

Анализ амфетаминов в моче методом ЖХ-МС-МС с использованием сорбента Agilent Bond Elut Plexa PCX и колонки Agilent Poroshell 120 в соответствии с предписаниями SAMHSA

Методическая информация

Судебно-медицинская токсикологическая экспертиза

Авторы

Ирина Диоумаева (Irina Dioumaeva),
Джон М. Хьюз (John M. Hughes)
Agilent Technologies, Inc.

Резюме

В соответствии с новыми руководствами Управления службы лечения наркотической зависимости и психических расстройств (SAMHSA) в США, действующими с октября 2010 г., разрешается применять методы ЖХ-МС-МС для подтверждения результатов первоначальных испытаний лекарственных средств [1]. Поскольку для методов ЖХ-МС-МС обычно не требуется включение этапа дериватизации, зачастую они менее сложны по сравнению с используемыми ранее методами ГХ-МС. Представляем метод анализа пяти амфетаминов, который отвечает последним требованиям SAMHSA в отношении линейности, предела обнаружения (ПО), точности и прецизионности, а также определения эффекта матрицы, степени извлечения и общей эффективности процесса. Это один из шести упрощенных методов, которые охватывают все классы контролируемых SAMHSA лекарственных средств и в которых используется первоклассная продукция Agilent, в том числе комбинированный полимерный сорбент для ТФЭ Agilent Bond Elut Plexa PCX, колонки для ЖХ с 2,7 мкм поверхностно-пористыми частицами Agilent Poroshell 120 EC-C18, система ЖХ Agilent 1200 Infinity и трехквadrupольный ЖХ-МС Agilent 6460 с усовершенствованным электрораспылителем AJST (Jet Stream, с фокусировкой температурного градиента).



Agilent Technologies

Введение

Амфетамины — это психостимулирующие вещества, входящие в группу симпатомиметических аминов, которые имитируют действие эндогенных нейромедиаторов, таких как эпинефрин (адреналин), норэпинефрин (норадреналин) и дофамин. Амфетамины обнаружены в листьях *Хвойника китайского* (например, эфедрин) и впервые были синтезированы в конце XIX столетия. Это производные фенилэтиламина, у которых, наряду с другими замещениями, к альфа-атому углерода присоединена метильная группа (рис. 1). Значительная часть амфетаминов выводится с мочой без изменений. Посредством деметилирования более сложные производные амфетамина в процессе обмена веществ превращаются в соединения с более простой структурой, например метамфетамин превращается в амфетамин, а MDMA в MDA [2]. В соответствии с руководствами SAMHSA от 2011 г. для подтверждения присутствия пяти амфетаминов — амфетамина, метамфетамина и производных (МДА, МДМА и МДЭА) — необходимо проводить скрининг. Метод подтверждения должен иметь возможность отличить эти вещества от соединений со сходной структурой, являющихся потенциальными мешающими компонентами, к которым относятся эфедрин, псевдоэфедрин, фентермин и фенилпропаноламин (ППА или норэфедрин).

В методах ГХ-МС, традиционно используемых для обнаружения амфетаминов, обычно проводилась предварительная обработка перйодатом для окисления гидроксифенилэтиламинов эфедрина и псевдоэфедрина, чтобы таким образом исключить возможные помехи, создаваемые этими соединениями. Мы исключили этот этап и предложили вместо него надежное хроматографическое разделение всех исследуемых анализов в соответствии с последними руководствами SAMHSA.

По новым требованиям SAMHSA предельная концентрация для подтверждения присутствия всех амфетаминов составляет 250 нг/мл, а предел обнаружения на уровне 10 % предельной концентрации составляет 25 нг/мл [1]. Поскольку в некоторых образцах мочи могут ожидать высокие концентрации

амфетаминов, для всех методов Agilent SAMHSA вместо колонки с внутренним диаметром 2 мм было решено использовать более вместительную колонку Agilent Poroshell 120 с внутренним диаметром 3 мм. За счет частиц размером 2,7 мкм с пористой поверхностью колонки Poroshell 120 имеют ту же эффективность, что и колонки для ВЭЖХ сверхвысокого давления с размером частиц менее 2 мкм, но с обратным давлением на 40 % ниже. Таким образом, даже при использовании систем ЖХ с давлением 400 бар эти колонки позволяют повысить разрешение и сократить время анализа и повторного уравнивания путем увеличения скорости потока.

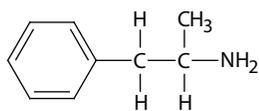
Простой метод экстракции, описанный ниже, позволяет получить воспроизводимую высокую степень извлечения амфетаминов благодаря уникальным характеристикам сорбентов Agilent Bond Elut Plexa. В отличие от других полимерных сорбентов Plexa обладает гидроксифирированной поверхностью, не содержащей амидов, которая исключает связывание с белками, за счет чего достигаются минимальная ионная супрессия и максимальная чувствительность. Низкая дисперсность и отсутствие пылевых частиц, способных вызвать закупорку, обеспечивают высокую скорость потока и хорошую воспроизводимость.

Поскольку в представленном методе объем вводимой пробы составляет всего 2 мкл и предварительное концентрирование образца не требуется, он демонстрирует прекрасное соотношение «сигнал — шум» (С/Ш) (> 400 : 1 при скорости потока 25 нг/мл, на уровне 10 % от предельной концентрации, установленной SAMHSA для подтверждения присутствия амфетаминов), за счет повышенной чувствительности трехкврупольного ЖХ-МС Agilent 6460 с электрораспылителем AJST.

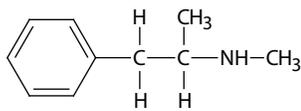
В предыдущих методиках от Agilent использовался трехкврупольный ЖХ-МС Agilent 6410 и другие изделия и процедуры для ТФЭ и ЖХ [3,4].

Экспериментальная часть

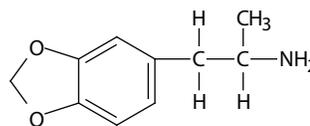
Аналиты



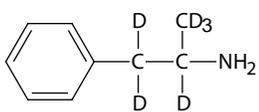
Амфетамин
Log P 1,79 pKa 9,8



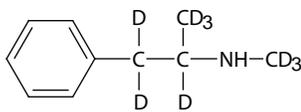
Метамфетамин
Log P 1,94 pKa 9,5



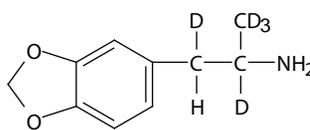
МДА
Log P 1,67 pKa 9,7



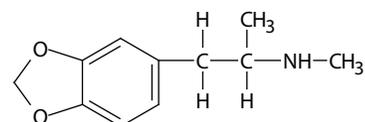
Амфетамин-D₆



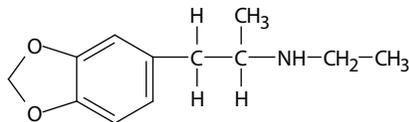
Метамфетамин-D₉



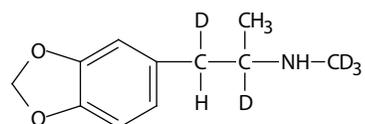
МДА-D₅



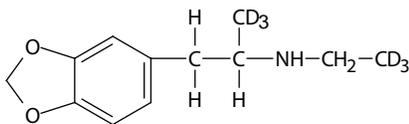
МДМА
Log P 2,05 pKa 9,9



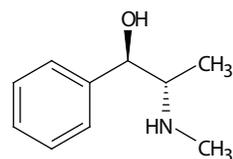
МДЭА
Log P 2,34 pKa 9,9



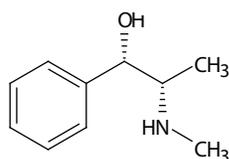
МДМА-D₅



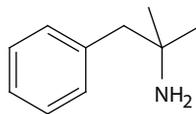
МДЭА-D₆



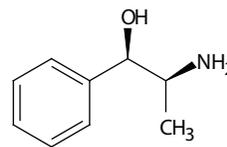
Эфедрин
Log P 1,13 pKa 9,6



Псевдоэфедрин
Log P 0,89/1,1 pKa 9,9



Фентермин
Log P 2,16 pKa 10,1



Фенилпропаноламин
Log P 0,81 pKa 9,4

Рис. 1. Амфетамины и мешающие компоненты — аналиты и их структурные формулы.

Стандарты лекарственных средств были приобретены в компании Cerilliant Corporation в виде растворов в этаноле с концентрациями 1 мг/мл (амфетамин, метамфетамин и производные (МДА, МДМА, МДЭА), эфедрин, псевдоэфедрин, фентермин и фенилпропаноламин) и 100 мг/мл (амфетамин-D₆, метамфетамин-D₉, МДА-D₅, MDMA-D₅ и MDEA-D₆).

Материалы и оборудование

ТФЭ:

- патроны Agilent Bond Elut Plexa PCX, 30 мг, 3 мл (кат. № 12108303);
- вакуумный коллектор Agilent VacElut 20 (кат. № 12234100);
- запорный кран Agilent (кат. № 12234520);
- флаконы для автосамплера Agilent на 2 мл (кат. № 5182-0716);
- навинчивающиеся крышки к флаконам для автосамплера Agilent (кат. № 5182-0717).

ЖХ:

- колонка Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 мм, 2,7 мкм (кат. № 699975-302);
- система ЖХ Agilent 1260 Infinity (микродегазатор G1379B, бинарный насос 1312B в конфигурации с малым мертвым объемом, автосамплер G1367E и термостат G1330B).

МС:

- система трехкврупольного ЖХ-МС Agilent 6460A с ионизацией электрораспылителем AJST.

Пробоподготовка

Предварительная обработка

Введите в образец мочи объемом 0,5 мл внутренние стандарты при концентрации каждого 500 нг/мл; рекомендуется использовать стеклянные пробирки 12 × 75 мм. Добавьте 1 мл 2% муравьиной кислоты, перемешайте на вортексе; если раствор мутный, центрифугируйте.

Экстракция

1. Подготовка колонки Bond Elut Plexa PCX с помощью 0,5 мл метанола: пропитать и дать стечь каплями.
2. Загрузить образец/надосадочную жидкость.
3. Промывка 1: 1 мл 2 % муравьиной кислоты.
4. Промывка 2: 1 мл метанола.
5. Просушить 5–10 минут в вакууме (255–380 мм рт. ст.).
6. Элюировать 1 мл свежеприготовленной смеси этилацетата, метанола и гидроксида аммония (50 : 50 : 20). Дать элюату стечь каплями во флакон для сбора элюата, затем установить низкий вакуум (50–75 мм рт. ст.).
7. Выпарить в потоке азота до объема 0,2 мл при температуре ≤ 37 °С.

8. Добавить 100 мкл 0,025 Н раствора соляной кислоты в метаноле, перемешайте на вортексе.
9. Выпарить досуха.
10. Растворить сухой остаток в 0,5 мл исходной подвижной фазы (15 % метанола, 85 % воды, 0,1 % муравьиной кислоты).

ЖХ-МС-МС

Условия ЖХ

Подвижная фаза А	0,1 % муравьиной кислоты в воде	
Подвижная фаза В	0,1 % муравьиной кислоты в метаноле	
Скорость потока	0,8 мл/мин	
Градиент	Время (мин)	% В
	0,0	15
	1,5	15
	3,5	30
	3,6	90
	6,6	90
	6,7	15
Время остановки	6,8 мин	
Время восстановления колонки после анализа	2 мин	
Максимальное давление насоса	400 бар	
Объем вводимой пробы	2 мкл	
Ввод пробы с промывкой иглы		
Промывка иглы	Через порт для промывки, раствором метанола и воды (75 : 25) в течение 10 с	

Наложение вводов пробы отключено

Автоматическое уменьшение мертвого объема не установлено

Условия МС

Параметры источника ионизации электрораспылителя

Режим ионизации	Положительный
Напряжение на входе в капилляр	4000 В
Скорость потока осушающего газа	10 л/мин
Температура осушающего газа	350 °С
Газ, подаваемый в распылитель	35 psi
Скорость потока газа периферийного слоя	12 л/мин
Температура газа периферийного слоя	400 °С
Напряжение на сопле распылителя	0 В

Параметры МС

Тип сканирования	MRM
Макрос, запускаемый перед анализом	SCP_MS DiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
Временные сегменты	#1: 0,6 мин (для отделения помех) или 1,2 мин (только для пяти амфетаминов) — кран отвода в МС
Напряжение умножителя (Delta EMV) (+)	200 В

Результаты и обсуждение

В кислой среде аминогруппа амфетаминов протонировалась, и аналиты эффективно удерживались на полимерном сорбенте Bond Elut Plexa PCX за счет сочетания гидрофобного взаимодействия и сильного катионного обмена.

Благодаря промывке 100 %-ным метанолом было исключено влияние большинства компонентов матрицы без потерь аналита сорбентом. В органический растворитель добавили сильное основное соединение, чтобы разрушить ионное взаимодействие между амфетаминами и сильным катионообменником. Степень извлечения оптимизировали за счет использования двухкомпонентного органического растворителя, состоящего из 50 % этилацетата и 50 % метанола с добавлением 20 % NH_4OH непосредственно перед элюированием образца.

Амфетамины — это весьма летучие соединения, которые могут испаряться на стадии выпаривания растворителя во время пробоподготовки; чтобы этого избежать, их осаждают в виде солей путем добавления соляной кислоты. Лучше всего добавлять HCl ближе к концу выпаривания, чтобы избежать образования солей хлорида аммония, вызывающих ионную супрессию.

На рис. 2 показано превосходное разделение пяти амфетаминов и потенциальных мешающих компонентов, установленных SAMHSA, на колонке Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3×50 мм, 2,7 мкм; для полного разделения потребовалось 3,2 мин. Разделение на ЖХ начинали с малой доли органического растворителя (15 %), чтобы соли и другие полярные компоненты мочи элюировали в начале анализа образца. Каждый анализ образца начинали с отвода первой порции потока в отходы, чтобы свести к минимуму загрязнение источника. Сбор данных начинали сразу после переключения отводного крана. Скорость потока 0,8 мл/мин позволила сократить время разделения и повторного уравнивания.

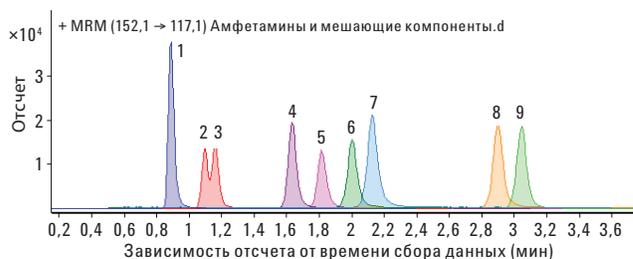


Рис. 2. Разделение амфетаминов и потенциальных мешающих компонентов на колонке Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3×50 мм, 2,7 мкм — наложенные хроматограммы MRM по выделенному иону. Концентрация каждого аналита соответствует 50 нг/мл. Порядок элюирования пиков: 1. фенилпропаноламин; 2. эфедрин; 3. псевдоэфедрин; 4. амфетамин, 5. метамфетамин 6. МДА; 7. МДМА; 8. МДЭА; 9. фентермин.

Для анализа нескольких соединений рекомендуется метод динамического MRM с использованием времени удерживания и временного окна (дельта ВУ) для определенных переходов. Если обеспечено хорошее отделение от мешающих компонентов и ведется сбор данных исключительно по пяти амфетаминам, кран можно переключить из положения «отходы» в положение «масс-спектрометр» на 1,2 мин вместо 0,6 мин (временной сегмент № 1 в методе МС).

В соответствии с руководствами SAMHSA как для целевого соединения, так и для внутреннего стандарта должны использоваться один квантификатор и минимум один ион-квалификатор. Для полной уверенности по возможности регистрировали третий переход для целевых аналитов (табл. 1). В ПО Agilent MassHunter для количественного анализа были рассчитаны соотношения ионов-квалификаторов, и те из них, которые оказались за пределами приемлемого диапазона, были автоматически подсвечены.

Таблица 1. MRM-переходы.

Соединение	Предшественник	Дочерний	Энергия соударения	Фрагментационная ячейка
Амфетамин	136,1	119,1	64	4
Амфетамин	136,1	91,1	64	14
Амфетамин-D ₆	142,1	125,1	66	5
Амфетамин-D ₆	142,1	93,1	66	13
МДА	180,1	163,1	92	5
МДА	180,1	105,1	92	17
МДА-D ₅	185,1	168,1	68	5
МДА-D ₅	185,1	110,1	68	21
МДЭА	208,1	163,1	88	8
МДЭА	208,1	133,1	88	17
МДЭА	208,1	105,1	88	21
МДЭА-D ₆	214,2	166,1	90	8
МДЭА-D ₆	214,2	108,1	90	25
МДМА	194,1	163,1	84	5
МДМА	194,1	135,1	84	17
МДМА	194,1	105,1	84	21
МДМА-D ₅	199,1	165,1	82	4
МДМА-D ₅	199,1	107,1	82	25
Метамфетамин	150,1	119,1	80	4
Метамфетамин	150,1	91,1	80	16
Метамфетамин-D ₉	159,2	125,2	77	5
Метамфетамин-D ₉	159,2	93,1	77	13
Эфедрин-псевдоэфедрин	166,1	133,1	80	21
Фентермин	150,1	133,1	80	6
Фенилпропаноламин	152,1	117,1	80	20

Для всех пяти амфетаминов (при концентрации 25 нг/мл) были получены соотношения С/Ш для пиков квантификаторов, превышавшие 400 : 1 (рис. 3, верхняя панель: показано соотношение С/Ш для пика квантификатора). Это демонстрирует выдающуюся производительность системы трехквadrупольного ЖХ-МС-МС Agilent 6460, с помощью которой можно с высокой степенью надежности определять все пять амфетаминов на уровне малой доли от предельной концентрации, установленной SAMHSA.

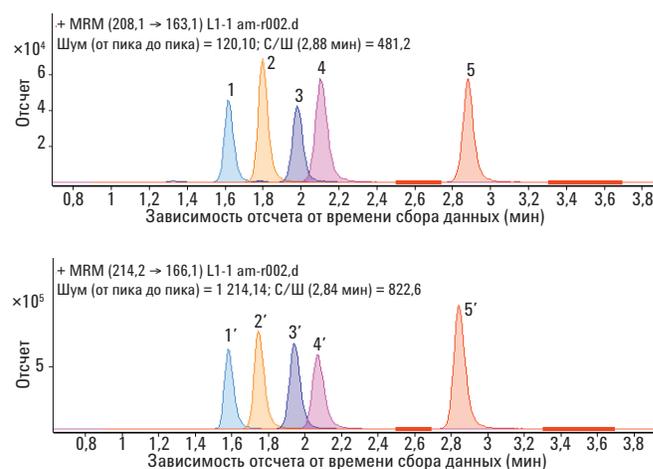


Рис. 3. Наложенные хроматограммы MRM по выделенному иону для квантификаторов амфетаминов (25 нг/мл) и квантификаторов внутренних стандартов (500 нг/мл) в экстракте мочи на колонке Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 мм, 2,7 мкм. Порядок элюирования пиков: верхняя панель — 1. амфетамин; 2. метамфетамин; 3. МДА; 4. МДМА; 5. МДЭА; нижняя панель — 1'. амфетамин-D₆; 2'. метамфетамин-D₉; 3'. МДА-D₅; 4'. МДМА-D₅; 5'. МДЭА-D₆. Области шума выделены жирным.

На рис. 4 представлены примеры калибровочных кривых для экстрагированных стандартов мочи на пяти уровнях концентрации. Калибровочные стандарты были подготовлены путем введения в чистую мочу соединений, представляющих каждый из пяти классов амфетаминов, при концентрациях 25, 250, 1000, 5000 и 10 000 нг/мл. Добавили дейтерированные внутренние стандарты для каждого аналита с концентрацией

500 нг/мл. Каждый график точно соответствует прямой ($R^2 > 0,999$), что демонстрирует линейность метода по всему широкому динамическому диапазону концентраций в соответствии с требованиями SAMHSA.

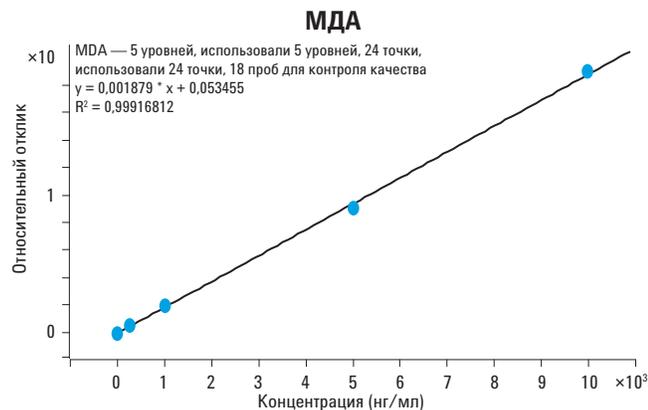
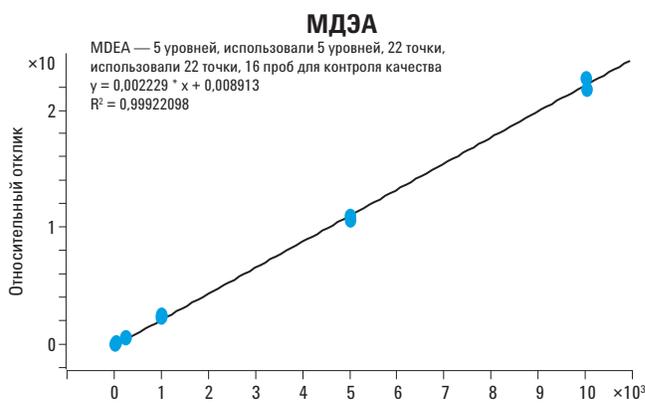
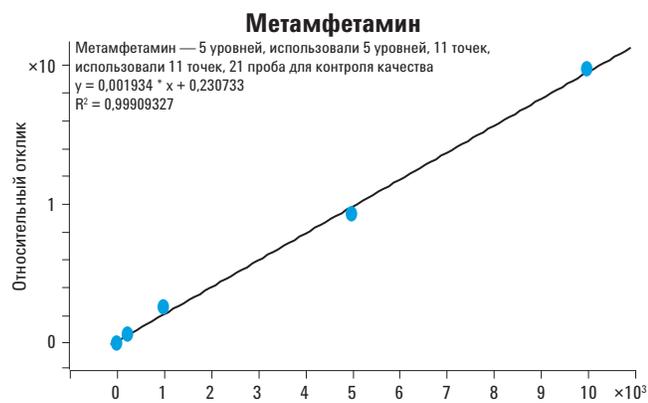
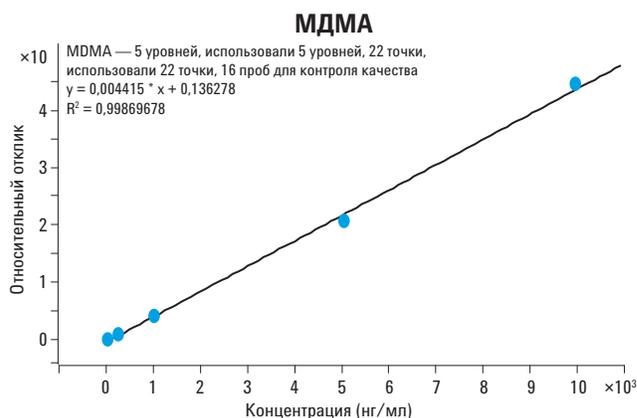
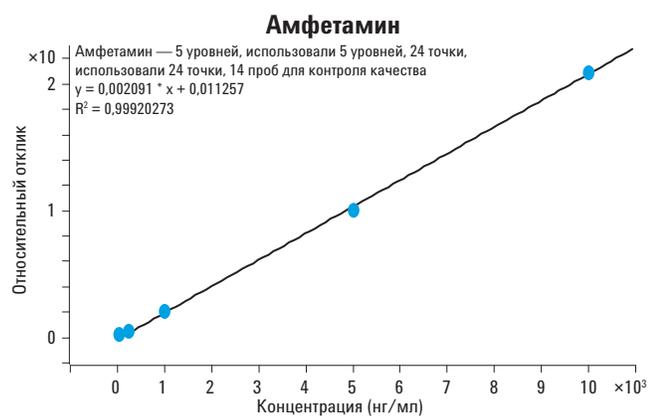


Рис. 4. Примеры калибровочных кривых для пяти амфетаминов в экстрактах мочи. Диапазон калибровки: от 25 до 10 000 нг/мл. Все графики соответствуют прямой, $R^2 > 0,999$.

Оценка метода

Приведенные в табл. 2 показатели эффективности метода были рассчитаны в соответствии с принципами, изложенными Матушевским *и др.*, которые широко используются в качестве стандартного подхода для оценки методов ЖХ-МС-МС [5]. Процедуру экстракции и измерение ЖХ-МС-МС проводили для пяти реплик чистой мочи, в которую до экстракции были добавлены соединения, представляющие каждый из пяти классов амфетаминов, на уровне предельных концентраций, а также пять реплик экстракта чистой мочи, растворенного в исходной подвижной фазе и затем насыщенного анализируемыми веществами в концентрации 250 нг/мл (с добавлением анализируемых веществ после ТФЭ). Для третьего измерения брали исходную подвижную фазу (растворитель для разведения экстракта), насыщенную анализируемыми веществами в концентрации, соответствующей их предельной концентрации в моче, — 250 нг/мл (подвижная фаза с добавлением анализируемых веществ).

Эффективность процесса (абсолютная степень извлечения) представляет собой отношение площади пика целевого аналита, введенного в мочу до ТФЭ, к его площади пика в подвижной фазе без добавления матрицы. Степень извлечения представляет собой отношение площади пика целевого аналита, введенного в экстракт мочи до ТФЭ, к площади пика этого аналита, введенного в экстрагированную чистую мочу после ТФЭ. Эффект матрицы представляет собой отношение площади пика целевого аналита, введенного в мочу после ТФЭ, к его площади пика в подвижной фазе. Точность представляет собой отношение измеренной концентрации, рассчитанной по калибровочной кривой, к ожидаемой концентрации в образце с добавлением известного количества целевого аналита. Прецизионность, или коэффициент вариации (CV), представляет собой меру воспроизводимости и рассчитывается как стандартное отклонение (в процентах) от среднего значения для этих пяти измерений.

Таблица 2. Оценка метода, n = 5.

Параметр	Амфетамин	Метамфетамин	МДА	МДМА	МДЭА
Эффективность процесса* (%)	86	93	91	93	95
Степень извлечения* (%)	94	94	95	97	96
Эффект матрицы* (%)	91	99	95	96	98
Точность** (%)	107	105	92	101	106
Прецизионность (CV)** (%)	0,6	0,5	1,1	0,5	0,3

* Определяется на уровне предельных концентраций.

** Определяется на уровне 40 % от предельной концентрации для амфетамина, МДА, МДМА, МДЭА и на уровне предельной концентрации для метамфетамина.

В табл. 2 показано, что степень извлечения для всех пяти амфетаминов составила $\geq 94\%$, при этом общая эффективность процесса превысила 90 % для четырех аналитов из пяти; для амфетамина эффективность процесса составила 86 %. Эффект матрицы в пределах 91–99 % означает, что из-за ионной супрессии произошло ослабление сигнала всего лишь на 1–9 %, а это подтверждает исключительную чистоту экстрактов, полученных с использованием патронов Plexa РСХ. Для данного метода характерны высокая точность (в пределах 10 % аналита) и отличная прецизионность ($CV < 1,1\%$).

Выводы

Приведенная выше процедура твердофазной экстракции в сочетании с методом детектирования ЖХ-МС-МС соответствует предписаниям SAMHSA и позволяет получить точные и воспроизводимые результаты при проведении судебно-медицинской токсикологической экспертизы, а также других анализов с аналогичными требованиями относительно юридического обоснования данных. Аппаратура настраивается точно так же, как и в других методах SAMHSA 2011 от Agilent. Эти методы предназначены для всех пользователей ЖХ Agilent 1100 и 1200 серий, поскольку обратное давление в ЖХ-системе не превышает 400 бар. Параметры источника легко настраиваются для использования данного метода с другими моделями трехкврупольного ЖХ-МС Agilent. Электронные копии методов сбора данных на ЖХ-МС-МС и количественного определения можно приобрести в компании Agilent Technologies.

Литература

1. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services [Руководство по программе сертификации для лабораторий, проводящих анализ мочи, и национальных лабораторий, 1 октября 2010 г., Министерство здравоохранения и социальных служб США.].
2. R. Baselt, (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA [Р. Баселт (2008) *Распределение токсических лекарственных средств и химикатов в организме человека*. 8-е изд., атлас. Ашленд, штат Огайо, США].
3. P. Moorman and J. Hughes, (2010) "Amphetamines (expanded) in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)". SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication Number 5990-5865EN [П. Мурмен и Дж. Хьюз (2010) «Определение амфетаминов (распространенных) в моче посредством ЖХ/трехкварупольной масс-спектрометрии (ЖХ-МС-МС)», СОП, Agilent Technologies, Inc., номер публикации 5990-5865RU].
4. J. Hughes, and P. Moorman, (2011) "Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing". Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem [П. Мурмен и Дж. Хьюз (2011) «Подтверждение посредством трехкварупольного ЖХ-МС-МС результатов исследования ЛС в моче для лабораторий, подконтрольных Министерству здравоохранения и социальных служб США», Agilent Technologies, Inc., семинар опубликован на сайте www.agilent.com/chem].
5. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, (2003) "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030 [Б. К. Матушевский, М. Л. Констанцер и С. М. Чавец -Эн (2003) «Стратегии оценки эффекта матрицы в количественных биоаналитических методах, основанных на ВЭЖХ-МС-МС», журн. *Аналитическая химия*, 75: 3019-3030].

Дополнительные сведения

В настоящем документе приведены типичные результаты. Подробно о продуктах и услугах компании Agilent: www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2013.
Напечатано в США
15 февраля 2013 г.
5990-9623RU



Agilent Technologies