

应用纪要

使用Oasis PRiME HLB简单、快速地从全血中萃取纯净的合成大麻素

Xin Zhang, Jonathan P. Danaceau, Erin E. Chambers

Waters Corporation

仅适用于法医毒理学应用。

摘要

本应用纪要介绍了一种新型反相SPE吸附剂 - Oasis PRiME，用这种吸附剂萃取合成大麻素及其代谢物的一致性良好、回收率高，而且基质效应低，还能基本消除全血样品中的内源性磷脂。即便不使用氘代内标，也能获得出色的定量结果。

优势

- 可省略活化和平衡步骤的简单SPE方案。
- 所有测试化合物均可实现高效回收和低基质效应。
- 用于全血中合成大麻素及其代谢物分析的一种快速通用萃取方法。
- 与蛋白沉淀法相比，磷脂去除率>95%。
- 针对各种合成大麻素及其代谢物的定量具有出色的准确度和精密度。

简介

Oasis PRiME HLB是一种新型反相固相萃取(SPE)吸附剂,能够简化和加速SPE方案流程,同时较其他样品前处理方法能够获得更纯净的萃取物。使用Oasis PRiME HLB,通过省略活化和平衡的3步(上样-清洗-洗脱)SPE方案流程,可成功从全血样品中萃取22种合成大麻素及其代谢物。整个化合物组均可获得出色的分析物回收率,并且能够将基质效应(ME)控制在适当范围内。所有化合物获得的结果具有良好的一致性,变异性较低。此外,Oasis PRiME HLB与蛋白沉淀法(PPT)相比,能够去除全血样品中超过95%的磷脂。本研究使用Waters Oasis PRiME HLB 30 mg板萃取了22种合成大麻素及其代谢物。所有化合物的标准曲线范围均为0.2~100 ng/mL。我们在整个标准曲线浓度范围内都获得了准确精密的质量控制样品定量结果。本研究通过分析这些不同类别的药物及其代谢物(包括中性分子、酸和碱),证明该方法能够应用于不同化学型,并且展示出此方法也适用于新开发的相关化合物(必要时可对该方法作出适当的调整)。

实验

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	CORTECS UPLC C ₁₈ , 90 Å, 1.6 µm, 2.1 × 100 mm (P/N 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%,并在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。表1列出了溶剂梯度。

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
0	0.6	70	30
2.0	0.6	50	50
3.0	0.6	50	50
7.0	0.6	10	90
7.2	0.6	70	30
8.5	0.6	70	30

表1.流动相梯度流动相A和流动相B的组成列于“方法”小节中。

质谱条件

质谱系统：	Xevo TQD
电离模式：	ESI正离子模式
采集模式：	MRM（请参阅表2和3获取离子通道信息）
毛细管电压：	1 kV
碰撞能量(eV)：	针对各化合物优化（请参阅表2）
锥孔电压(V)：	针对各化合物优化（请参阅表2）

数据管理

采用Waters MassLynx软件4.1版(SCN 855)采集和分析所有数据，并使用TargetLynx软件进行定量。使用IntelliStart优化MS条件。

材料

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）。所有其他化合物和代谢物均购自Cayman Chemical（美国密歇根州安阿伯）。

各种储备液(1 mg/mL)均采用甲醇、DMSO或50:50 DMSO/甲醇配制。所有化合物的混合储备液(10 µg/mL)均使用甲醇配制。工作溶液使用40%甲醇每日现配。

标准曲线样品和质量控制(QC)样品由不同浓度的工作标准品加入基质（全血）中配制而得。所有分析物的标准曲线浓度范围均为0.2~100 ng/mL。配制的质量控制样品在全血中的浓度为2.5、7.5和75 ng/mL。

本实验分析的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与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。

样品前处理

使用Oasis PRiME HLB 30 mg板提取样品。将0.1 mL的0.1 M硫酸锌/醋酸铵溶液加入0.1 mL全血样品中并涡旋混合5 s，使血细胞裂解。然后向所有样品中加入400 µL乙腈进行沉淀。将全部样品涡旋10 s并在7000 rcf速度下离心5 min。然后在上样前用1.2 mL水稀释上清液。样品直接上样至Oasis PRiME 30 mg板，无需活化和平衡。用500 µL的甲醇:水(25:75)清洗所有孔洞2次，用500 µL的乙腈/甲醇(90/10)洗脱2次。洗脱液在氮气条件下吹干，并用100 µL 30%的乙腈复溶。将5 µL样品注入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 = 所萃取样品的峰面积，B = 萃取基质样品（萃取后加入化合物）的峰面积。

基质效应按照以下公式计算：

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

存在基质时的峰面积是指在萃取之后加入化合物的所萃取基质样品的峰面积。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

色谱分析

实心核CORTECS颗粒与先进的色谱柱填充技术相结合，可达到出色的色谱性能。分析浓度为20 ng/mL的标准曲线样品获得的所有化合物的代表性色谱图如图1所示。使用CORTECS UPLC C₁₈色谱柱（90Å，1.6 μm；2.1 × 100 mm），我们在7.5 min内完成了对所有化合物的分析，总运行周期为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%基线处的所有峰宽小于3 s。

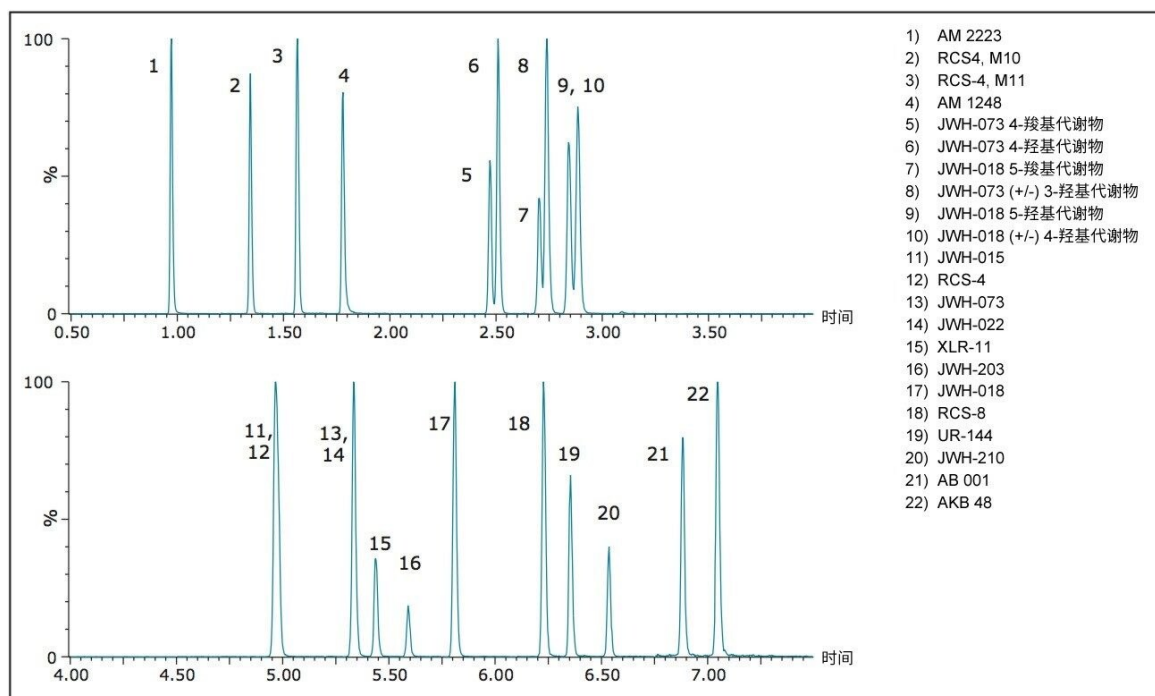


图1.22种合成大麻素及其代谢物的UPLC/MS/MS色谱图。

回收率和基质效应

本应用纪要中的合成大麻素及其代谢物包含中性、酸性和碱性化合物。使用Oasis PRiME HLB吸附剂能够同时萃取所有待测化合物及其代谢物，无论它们具有何种官能团。根据实验部分所述的公式计算回收率和基质效应(ME)，结果如图2所示。采用本文的萃取方案，所有化合物能够实现几乎完全回收，并且大多数分析物的基质效应极小。除一种化合物外，其他所有化合物的回收率均大于或等于80%，所有化合物的平均回收率为91%。所有化合物的回收率一致性好，平均%RSD为5%。整个化合物组的基质效应非常低。仅两种化合物的基质效应略微超过40%，其余化合物基质效应均低于25%。平均基质效应程度仅为17%。该组合成大麻素的高回收率和极低的基质效应表明：使用Oasis PRiME HLB通过简单的上样-清洗-洗脱方案流程在应用于其他相关化合物时应当能够获得类似的结果。

可去除磷脂

Oasis PRiME HLB的重要特征之一是能够获得较其他样品前处理方法更纯净的萃取物。达到这个效果的途径之一是去除内源性磷脂。图3显示了相同样品分别通过Oasis PRiME HLB萃取和蛋白沉淀法处理后所得磷脂分析对比色

谱图。与蛋白沉淀法(PPT)相比，Oasis PRiME HLB去除了超过95%的磷脂（图3），获得了更纯净的萃取物。这意味着基质效应将得到有效的降低、色谱柱的寿命会更长，并且质谱离子源的维护频率也会相应降低。

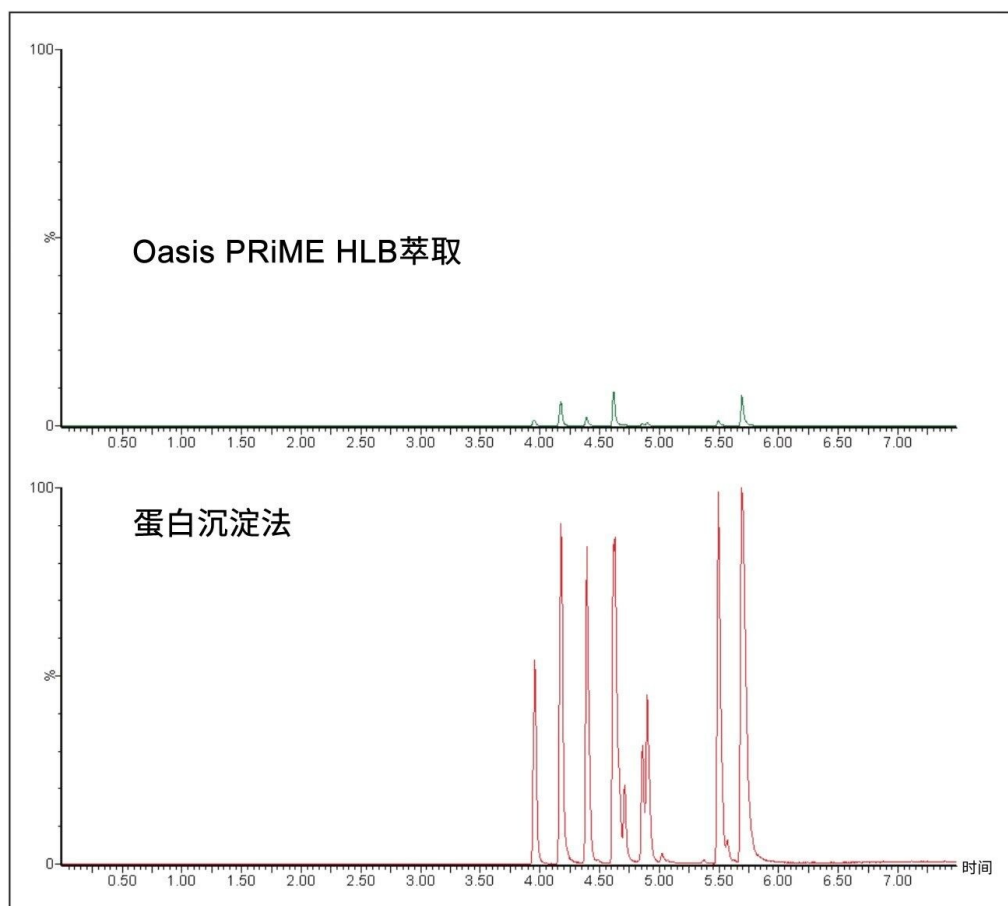


图3.Oasis PRiME HLB萃取与蛋白沉淀法的磷脂残留色谱图对比。比例一致。

标准曲线性能、准确度、精密度和灵敏度

为了评估分析方法的线性和分析灵敏度，我们为所有组分建立了浓度范围为0.2~100 ng/mL的标准曲线。此外，研究中还对浓度为2.5、7.5和75 ng/mL的质量控制样品(N=4)进行了萃取和分析。所有化合物的标准曲线 R^2 值和QC汇总数据列于表2中。实验在低、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95%~110%（化合物AM2233除外），平均值为102%。所有分析物（一个例外）的中、高浓度QC样品所得结果非常出色，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%，表明分析精密度非常好。各浓度水平（低、中和高）下的准确度评估结果显示，平均回收率介于

93%~104%之间。大多数分析物的定量限能达到0.1 ng/mL且不大于1 ng/mL。这些结果未使用氘代内标，再次证明了使用Oasis PRiME HLB的一致性。

		QC浓度(ng/mL)						
		2.5		7.5		75		
	R ²	%Acc	%RSD	%Acc	%RSD	%Acc	%RSD	平均值
AM2233	0.994	74.53	7.78	85.52	5.29	93.18	4.96	84.41
RCS4, M10	0.995	107.75	6.91	95.72	5.43	95.93	3.33	99.80
RCS4, M11	0.993	106.60	3.15	92.52	5.09	92.92	3.34	97.34
JWH-073, 4-COOH	0.998	108.00	2.44	96.00	5.43	107.07	3.20	103.69
JWH-073, 4-OH	0.996	106.90	5.01	95.88	3.76	94.12	2.15	98.97
JWH-018, 5COOH	0.996	107.58	5.98	97.98	2.32	99.30	2.65	101.62
JWH-073, 3-OH	0.996	110.00	6.22	94.43	2.24	91.95	2.38	98.79
JWH-018, 5-OH	0.996	103.17	9.39	83.55	4.01	101.77	3.90	96.16
JWH-018, 4-OH MET	0.996	106.40	5.45	85.15	2.87	104.70	4.17	98.75
JWH-015	0.998	108.85	6.19	99.57	3.49	100.95	2.48	103.12
RCS-4	0.998	109.80	4.06	94.63	3.47	94.62	5.25	99.68
JWH-022	0.999	107.32	3.23	97.27	4.95	96.90	5.65	100.50
JWH-073	0.999	111.28	3.11	97.38	4.96	99.62	7.47	102.76
XLR-11	0.998	101.32	8.07	98.90	4.12	103.78	5.71	101.33
JWH-203	0.999	101.60	4.34	99.72	6.55	101.24	7.13	100.85
JWH 018	0.998	102.30	9.31	99.08	8.86	102.00	7.62	101.13
RSC-8	0.995	95.92	8.61	93.02	9.10	100.98	11.55	96.64
UR-144	0.997	99.22	9.81	99.58	9.55	104.60	7.24	101.13
JWH-210	0.993	110.60	10.42	94.02	12.92	100.35	8.71	101.66
AB-001	0.995	107.02	7.82	92.54	11.04	101.98	6.22	100.51
AKB-48	0.974	97.07	11.76	89.95	13.76	107.63	13.50	98.21
	平均值	102.43		92.27		98.24		

表2.所有化合物的R²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。

编号	化合物	RT	分子 化学式	锥孔 电压	MRM 通道	碰撞 能量
1	AM2233	0.97	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O	48	459.2⇒98.05	50
				48	459.2⇒112.1	40
2	RCS-4, M10	1.34	C ₂₀ H ₂₁ NO ₃	40	324.2⇒121.0	36
				40	324.2⇒93.0	72
3	RCS-4, M11	1.57	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	42	322.2⇒121.0	32
				42	322.2⇒93.0	60
4	AM 1248	1.78	C ₂₆ H ₃₄ N ₂ O	62	391.4⇒135.1	42
				62	391.4⇒112.1	50
5	JWH-073 4-丁酸代谢物	2.47	C ₂₃ H ₁₉ NO ₃	52	358.2⇒155.1	32
				52	358.2⇒127.1	70
6	JWH-073 4-羟丁基代谢物	2.51	C ₂₃ H ₂₁ NO ₂	52	344.2⇒155.1	32
				52	344.2⇒127.1	70
7	JWH-018 5-戊酸代谢物	2.71	C ₂₄ H ₂₁ NO ₃	54	372.2⇒155.1	32
				54	372.2⇒127.1	72
8	JWH-073 (+/-) 3-羟丁基代谢物	2.74	C ₂₃ H ₂₁ NO ₂	54	344.2⇒155.1	36
				54	344.2⇒127.1	64
9	JWH-018 5-羟基戊基代谢物	2.84	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	50	358.2⇒155.1	24
				50	358.2⇒127.1	48
10	JWH-018 (+/-) 4-羟基戊基代谢物	2.89	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	50	358.2⇒155.1	34
				50	358.2⇒127.1	64
11	JWH-015	4.97	C ₂₃ H ₂₁ NO	48	328.2⇒155.1	32
				48	328.2⇒127.1	62
12	RCS-4	4.98	C ₂₁ H ₂₃ NO ₂	48	322.2⇒135.1	40
				48	322.2⇒92.0	68
14	JWH-022	5.34	C ₂₄ H ₂₁ NO	52	340.2⇒155.1	34
				52	340.2⇒127.1	60
13	JWH-073	5.34	C ₂₃ H ₂₁ NO	48	328.2⇒155.1	36
				48	328.2⇒127.1	56
15	XLR-11	5.44	C ₂₁ H ₂₈ FNO	52	330.3⇒125.1	34
				52	330.3⇒83.0	42
16	JWH-203	5.59	C ₂₁ H ₂₂ ClNO	44	340.2⇒188.1	32
				44	340.2⇒125.0	42
17	JWH-018	5.82	C ₂₄ H ₂₃ NO	50	342.2⇒155.1	34
				50	342.2⇒127.1	60
18	RCS-8	6.23	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂	44	376.3⇒121.1	36
				44	376.3⇒91.0	66
19	UR-144	6.36	C ₂₁ H ₂₉ NO	48	312.3⇒214.2	35
				48	312.3⇒125.1	34
20	JWH-210	6.54	C ₂₆ H ₂₇ NO	54	370.2⇒214.2	34
				54	370.2⇒183.1	36
21	AB 001	6.88	C ₂₄ H ₃₁ NO	62	350.3⇒135.1	44
				62	350.3⇒93.0	62
22	AKB 48	7.05	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O	36	366.3⇒135.1	28
				36	366.3⇒93.1	68

表3.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。
先列出的是定量通道，然后是确认通道。

母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 (eV)
496.40	184.40	35	30
520.40	184.40	35	30
522.40	184.40	35	30
524.40	184.40	35	30
704.40	184.40	35	30
758.40	184.40	35	30
760.40	184.40	35	30
784.40	184.40	35	30
786.40	184.40	35	30
806.40	184.40	35	30
808.40	184.40	35	30

表4. 磷脂的MS/MS条件。

结论

本应用纪要重点介绍了Oasis PRiME HLB的使用，这是一种新型反相SPE吸附剂，它能够在去除几乎所有内源性磷脂的同时简化和加速SPE方案流程。使用简单的上样-清洗-洗脱策略，无需任何吸附剂活化或平衡步骤，即可从全血样品中萃取一组22种合成大麻素。整个化合物组的平均萃取回收率为91%，平均基质效应仅为17%。所有化合物获得的结果具有良好的一致性，%RSD均值为5%。此外，相比蛋白沉淀法，本文的方法能够去除超过95%的磷脂。定量结果同样出色。即便不使用氘代内标，标准曲线仍具有良好线性，其中21种化合物（共22种）的 R^2 值为0.99。97%的QC结果处于目标值的15%范围内，并且所有%RSD均小于15%。综上，Oasis PRiME能够实现良好的一致性、高回收率和低基质效应，并能基本去除全血样品中的内源性磷脂。即便不使用氘代内标，也能获得出色的定量结果。

参考资料

1. Danaceau, J. P、Chambers, E. E.和Fountain, K. J, 使用Oasis HLB μ Elution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, 沃特世应用纪要, P/N 720004780ZH

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQD三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134608730>>

可在线购买

CORTECS UPLC C18色谱柱, 90 Å, 1.6 µm, 2.1 mm x 100 mm, 1根/包 <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186007095>>

96孔样品收集板, 2 mL方孔, 50个/包 <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002482>>

Oasis PRiME HLB 96孔板, 每孔装填30 mg吸附剂, 1个/包 <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186008054>>

720005417ZH, 2015年5月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号