Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用Oasis HLB µElution板和CORTECS UPLC色谱柱对尿液中的合成大麻素进行法医毒理学分析

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

应用优势

- 用于分析尿液中合成大麻素及其代谢物的一种快速通用的提取方法
- 结构异构体可达到基线分离
- CORTECS™ UPLC®色谱柱与全多孔颗粒色谱柱相比提高了分离效率和分离度
- 采用µElution板无需蒸发步骤即可富集样品
- 各种合成大麻素及其代谢物可获得良好的线性、准确度和精密度

沃特世解决方案

Oasis® HLB µElution板

CORTECS UPLC C_{18}，1.6 µm，2.1 × 100 mm色谱柱

ACQUITY UPLC® I-Class系统

Xevo® TQD质谱仪

关键词

合成大麻素，化合致幻药，“香料”化合物，UPLC，法医毒理学，尿液，固相萃取，CORTECS，实心核，Oasis

简介

合成大麻素通常被称为“香料”化合物在市场销售，这为执法机构和司法鉴定实验室带来日益严峻的挑战。这类化合致幻药模拟天然大麻素对神经产生影响效应。虽然这类药物通常被注明“不适于人类使用”，但在过去几年里，它们作为合法的天然大麻替代品在人群中的接受和使用程度有着明显增长[1,2]。尽管新的法规禁止了部分这类化合物的销售和使用，但人们只需对现有的化合物结构稍作修饰便使其成为另一种物质以规避现行法律。本文详细介绍了一种方法，可就法医毒理学范畴对样品中多种不同类别的代表性合成大麻素进行提取和分析。我们采用Waters Oasis HLB µElution板从尿液中提取了22种合成大麻素及其代谢物。利用沃特世新开发的1.6 µm实心核颗粒填充的UPLC色谱柱（CORTECS）进行分离分析，实现超凡的色谱性能和分离效率。所有化合物校准曲线的线性范围为1至100 ng/mL。我们在校准浓度范围内获得了准确精密的质量控制样品定量结果。对于这些不同类别的药物及其代谢物的分析应能够使本方法拓展并适用于新开发的相关化合物，必要时也可对该方法作出适当的调整。

实验

最终方法条件

LC条件

LC系统：	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱：	CORTECS UPLC C_{18}，1.6 µm，2.1 × 100 mm（部件号186007095）
柱温：	30 °C
进样体积：	5 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%，在50%保持1 min，再在4 min内增加至90%，然后在0.2 min内返回至30%。重新平衡系统1.3 min。整个循环时间为8.5 min
样品瓶/板：	96孔收集板，带有700 µL去活化玻璃插管（部件号186000349DV）

MS条件

MS系统：	Xevo TQD质谱仪
电离模式：	ESI+
采集模式：	MRM（请参阅表1，了解离子通道）
毛细管电压：	1 kV
碰撞能量（eV）：	针对各化合物优化（请参阅表1）
锥孔电压（V）：	针对各化合物优化（请参阅表1）

数据管理

采用Waters MassLynx®软件4.1版采集和分析所有数据，并用TargetLynx™软件进行定量。利用IntelliStart™优化质谱条件。

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	0.97	$C_{22}H_{23}IN_{20}$	48 48	459.2→98.0 459.2→112.1	50 40
2	RCS-4, M10	1.34	$C_{20}H_{21}NO_3$	40 40	324.2→121.0 324.2→93.0	36 72
3	RCS-4, M11	1.57	$C_{20}H_{19}NO_3$	42 42	322.2→121.0 322.2→93.0	32 60
4	AM 1248	1.78	$C_{26}H_{34}N_2O$	62 62	391.4→135.1 391.4→112.1	42 50
5	JWH-073 4-丁酸代谢物	2.47	$C_{23}H_{19}NO_3$	52 52	358.2→155.1 358.2→127.1	32 70
6	JWH-073 4-羟丁基代谢物	2.51	$C_{23}H_{21}NO_2$	52 52	344.2→155.1 344.2→127.1	32 70
7	JWH-018 5-戊酸代谢物	2.71	$C_{24}H_{21}NO_3$	54 54	372.2→155.1 372.2→127.1	32 72
8	JWH-073 (+/-) 3-羟丁基代谢物	2.74	$C_{23}H_{21}NO_2$	54 54	344.2→155.1 344.2→127.1	36 64
9	JWH-018 5-羟基戊基代谢物	2.84	$C_{24}H_{23}NO_2$	50 50	358.2→155.1 358.2→127.1	24 48
10	JWH-018 (+/-) 4-羟基戊基代谢物	2.89	$C_{24}H_{23}NO_2$	50 50	358.2→155.1 358.2→127.1	34 64
11	JWH-015	4.97	$C_{23}H_{21}NO$	48 48	328.2→1 55.1 328.2→127.1	32 62
12	RCS-4	4.98	$C_{21}H_{23}NO_2$	48 48	322.2→135.1 322.2→92.0	40 68
14	JWH-022	5.34	$C_{24}H_{21}NO$	52 52	340.2→155.1 340.2→127.1	34 60
13	JWH-073	5.34	$C_{23}H_{21}NO$	48 48	328.2→155.1 328.2→127.1	36 56
15	XLR-11	5.44	$C_{21}H_{28}FNO$	52 52	330.3→125.1 330.3→83.0	34 42
16	JWH-203	5.59	$C_{21}H_{22}ClNO$	44 44	340.2→188.1 340.2→125.0	32 42
17	JWH-018	5.82	$C_{24}H_{23}NO$	50 50	342.2→155.1 342.2→127.1	34 60
18	RCS-8	6.23	$C_{25}H_{29}NO_2$	44 44	376.3→121.1 376.3→91.0	36 66
19	UR-144	6.36	$C_{21}H_{29}NO$	48 48	312.3→214.2 312.3→125.1	35 34
20	JWH-210	6.54	$C_{26}H_{27}NO$	54 54	370.2→214.2 370.2→183.1	34 36
21	AB 001	6.88	$C_{24}H_{31}NO$	62 62	350.3→135.1 350.3→93.0	44 62
22	AKB 48	7.05	$C_{23}H_{31}N_{30}$	36 36	366.3→135.1 366.3→93.1	28 68

表1. 本应用纪要中的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。

化学品

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

各种储液（1 mg/mL）采用甲醇、DMSO或50:50 DMSO/甲醇配制。所有化合物的混合储液（10 µg/mL）用甲醇配制。工作溶液需通过每天将标准品加入基质（尿液）进行制备，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0.5至100.0 ng/mL。配制的质量控制样品在尿液中的浓度为2.5、7.5和75.0 ng/mL。

本文中所分析的22种化合物列于表1中。这些化合物构成了一组包含各类法医毒理学相关合成大麻素的化合物，其中包括金刚烷甲酰吲哚类（AM 1248和AKB48）、萘甲酰吲哚类（JWH 022）、苯乙酰吲哚类（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，因此需对其进行充分色谱分离以达到准确定量。

样品制备

采用Oasis HLB µElution板（部件号186001828BA）进行样品提取。先向1.0 mL尿液中加入0.5 mL 0.8 M磷酸钾缓冲液（pH 7.0），然后加入10 µL β-葡糖醛酸糖苷酶（>140 IU/mL；Roche）。在40 °C下温育1 h之后，向所有样品中加入1.5 mL 4% H_3PO_4。然后，使用Oasis HLB µElution板对600 µL最终制备的样品（相当于200 µL尿液）进行提取。用200 µL甲醇(MeOH)和200 µL H_2O对所有孔进行活化。将600 µL已水解的预处理尿液样品上样至各孔。用200 µL水和200 µL 50:50 H_2O/MeOH清洗所有孔。用25 µL 60:40 ACN/异丙醇（IPA）对样品进行洗脱，共洗脱2次。用75 µL H_2O稀释所有样品，取5 µL注入UPLC系统。

分析物回收率按照以下公式计算：

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

其中，A 为样品提取后的峰面积，B 为在提取后加入化合物的基质样品的峰面积。

基质效应按照以下公式计算：

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

存在基质时的峰面积是指在提取后加入了化合物的基质样品的峰面积。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

色谱图

CORTECS实心核颗粒因其结合了最佳的色谱柱填充技术而具备出色的色谱性能。利用20 ng/mL校准标准品获得的所有化合物代表性色谱图如图1所示。谱峰分配情况列于表1中。采用CORTECS UPLC C_{18}色谱柱（2.1 × 100 mm；1.6 µm）在7.5 min内完成所有分析物的分析，总循环时间为8.5 min。所有化合物的峰形良好，无明显的拖尾或不对称，且在5%峰高处的所有峰宽小于3 s。峰9和峰10为一对同分异构代谢物，其母离子和产物离子相同，经计算二者的分离度为1.04，达到了清晰的基线分离，但如果这两种化合物共流出则无法明确识别和定量。在ACQUITY UPLC BEH C_{18}色谱柱（同样为2.1 × 100 mm）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。在BEH C_{18}色谱柱中还观察到共流出的化合物对5和6，以及7和8。图2通过对比 CORTECS C_{18}与BEH C_{18}色谱图强调了化合物5-10在谱图效果方面的提高。将CORTECS色谱柱与两种类似、尺寸相匹配的全多孔UPLC色谱柱（BEH C_{18}和HSS T3）进行更深入的比较，结果显示使用CORTECS色谱柱所得到的峰宽减更小而峰容量得到提高。总体而言，采用CORTECS色谱柱所得的峰宽较BEH和HSS T3色谱柱更窄，分别减少了12%和23%。CORTECS实心核颗粒色谱柱凭借其填充技术的优势和色谱柱性能方面的改善，有望超越其它粒径相似的市售全多孔UHPLC色谱柱。

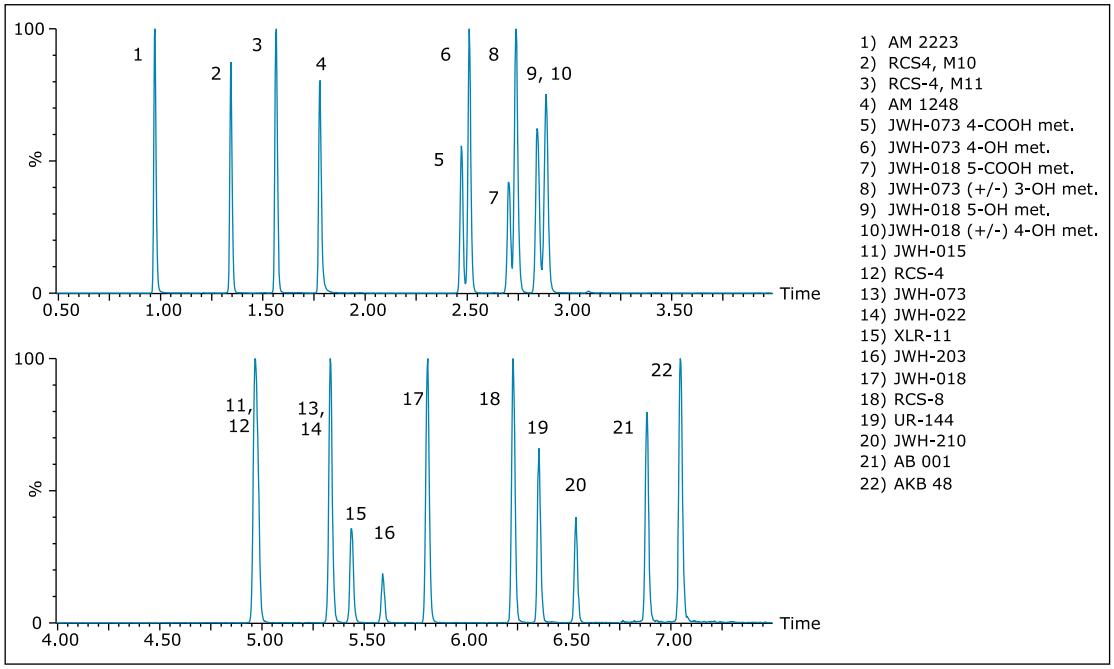

图1. 22种合成大麻素及其代谢物的UPLC/MS/MS色谱图。谱峰分配列于表1中。

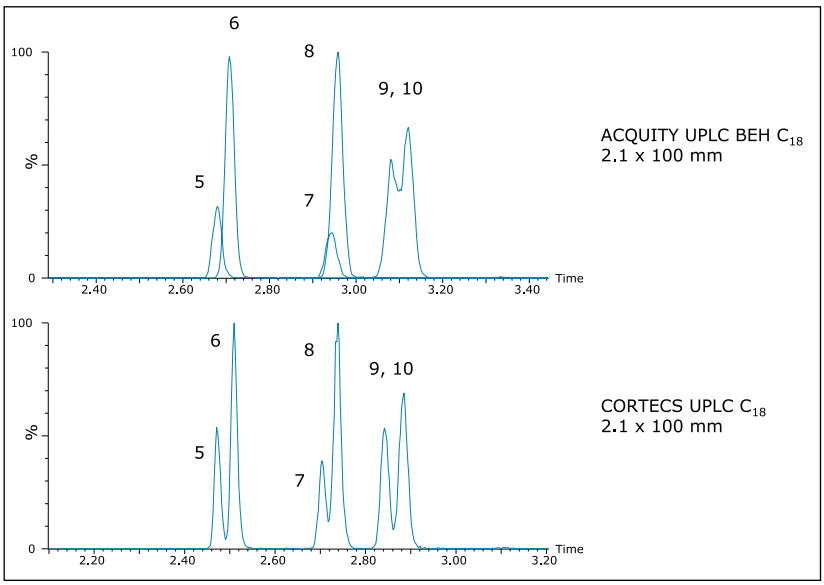

图2. 使用CORTECS UPLC C_{18}色谱柱和ACQUITY UPLC BEH C_{18}色谱柱得的峰5-10的色谱图对比。谱峰分配列于表1中。

回收率和基质效应

本应用纪要中提及的合成大麻素及其代谢物包含中性、酸性和碱性化合物。但无论它们具备何种官能团，Oasis HLB吸附剂都能够同时提取所有待测化合物及其代谢物。图3显示的是按前文实验部分所述的方程计算的回收率和基质效应。回收率范围为44%至102%，平均值为74%。基质效应范围为-49%（离子抑制）至32%（增强），但大多数小于20%。虽然图示中的回收率相当低，但针对该检测目的，其灵敏度已足够。

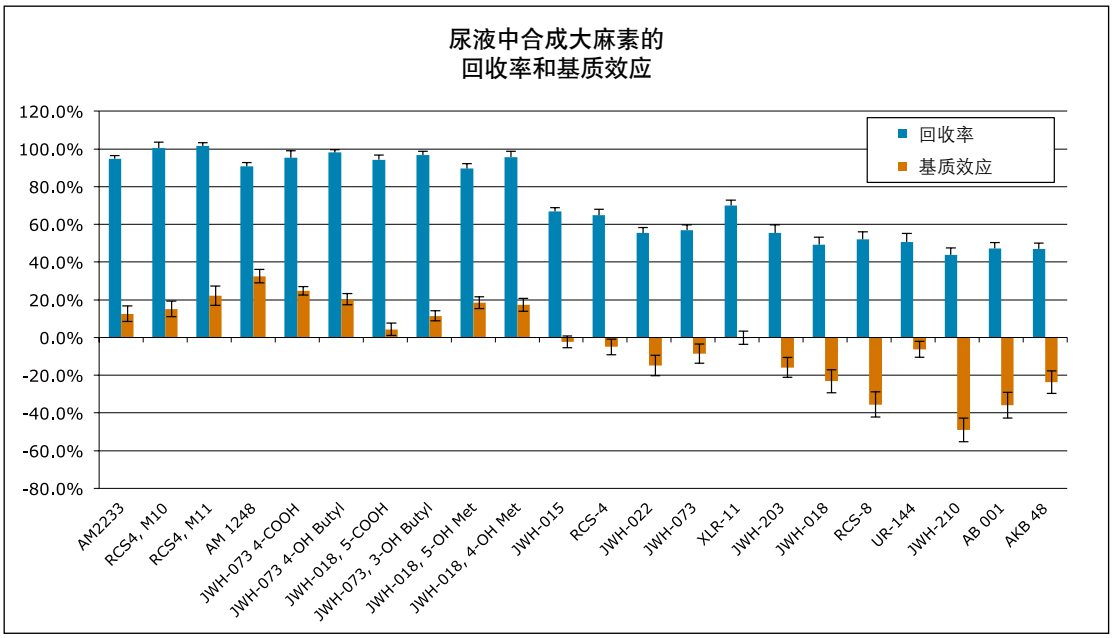

图3. 采用Oasis HLB µElution板从尿液中提取的合成大麻素化合物的回收率和基质效应。图中的条柱和误差条柱分别表示平均值和标准偏差（N=4）。

线性、准确度、精密度和灵敏度

为了评估分析方法的线性和灵敏度，我们对所有组分建立了浓度范围为0.5至100.0 ng/mL的校准曲线。图4显示了酸性、中性和碱性化合物（分别为JWH-073 4-COOH代谢物、JWH-018 5-OH代谢物和AM2233）的代表性校准曲线。这3个示例曲线证明Oasis HLB µElution板可用于提取多种合成大麻素及其代谢物，并且具有较高的准确度。这些化合物的评估非常重要，因为已有证据显示JWH-018和JWH-073的末端羟基化代谢物和羧酸代谢物在人体尿液中大量存在[3,4]。我们还对浓度为2.5、7.5和75 ng/mL的质量控制样品（N=4）进行了提取和分析。表2中汇总了所有化合物的校准曲线R^2值和QC总结数据。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（2.5 ng/mL）的准确度范围为90%至111%，平均值为101%。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15%范围之内。并且，大多数分析物的RSD%低于10%，最大不超过15%，表现出良好的分析精度。各浓度水平（低、中和高）下的评估结果显示平均准确度介于92%至107%之间。部分分析物的检测限低至0.1 ng/mL，最大不超过2 ng/mL。这足以满足对检测结果的要求，因为这些化合物通常仅在ng/mL级别被检测出来。

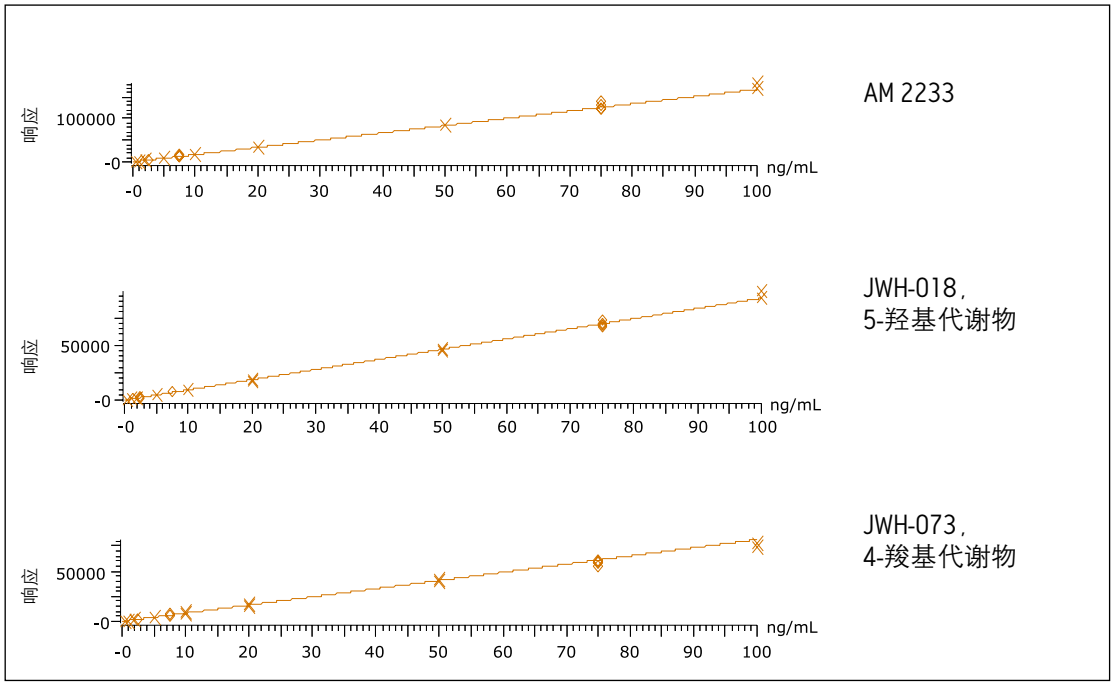

图4. 分别代表酸性、中性和碱性化合物的AM2233、JWH-018 5-OH代谢物和JWH-073 4-COOH代谢物校准曲线示例。

		QC浓度（ng/mL）						
		2.5		7.5		75		
	R^2	准确度%	RSD%	准确度%	RSD%	准确度%	RSD%	平均值
AM2233	0.996	95.25	7.59	109.78	8.45	102.48	6.52	**102.50**
RCS4, M10	0.998	99.00	3.65	103.13	1.97	96.63	4.33	**99.58**
RCS4, M11	0.999	102.30	2.40	103.53	0.68	96.43	4.11	**100.75**
AM 1248	0.987	111.43	3.79	110.70	1.73	98.98	2.97	**107.03**
JWH-0734-COOH	0.997	104.68	3.29	108.43	1.13	94.58	3.87	**102.56**
JWH-0734-羟丁基	0.999	105.40	2.53	110.30	0.99	93.78	2.59	**103.16**
JWH-018, 5-COOH	0.998	102.10	4.94	104.53	1.62	97.53	4.61	**101.38**
JWH-073, 3-羟丁基	0.999	103.63	3.89	108.00	0.35	98.95	2.47	**103.53**
JWH-018, 5-羟基代谢物	0.999	103.40	4.65	107.40	1.88	100.58	3.50	**103.79**
JWH-018, 4-羟基代谢物	0.999	103.63	2.11	108.60	1.15	100.70	2.75	**104.31**
JWH-015	0.994	96.65	3.39	99.53	1.81	93.23	3.60	**96.47**
RCS-4	0.992	98.05	2.27	97.88	2.24	91.85	3.02	**95.93**
JWH-022	0.993	100.80	3.69	93.50	5.63	93.28	5.68	**95.86**
JWH-073	0.982	95.48	7.19	88.30	4.51	103.23	6.01	**95.67**
XLR-11	0.987	105.20	8.37	103.55	1.96	90.85	2.87	**99.87**
JWH-203	0.990	97.35	5.39	85.65	2.85	93.65	3.00	**92.22**
JWH-018	0.996	98.48	2.1	86.60	9.38	95.95	6.25	**93.68**
RCS-8	0.992	98.58	4.09	93.48	10.85	96.23	6.38	**96.09**
UR-144	0.989	114.30	9.22	94.35	4.15	94.65	2.31	**101.10**
JWH-210	0.991	89.95	10.86	90.78	14.52	99.80	8.28	**93.51**
AB 001	0.988	100.28	4.02	86.38	9.66	97.45	5.96	**94.70**
AKB 48	0.985	104.28	3.58	87.55	5.79	94.35	5.07	**95.39**
	平均值	**101.37**		**99.18**		**96.60**		

表2. 所有化合物的R^2值和质量控制结果。下方的平均值表示所有化合物在特定浓度下的平均值。右侧的值表示各个化合物在整个QC浓度范围内的平均值。

结论

本实验中，从尿液中提取了22种合成大麻素药物及其代谢物组成的一组化合物，并进行UPLC-MS/MS分析。使用Oasis HLB µElution板可同时提取酸性、碱性和中性化合物，确保了对多种化合物及其代谢物的分析定量。CORTECS UPLC C_{18}色谱柱的分离效果能够使所有化合物在较短时间内完成分析，并且使关键的同分异构体达到基线分离。分离效率和峰宽均优于尺寸和粒径与之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学研究。根据实验结果可知，本提取方法性能卓越并具有通用性，可用于其它合成大麻素和代谢物的分析，是一种适用于新的相关化合物快速开发的重要方法。

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): p. 234-243.

2. Wohlfarth A and Weinmann W. Bioanalysis of new designer drugs. *Bioanalysis*, 2010. 2(5): p. 965-979.

3. Moran CL, *et al*. Quantitative Measurement of JWH-018 and JWH-073 Metabolites Excreted in Human Urine. *Analytical Chemistry*, 2011. 83(11): p. 4228-4236.

4. Sobolevsky T, Prasolov I, and Rodchenkov G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Science International*, 2010. 200(1): p. 141-147.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters，ACQUITY UPLC，UPLC，Xevo，Oasis，MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。Cortecs，Targetlynx和IntelliStart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9月 720004780ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
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
香港：852 - 2964 1800

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