续稀释以得到所需浓度。所有分析物的校准浓度范围为2至500 ng/mL。配制的质量控制样品在全血中的浓度为7.5 ng/mL、75 ng/mL和300 ng/mL。

本文中所分析的22种化合物列于表1中，构成了一组包含各类法医毒理学相关的合成大麻素的典型样品列表，其中包括金刚烷甲酰吲哚类（如AM 1248和AKB48）、萘甲酰吲哚类（如JWH 022）、苯乙酰吲哚类（如RCS-4和RCS-8）和四甲基环丙基吲哚类（UR-144和XLR11），还包括JWH-073和JWH-018的主要代谢物，由于其中一些化合物为质谱碎片相同的结构异构体，因此对其准确定量需要达到足够的色谱分离。

样品制备

采用Ostro 96孔样品制备板进行样品提取。将50 µL全血加入含150 µL，0.1 M $ZnSO_4/NH_4CH_3COOH$水溶液的孔中，并涡旋混合5秒钟使血细胞溶解。然后向每个孔中加入600 µL乙腈，并将所有样品涡旋混合3 min，使样品完全沉淀。将所有样品洗脱至2 mL的96孔收集板中。取10 µL注入LC/MS/MS系统。

分析物回收率按照以下公式计算：

$$\%回收率 = \left(\frac{峰面积\ A}{峰面积\ B}\right) \times 100\%$$

其中，A =所提取样品的峰面积，B =对空白基质样品提取后加入分析物标准品的峰面积。

基质效应按照以下公式计算：

$$基质效应 = \left(\left(\frac{存在基质时的峰面积}{无基质时的峰面积}\right) - 1\right) \times 100\%$$

存在基质时的峰面积是指在对空白基质提取后加入了分析物标准品的峰面积。无基质时的峰面积指在纯溶剂溶液中的分析物的峰面积。

结果与讨论

色谱分离

根据20 ng/mL校准标准品获得的所有分析物的代表性色谱图如图1所示。峰归属列于表1中。采用CORTECS UPLC C_{18} 1.6 µm，2.1 × 100 mm色谱柱在7.5 min内完成所有分析物的分析，总分析循环时间为8.0 min。所有化合物的峰形良好，无明显的拖尾或不对称，且所有峰宽小于3 s。峰9和峰10为一对同分异构体的代谢物，其母离子和子离子相同，经计算二者的分离度为1.04，几乎达到基线分离，如果这两种化合物共流出则无法明确识别。在BEH UPLC C_{18}色谱柱上分析相同的化合物混合物时，这两种化合物无法实现足够的分离(此处不作数据说明)。在杂化色谱柱中还观察到共流出的化合物对5和6，以及7和8。将CORTECS UPLC色谱柱与两种类似的全多孔UPLC色谱柱(BEH和HSS T3)进行更深入的比较，结果显示，采用全多孔色谱柱得到的峰宽介于CORTECS UPLC色谱柱中所得峰宽至其2倍以上的范围内。平均来说，在BEH和HSS T3色谱柱中得到的峰宽分别比CORTECS UPLC色谱柱所得峰宽大15%和30%。

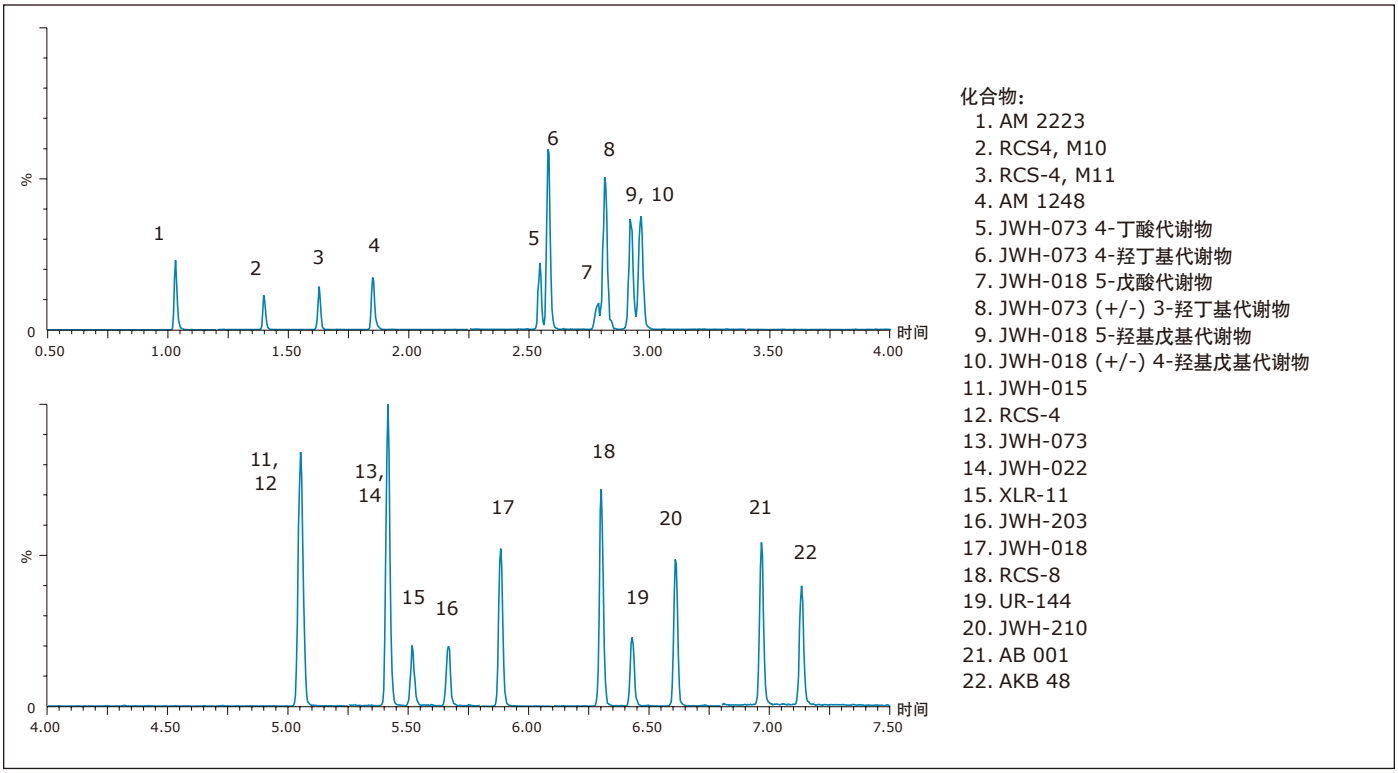

图1. 22种合成大麻素及其代谢物的UPLC/MS/MS色谱图。峰归属列于表1中。

编号	化合物	保留时间	分子式	锥孔电压	MRM 通道	碰撞能量
1	AM2233	1.04	$C_{22}H_{23}IN_2O$	40 40	459.2→98.05 459.2→112.1	34 22
2	RCS-4, M10	1.40	$C_{20}H_{21}NO_3$	40 40	324.2→121.0 324.2→93.0	22 46
3	RCS-4, M11	1.62	$C_{20}H_{19}NO_3$	36 36	322.2→121.0 322.2→93.0	22 46
4	AM 1248	1.87	$C_{26}H_{34}N_2O$	56 56	391.4→135.1 391.4→112.1	28 30
5	JWH-073 4-丁酸代谢物	2.54	$C_{23}H_{19}NO_3$	50 50	358.2→155.1 358.2→127.1	26 48
6	JWH-073 4-羟丁基代谢物	2.57	$C_{23}H_{21}NO_2$	50 50	344.2→155.1 344.2→127.1	22 40
7	JWH-018 5-戊酸代谢物	2.77	$C_{24}H_{21}NO_3$	46 46	372.2→155.1 372.2→127.1	24 50
8	JWH-073 (+/-) 3-羟丁基代谢物	2.81	$C_{23}H_{21}NO_2$	44 44	344.2→155.1 344.2→127.1	26 46
9	JWH-018 5-羟基戊基代谢物	2.91	$C_{24}H_{23}NO_2$	40 44	358.2→155.1 358.2→127.1	24 48
10	JWH-018 (+/-) 4-羟基戊基代谢物	2.96	$C_{24}H_{23}NO_2$	40 44	358.2→155.1 358.2→127.1	24 48
11	JWH-015	5.04	$C_{23}H_{21}NO$	42 42	328.2→155.1 328.2→127.1	24 42
12	RCS-4	5.05	$C_{21}H_{23}NO_2$	44 44	322.2→135.1 322.2→92.0	26 64
14	JWH-022	5.41	$C_{24}H_{21}NO$	50 50	340.2→155.1 340.2→127.1	26 54
13	JWH-073	5.41	$C_{23}H_{21}NO$	48 48	328.2→155.1 328.2→127.1	26 48
15	XLR-11	5.52	$C_{21}H_{28}FNO$	48 48	330.3→125.1 330.3→97.1	26 32
16	JWH-203	5.66	$C_{21}H_{22}ClNO$	46 46	340.2→125.0 340.2→188.1	26 20
17	JWH-018	5.88	$C_{24}H_{23}NO$	44 44	342.2→155.1 342.2→127.1	26 42
18	RCS-8	6.30	$C_{25}H_{29}NO_2$	42 42	376.3→121.1 376.3→91.0	26 50
19	UR-144	6.43	$C_{21}H_{29}NO$	46 46	312.3→125.1 312.3→214.2	24 25
20	JWH-210	6.61	$C_{26}H_{27}NO$	48 48	370.2→183.1 370.2→155.1	26 38
21	AB 001	6.97	$C_{24}H_{31}NO$	52 52	350.3→135.1 350.3→93.0	30 46
22	AKB 48	7.13	$C_{23}H_{31}N_3O$	38 38	366.3→135.1 366.3→93.1	22 50

表1. 本应用纪要中合成大麻素化合物及其代谢物的分子式、保留时间和MS/MS条件。

回收率和基质效应

回收率和基质效应根据实验部分所述的公式进行计算，结果见图2。结果表明，所有化合物的回收率结果良好，仅一种化合物在80%或以上，所有化合物的平均回收率为92%。基质效应很小，其中三种化合物的基质效应为16%，其余化合物均低于15%。利用本文中的提取方法使测试的所有化合物几乎得到完全回收，并且基质效应极小。各种合成大麻素的高回收率和极低基质效应表明，本方法在应用于其它相关化合物时应当能够获得类似的结果。

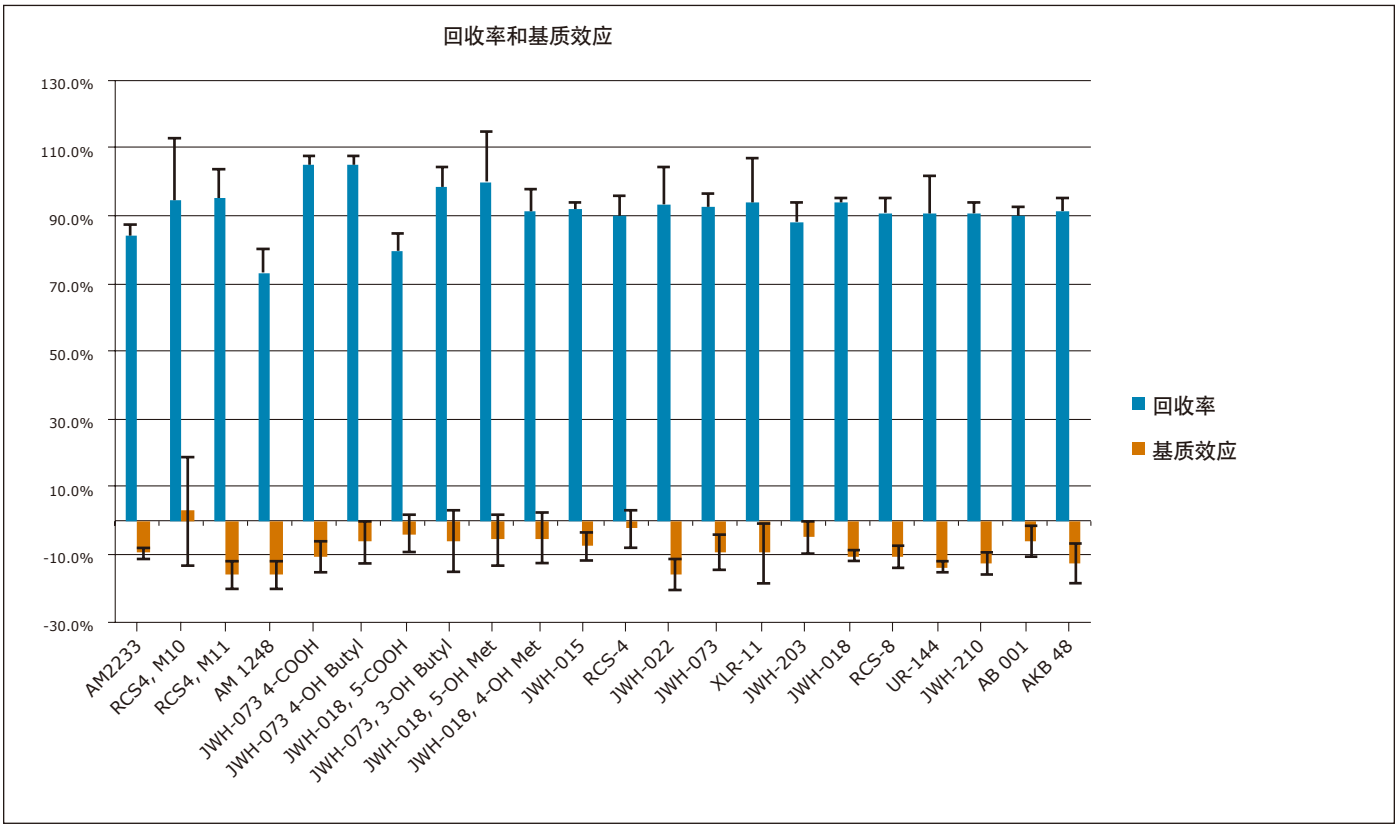

图2.采用Ostro样品制备板从全血中提取合成大麻素化合物的回收率和基质效应。图中的条柱和误差条柱分别表示平均值和标准偏差(N=4)。

线性和分析灵敏度

为了评估分析方法的线性和灵敏度，我们为所有组分建立了浓度范围为2至500 ng/mL的校准曲线。此外，还对浓度为7.5、75.0和3000 ng/mL的质量控制样品(N=4)进行了提取和分析。所有化合物的校准曲线R^2值和QC总结数据汇总于表2中。在22种化合物中，其中21种化合物的R^2值大于0.99，表明所有化合物在整个校准曲线浓度范围内具有出色的线性。所有化合物的线性响应浓度低至2 ng/mL，表明信噪比良好。在低、中和高浓度范围内均获得了准确的质量控制(QC)结果。低浓度QC样品(7.5 ng/mL)的准确度范围为79.0%至104.4%，平均值为89.4%。所有分析物的中、高浓度QC样品所得结果良好，准确度在期望值的10%范围之内。并且，大多数分析物的%RSDs低于10%，最大不超过13%，表明分析精度良好。各浓度水平(低、中和高)下的回收率评估结果显示，平均回收率介于89.5%至101.7%之间。

		QC 浓度 (ng/mL)						
		7.5		75		300		
	R^2	准确度(%)	%RSD	准确度(%)	%RSD	准确度(%)	%RSD	平均准确度(%)
AM2233	0.997	100.5	2.0	103.6	3.3	100.5	2.0	**101.5**
RCS4, M10	0.986	97.5	3.9	106.1	5.7	101.7	8.4	**101.7**
RCS4, M11	0.991	91.3	16.3	108.8	5.1	96.8	12.0	**98.9**
AM 1248	0.993	83.1	10.0	106.1	5.7	105.4	6.4	**98.2**
JWH-073 4-COOH	0.991	96.1	9.8	99.3	7.4	106.2	9.1	**100.5**
JWH-073 4-羟丁基	0.996	88.7	21.3	98.1	3.5	102.2	3.9	**96.3**
JWH-018, 5-COOH	0.992	90.7	15.2	97.8	3.8	103.7	10.6	**97.4**
JWH-073, 3-羟丁基	0.993	79.0	8.6	92.9	8.3	96.6	2.9	**89.5**
JWH-018, 5-羟基代谢物	0.995	82.8	10.3	100.0	10.4	100.1	3.4	**94.3**
JWH-018, 4-羟基代谢物	0.992	82.3	17.9	103.1	6.3	96.0	1.9	**93.8**
JWH-015	0.993	87.1	4.3	101.8	3.9	101.3	2.1	**96.8**
RCS-4	0.993	92.5	8.1	99.6	5.0	97.3	3.6	**96.4**
JWH-022	0.993	85.3	4.9	100.3	4.8	97.8	4.2	**94.5**
JWH-073	0.994	89.6	6.5	99.4	6.6	97.6	4.9	**95.5**
XLR-11	0.993	101.4	10.4	99.6	2.8	99.7	5.0	**100.2**
JWH-203	0.990	82.1	12.2	96.1	12.2	94.6	9.3	**91.0**
JWH-018	0.994	88.4	2.9	97.2	3.9	98.8	3.6	**94.8**
RCS-8	0.992	94.3	2.6	101.9	4.6	99.4	4.7	**98.5**
UR-144	0.994	85.1	5.4	97.0	6.7	99.2	3.7	**93.8**
JWH-210	0.994	92.7	6.4	96.3	4.5	95.6	5.3	**94.8**
AB 001	0.992	84.4	8.1	101.0	4.7	100.2	10.6	**95.2**
AKB 48	0.992	92.8	9.9	98.5	4.8	97.7	8.4	**96.4**
	平均准确度(%)	**89.4**		**100.2**		**99.5**		

表2.所有化合物的R^2值和质量控制结果。

结论

我们从全血中提取出由22种合成大麻素药物及其代谢物组成的一组化合物，并利用UPLC/MS/MS系统进行分析。Ostro样品制备板的使用可为所有分析物提供良好的回收率，且基质效应很小。所有化合物在2至500 ng/mL的浓度范围内表现出良好的线性。采用CORTECS UPLC色谱柱进行分离能够在较短时间内完成所有化合物的分析，并且使一对关键的同分异构体达到基线分离。分离效率和峰宽均优于柱尺寸接近的全多孔颗粒色谱柱。本方法能够快速、可靠地提取和分析这类重要化合物以利于法医毒理分析。由这些化合物的试验结果可知，本提取方法性能卓越并具有通用性特点，可用于其它合成大麻素和代谢物的分析，是一种适用于快速开发新的相关化合物分析的重要方法。

参考文献

1. Seely KA, *et al*. Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012; 39(2):234-243.
2. Wohlfarth A, Weinmann W. Bioanalysis of new designer drugs. *Bioanalysis*. 2010; 2(5):965-979.

仅供研究使用。不适用于临床诊断。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY、UPLC、Xevo、MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。Ostro、CORTECS是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

© 2013 年沃特世公司。印制于中国

2013 年 6 月 720004726ZH LL-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com