

唾液中的合成大麻素类成分

应用简报

法证与毒理学

作者

Cynthia Coulter, Margaux Garnier 和
Christine Moore
毒理学研究与开发
Immunoanalysis 公司,
829 Towne Center Drive,
Pomona, California 91767
美国

前言

2011 年，“合成大麻素类”或“香料”化合物中，有五种在美国被禁用。它们是：

- 1-戊基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-018)
- 1-丁基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-073)
- 1-[2-(4-吗啉)乙基]-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-200)
- 5-(1,1-二甲基庚基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚 (CP-47,497)
- 5-(1,1-二甲基辛基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚(大麻环己醇；CP-47,497 C8 同系物)

服用者描述这些药物具有类似大麻的作用，并且这些化合物中有一些与大麻受体有很强的结合作用。11-羟基- Δ^8 -四氢大麻酚的(-)-1,1-二甲基庚基取代类似物(1,1-二甲基庚基-11-羟基四氢大麻酚)，代号 HU-210，据报道它曾在 2009 年美国海关与边境保护局缉获的“香料黄金”、“香料白银”和“香料钻石”中被发现。HU-210 的效力被认为超过 Δ^9 -四氢大麻酚 (Δ^9 -THC) 100 倍，并且作为一种大麻类似物已被列入控制物质。JWH-250 也是我们经常遇到的品种，故我们也把它列入研究范围。



Agilent Technologies

作为一种在路边和工作场所进行药物检测的样本，唾液检测正日益流行。它容易采集，不具有侵害性，并且可获得近期用药的信息。本文工作中使用了 Quantisal 装置来收集唾液样本，并且描述了“香料”成分的检测过程。

样本收集装置、试剂和标准品

收集唾液样本的 Quantisal 装置包括了一个可以放在嘴里的棉质采集垫。当采集到 1 mL 唾液 ($\pm 10\%$) 时，吸收体积足量指示剂会变为蓝色，然后将采集垫放入缓冲液 (3 mL) 中，使可用于分析的样本总体积为 4 mL (3 mL 缓冲液 + 1 mL 唾液)。用于检测的药物浓度也会相应改变。

固相萃取小柱 (Bond Elut Plexa) 和液相色谱柱 (ZORBAX RRHT) 为安捷伦科技公司产品。JWH-018、JWH-073、JWH-200、JWH-250、HU-210、CP-47497 和 CP-47497 C8 同系物，以及氘代化合物 d9-JWH-018 和 d7-JWH-073 标准品购自 Cayman Chemicals 公司。

校准溶液与质控样品的制备

将氘代内标 (d9-JWH-018 和 d7-JWH-073) 和未标记的药物标准品制备为浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甲醇溶液。用甲醇稀释适量贮备液到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度，作为工作溶液。不用时，溶液于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 贮存。向不含药物的合成唾液中加入不同浓度的化合物，制成质控样品。每批测试样本包括不含药物的阴性样品、4 ng/mL 和 40ng/mL 浓度的阳性质控样品。

样品制备

7 个用唾液制备的校准标准溶液中，各分析物的浓度依次为 0.5、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL，加入氘代内标 (10 ng/mL)。

使用 Agilent Bond Elut Plexa (30 mg/1 mL; 部件号 12109301) 固相萃取小柱。

1. 活化：甲醇 (0.5 mL)；0.1 M 乙酸溶液 (0.1 mL)
2. 取校准工作溶液、质控样品和样品各 1 mL，分别加入乙酸溶液 (0.1 M; pH 4, 1 mL)

3. 上样
4. 柱淋洗：去离子水:冰乙酸 (80:20; 1 mL)；去离子水:甲醇 (40:60; 1 mL)
5. 柱干燥 (5 min)
6. 洗脱酸性/中性化合物：己烷:冰乙酸 (98:2; 2 mL)
7. 干燥小柱时蒸干提取物 (7 min)
8. 洗脱碱性组分到相应的试管中：乙酸乙酯:氢氧化铵溶液 (98:2; 2 mL)
9. $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下氮吹蒸发至干。
10. 甲醇复溶样品残渣 (50 μL)；转移至自动进样瓶中；旋紧瓶盖
11. 采用 LC-MS/MS 进行分析

液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS)

安捷伦科技 1200 系列液相色谱泵与 Agilent 6430 三重四级杆 LC/MS 系统联用，采用电喷雾离子化模式 (ESI)，根据化合物的性质选择正离子或负离子检测。

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT Extend C18, (2.1 \times 50 mm, 1.8 μm , 部件号 727700-902)
柱温	$60\text{ }^\circ\text{C}$
进样体积	5 μL
流动相	溶剂 A: 0.2% 乙酸溶液和溶剂 B: 乙腈 时间 0 min: 95% A; 5% B; 5 min: 100% B; 7 min: 5% B 运行时间 9.2 min; 后运行时间 3 min 流速 0.5 mL/min
氮气温度	$350\text{ }^\circ\text{C}$
干燥气流量	10 L/min
雾化器压力	55 psi
毛细管电压	+4000 V 正离子模式 -4000 V 负离子模式

为每种药物选择并优化了两个离子对。表 1 列出了转换离子对、母离子 (M+1; M-1) 的优化碎裂电压和子离子碎片的碰撞能量。每一个序列分析要求其定量离子和定性离子的比率应在 ± 20% 以内，以满足阳性结果的判断标准。

表 1. 多反应监测 (MRM) transitions; 优化的碎裂电压; 在 10 µg/mL 浓度时定量分析“香料”化合物的允许离子转换范围

化合物	离子对	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)	极性	定量和定性离子对比率 (范围)
<i>d9</i> -JWH-018	<u>351.3 > 223.4</u>	140	20	正离子	n/a
JWH-018	<u>342.2 > 155.1</u>	120	20	正离子	16–24
	342.2 > 214.2	120	20		
JWH-250	<u>336.3 > 200.2</u>	120	12	正离子	69–104
	336.3 > 188.2	120	20		
<i>d7</i> -JWH-073	<u>335.3 > 207.2</u>	120	20	正离子	n/a
JWH-073	<u>328.2 > 155.1</u>	120	20	正离子	60–90
	328.2 > 127.1	120	35		
JWH-200	<u>385.3 > 155.1</u>	140	20	正离子	54–81
	385.3 > 114.2	140	25		
CP 47497 C8	<u>331.3 > 313.3</u>	160	25	阴离子	70–104
	331.3 > 259.3	160	35		
CP 47497	<u>317.3 > 299.2</u>	160	20	阴离子	75–113
	317.3 > 245.2	160	30		
HU-210	<u>385.3 > 367.4</u>	120	30	阴离子	13–20
	385.3 > 281.3	120	45		

标下划线的离子对用于定量；n/a= 不可用于内标

图1所示10 ng/mL浓度时化合物一级转换离子的色谱图；各化合物一级和二级离子对的比率也是在10 ng/mL浓度时测定的。

采集垫的回收率

制备各化合物添加浓度均为4和40 ng/mL的六个合成唾液样品。将采集垫置于上述样品液中收集1 mL (±10%)，这可以由植入采集器的蓝色体积足量指示剂来判断。然后将采集垫转移到Quantisal缓冲液中，加盖并放置过夜，模拟样品运输到实验室的过程。第二天取部分样品进行分析。采集垫的回收量与绝对浓度(100%)进行对比，绝对浓度系将药物加到缓冲液中，不加入采集垫室温放置过夜，然后提取和分析得到。

各化合物的采集垫提取百分回收率在4和40 ng/mL (n = 6)，两个浓度时均大于60%。最高的是4 ng/mL时HU-210的回收率，达到86%；最低的是40 ng/mL时JWH-073的回收率，只有61%。两个浓度水平的回收率基本上一致(表2)。

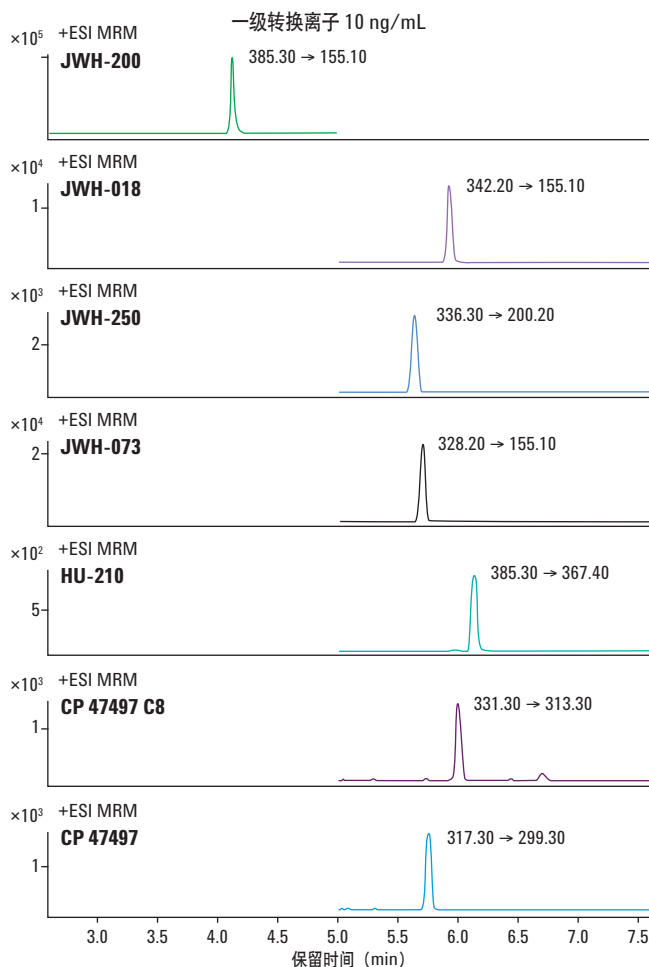


图1. 10 ng/mL浓度时的一级转换离子

表2. 方法学验证数据

	JWH-018	JWH-073	JWH-200	JWH-250	CP 47497	CP 47497 C8	HU-210
LOQ (ng/mL)	0.5	0.5	0.5	2	0.5	2	5
日内误差							
4 ng/mL	3.9%	3.6%	5.0%	3.4%	4.9%	3.9%	8.6%
40 ng/mL	2.2%	2.1%	6.0%	2.0%	4.1%	4.3%	5.6%
日间误差							
4 ng/mL	8.8%	9.6%	6.2%	11%	7.7%	11%	10%
40 ng/mL	8.5%	7.9%	6.2%	11%	10%	11%	12%
采集垫回收率							
4 ng/mL	65.5%	67.4%	85.0%	66.5%	77.7%	76.0%	86.4%
40 ng/mL	70.6%	61.4%	81.4%	75.1%	71.3%	78.2%	75.7%
基质效应	-55%	-45%	-55%	-73%	-64%	-55%	-49%
处理效率	40%	51%	56%	24%	38%	45%	51%

数据分析

使用浓度范围 0.5–100 ng/mL 的线性回归分析绘制校准曲线。采用 Agilent MSD 软件计算每个浓度点中目标分析物与内标的峰面积比。数据拟合成一条线性最小二乘回归曲线，曲线未强制通过原点，且等权重。每种化合物监测了两种转换离子对用于确证分析；内标监测了一种离子对。定性离子对的比率要求在使用可接受的已知校准标准品所确定比率的 $\pm 20\%$ 之内。

线性和灵敏度

将溶液连续稀释到一个化合物可准确定量的最低浓度点获得方法的定量限 (LOQ)，即色谱峰形、保留时间 (校准标准品的 2%) 和定性离子对比率 ($\pm 20\%$) 与 10 ng/mL 校准标准品测定结果比较是可以接受的。LOQ 的定量值必须在目标浓度的 $\pm 20\%$ 以内。JWH-018、JWH-073、JWH-200 和 CP 47497 的定量限是 0.5 ng/mL；CP 47497 C8 和 JWH-250 的是 2 ng/mL；HU-210 的是 5 ng/mL (图 2)。所有化合物从 LOQ 到 100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.99$; $n = 5$)。

基质效应

制备一个浓度为 10 ng/mL 的未经提取的药物标准品溶液，另外制备不含药物的基质提取物和阴性质控样品 (提取物中只含有内标)。唾液中各化合物回收率的测定如下：首先测得浓度为 10 ng/mL 提取物 ($n=3$) 的响应 $\{R_{ES}\}$ 。然后提取唾液并向浓度为 10 ng/mL 的后提取物中加入药物 ($n=3$) $\{R_{PES}\}$ 。通过方程式 $(R_{ES} / R_{PES}) \times 100$ 计算百分回收率。

基质效应 (离子抑制) 导致的响应下降通过评价未经提取的 10 ng/mL 纯药物标准品 ($n=3$) 峰面积响应来测定 $\{R_{NES}\}$ 。该未经提取溶液作为提取样本在相同的复溶溶剂中被分析。百分基质效应可通过公式 $[(R_{PES} / R_{NES}) - 1] \times 100$ 计算。总处理效率可通过公式 $(R_{ES} / R_{NES}) \times 100$ 计算。

可见离子抑制效应非常明显，但是可以通过对样品进行固相萃取和使用氘代内标来限制。

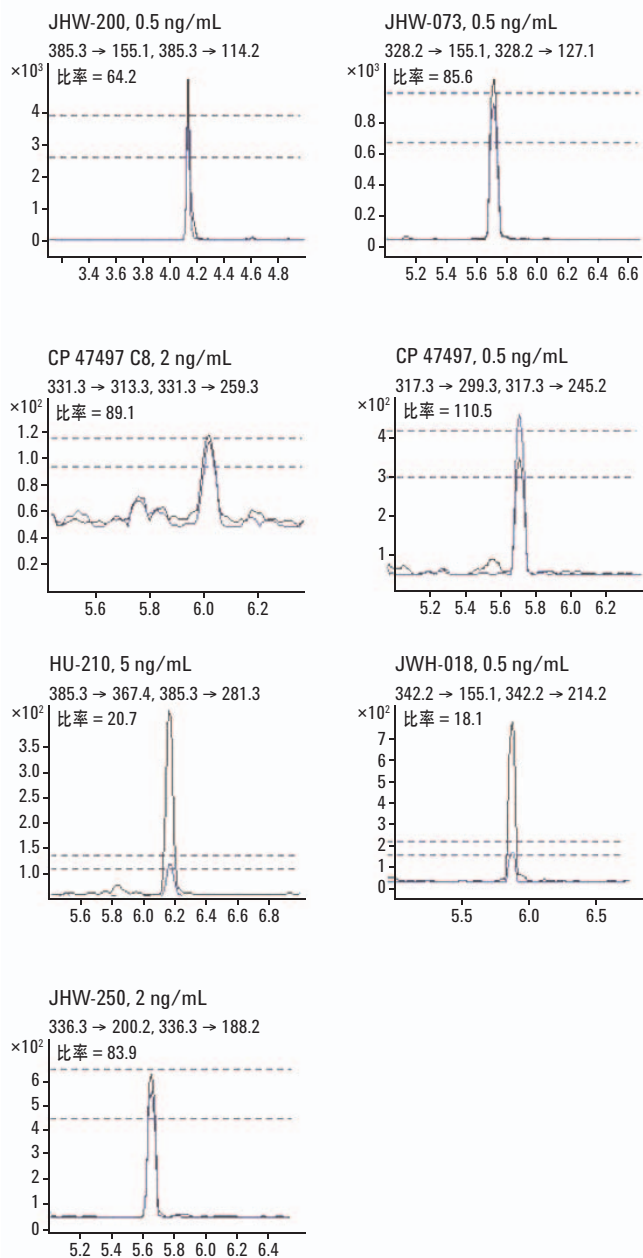


图 2. $\pm 20\%$ 比率的 LOQ 浓度

选择性

使用 Quantisal 装置采集了五个不含药物的唾液样本。各样本取适量按照上述步骤进行提取和分析，以考察内源性化合物或者运输用缓冲液带来的潜在干扰。

另外，在剩余的上述不含药物的唾液中加入常见的滥用药物至浓度为 2000 ng/mL，按照上述步骤提取、分析。

THC	阿米替林
THC-COOH	环苯扎林
11-OH-THC	丙咪嗪
大麻酚	度硫平
大麻二酚	多塞平
可卡因	氟西汀
苯甲酰爱康宁	舍曲林
去甲古柯碱	曲米帕明
可卡乙碱	普罗替林
可待因	氯丙嗪
吗啡	氯米帕明
6-AM	去甲替林
6-AC	帕罗西汀
羟考酮	地昔帕明
羟吗啡酮	溴西洋
氢可酮	阿普唑仑
氢吗啡酮	氯硝西洋
苯丙胺	劳拉西洋
去氧麻黄碱	奥沙西洋
MDMA	地西洋
MDA	咪达唑仑
MDEA	氟西洋
芬特明	氟硝西洋
芬太尼	去甲西洋
苯环利啉	三唑仑
曲马多	替马西洋
卡立普多	硝西洋
甲丙氨酯	氯氮卓
西酞普兰	美沙酮
文拉法辛	

不含药物提取物中未发现内源性干扰；也未发现来自常见药物的外源性干扰，如可在高浓度下被分析的 THC 及其主要代谢物。

误差

制备同时加标所有化合物的浓度为 4 ng/mL 和 40 ng/mL 的样品。每个浓度的样品连续五天 (n=6; 日内不精密度) 按照上述步骤操作 (n=30; 日间不精密度) 进行分析。两个浓度的所有药物检测日内误差小于 9%，日间误差小于 12% (表 2)。

真实样品

样本采自两名当地志愿者，他们曾购买了这些当时在美国仍合法的化合物。受试对象 1 吸食了“Blueberry Posh”，受试对象 2 吸食了“黑曼巴”。使用 Quantisal 唾液收集装置，采集吸食前，以及吸食后不同时间点的样本。采集受试对象 1 吸食后 20 min、40 min、1 h、2 h 和 12 h 的样本；采集受试对象 2 吸食后 20 min、40 min、1 h、5 h 和 12 h 的样本。这些样本在采集后的第二天进行分析，然后剩余样本在 4 °C 贮存一个月后用另一种方法重新分析。一年后，采用相同的程序再测定一遍。当然，现在已经没有可能获得真实样本了，因为现在拥有这些化合物已属非法行为。

两个制备物中检测到的主要活性的化合物是 JWH-018。4 °C 贮存一个月后对样本重新分析，发现目标化合物极其稳定，两次检测浓度几乎完全相同。4 °C 贮存一年后对样本重新分析，发现受试对象 1 的检测结果与一年前基本相同；受试对象 2 的样品检测后发现，那些原来浓度就很低的化合物，现在更低了 (见图 3)。

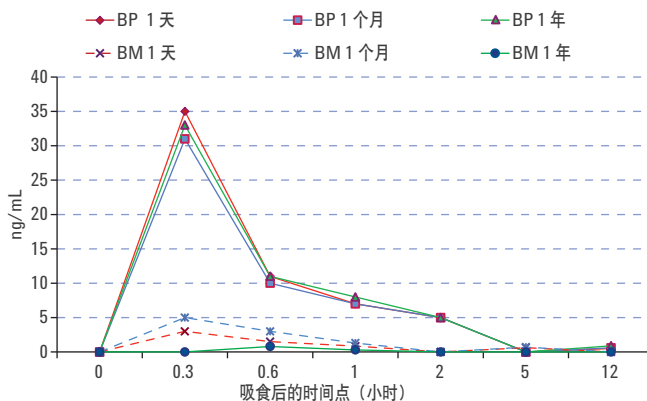


图 3. 4 °C 贮存的真实样本的稳定性

图 4 为提取离子色谱图，显示了吸食 40 min 后样本（受试对象 1）的离子对和围绕定性离子对强度 $\pm 20\%$ 的可接受范围；JWH-018 的浓度是 11 ng/mL。

结论

本文首次报道了唾液中多种“香料”化合物的同时测定。分析步骤适用于采用 Quantisal 装置收集的含有合成大麻素类成分样本的分析，样本中两种浓度采集垫的提取回收率均大于 60%。跟踪两种不同品牌草本产品的单次吸食过程，发现在单次吸食 20 min 后唾液中检测到最高浓度的 JWH-018。即使一年之后，单次吸食“Blueberry Posh” 12 h 后的唾液样本中仍可检测到 JWH-018。

更多信息

这些数据代表典型结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

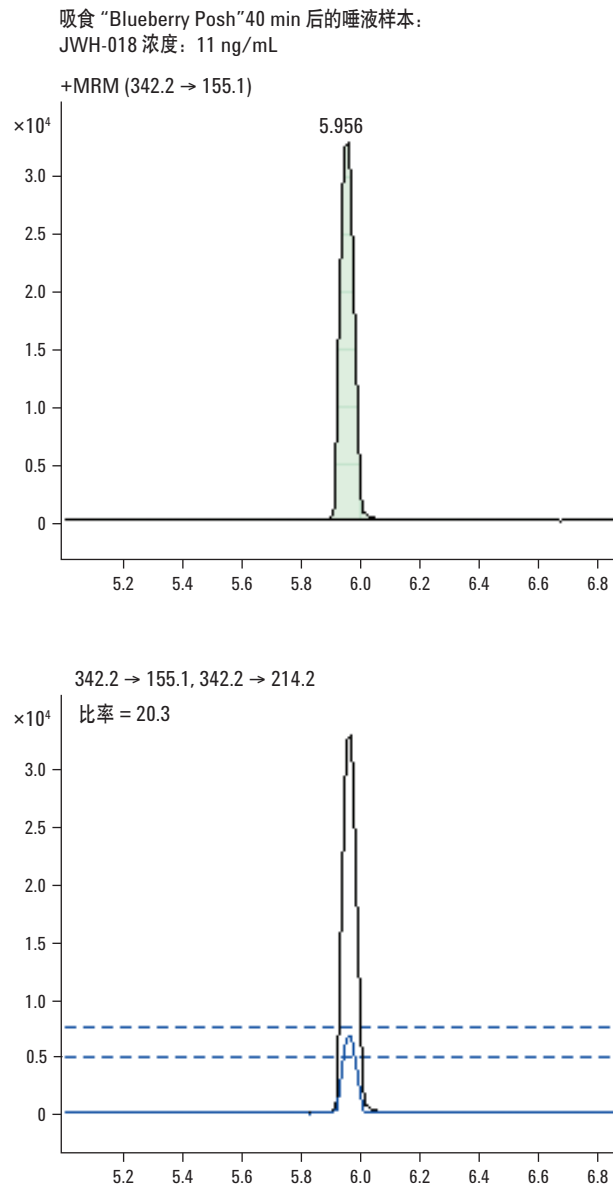


图 4. 受试对象 1 吸食 40 min 后的唾液样本；JWH-018 = 11 ng/mL

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012年1月17日，中国印刷
5990-9679CHCN



Agilent Technologies