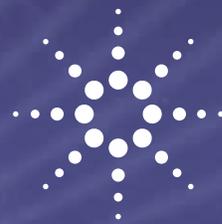


АНАЛИЗЫ ДЛЯ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И ТОКСИКОЛОГИИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАННАБИНОИДОВ ТГК И ТГК-СООН В СЛЮНЕ С ПОМОЩЬЮ ТРЕХКВАДРУПОЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ВЭЖХ-МС AGILENT 6490



Решения для аналитических компаний
Программы для рынков и отраслей



Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Информация о техниче- ском решении

Судебно-медицинская
экспертиза

Авторы

Дженнифер П. Паскали
(Jennifer P. Pascali)

DTOLabs, Analytical
Excellence Centre, авторизо-
ванная лаборатория-партнер
Agilent Technologies, Ресана
(TV), Италия.



Аннотация

Для количественного определения каннабиноидов (тетрагидроканнабинола (ТГК) и его метаболита карбокси-тетрагидроканнабинола [ТГК-СООН]) в слюне (OF) была разработана простая и быстрая методика с использованием трехквადрупольной системы ВЭЖХ-МС Agilent 6490. По данной методике получены отличные показания по селективности, чувствительности и линейности, а валидация методики проведена в соответствии с руководствами судебно-медицинской экспертизы. Также предоставлены данные по оценке влияния матрицы. Полученные результаты подтвердили пригодность данного метода для определения каннабиноидов в слюне в стандартной судебно-медицинской экспертизе.

Введение

Для клинического анализа и судебно-медицинской экспертизы слюна является достаточно новой биологической матрицей, отбор проб которой можно проводить простым бесконтактным способом, используя уже имеющееся оборудование. Из-за того, что концентрация таких определяемых веществ в слюне выше, чем в моче и в крови, скрининг на основе слюны приобретает все большее значение в программах DUI (управление автомобилем в состоянии наркотической интоксикации) по всему миру [1]. Поскольку при проведении теста на запрещенные наркотические средства каннабиноиды являются самыми распространенными аналитами, их определение в слюне должно быть надежным, а метод судебно-медицинской экспертизы должен быть достаточно чувствительным для данных специфичных веществ [2].

Изначально для анализа каннабиноидов использовались одноквадрупольные или трехквадрупольные системы ГХ-МС. Однако в последнее десятилетие в современных лабораториях судебно-медицинской токсикологии метод ВЭЖХ-МС приобрел большую значимость из-за менее сложной пробоподготовки, надежности получаемых результатов и универсальности.

В данных рекомендациях по применению описана полностью проверенная простая методика ВЭЖХ-МС/МС для определения тетрагидроканнабинола (ТГК) и его метаболита карбокси-тетрагидроканнабинола (ТГК-СООН) в слюне. Быстрая пробоподготовка основана на методе простого разбавления. В качестве результатов представлены данные: селективность, влияние матрицы, линейность и воспроизводимость.



Постановка эксперимента

Материалы

Пробы слюны были взяты у здоровых, не употребляющих наркотические средства добровольцев, работающих в лаборатории. Пробы отбирались путем сплевывания. Для анализа использовали воду, прошедшую очистку на установке milli-Q (Sartorius arium® pro VF | UF, Гёттинген, Германия), и ацетонитрил марки «для ВЭЖХ-МС» компании SigmaAldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США).

Оборудование

ВЭЖХ	1290 Infinity
МС	6490A

Хроматографические условия

Объем ввода	5,0 мкл
Колонка	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHT, 2,1 мм x 100 мм x 1,8 мкм
Термостат колоночного отделения	35 °С
Промывка иглы	45 с
Подвижная фаза А	5 мМ формиат аммония + 0,1%-ный р-р муравьиной кислоты в воде
Подвижная фаза В	Ацетонитрил +0,1%-ная муравьиная кислота
Скорость потока	0,200 мл/мин
Градиент	Начало 30%B
	5,0 мин 95%B
	8,0 мин 95%B
	8,1 мин 30%B
Время окончания	8,0 мин
Продолжительность периода после завершения анализа	1,5 мин

Обработка пробы

Пробы слюны отбирались в пластмассовые пробирки путем сплевывания. Затем их отцентрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Метод простого разбавления включает в себя разбавление пробы чистой водой и прямой ввод в систему ВЭЖХ-МС. Для того чтобы оценить влияние матрицы, провели несколько разбавлений: с водой в соотношении 1:5, 1:8, 1:10 и в метаноле в соотношении 1:5. Лучшие результаты были получены при разбавлении водой в соотношении 1:8.

Программное обеспечение

ПО MassHunter для сбора данных, проведения расчетов качественного и количественного анализа

Параметры МС

Ионизация	Источник ионизации электрораспылением Jet Stream
Полярность	(+)
Температура газа	120 °С
Расход газа	11 л/мин
Давление в распылителе	30 psi
Температура распыляющего газа	400 °С
Расход распыляющего газа	12 л/мин
Напряжение на входе в капилляр	3000 В
Напряжение выходного конуса	2000 В
Напряжение ионной воронки	150/100 В
MRM-переходы	
ТГК	315,2→193,2 @20
	315,2→123,3 @30
ТГК-СООН	345,2→299,2 @18
	345,2→327,2 @18
ТГК-СООН-D3 (IS)	348,2→330,2 @18

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидация была проведена в соответствии с международными руководствами судебно-медицинской экспертизы [3]. Валидация методики включала параметры: селективность, линейность, чувствительность, точность и достоверность полученных данных. Все расчеты выполнены с использованием ПО MassHunter.

Влияние матрицы (МЕ)

Для количественной оценки влияния матрицы был использован метод Матушевски (Matuszewski) [4]. Для анализа были взяты три водных раствора (коэффициенты разбавления 1:5, 1:8 и 1:10) и раствор в метаноле (коэффициент разбавления 1:5), к которым были сделаны добавки ТКГ и ТКГ-СООН с концентрациями: 0,1, 1,0 и 10 нг/мл. Средние значения МЕ, выраженные в виде коэффициента вариации (CV) в %, представлены в табл. 1.

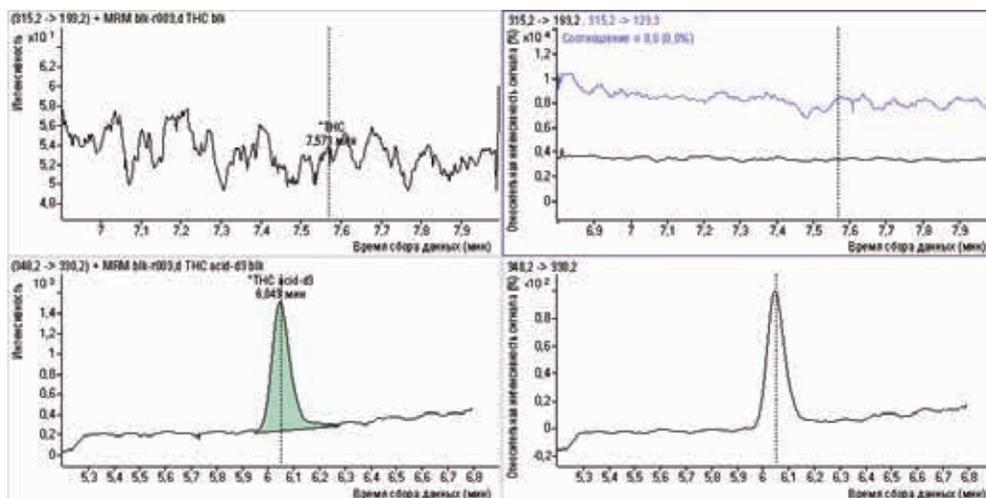
Соединение	CV, % Разбавление в воде 1:5	CV, % Разбавление в воде 1:8	CV, % Разбавление в воде 1:10	CV, % Разбавление в метаноле 1:5
ТКГ	15	10	17	35
ТКГ-СООН	4	12	12	15

Таблица 1. Среднее значение CV (%) для ТКГ и ТКГ-СООН при различном разбавлении матрицы

Для выполнения условия $CV < 15\%$, необходимого для анализа обоих аналитов, было выбрано разбавление в воде в соотношении 1:8.

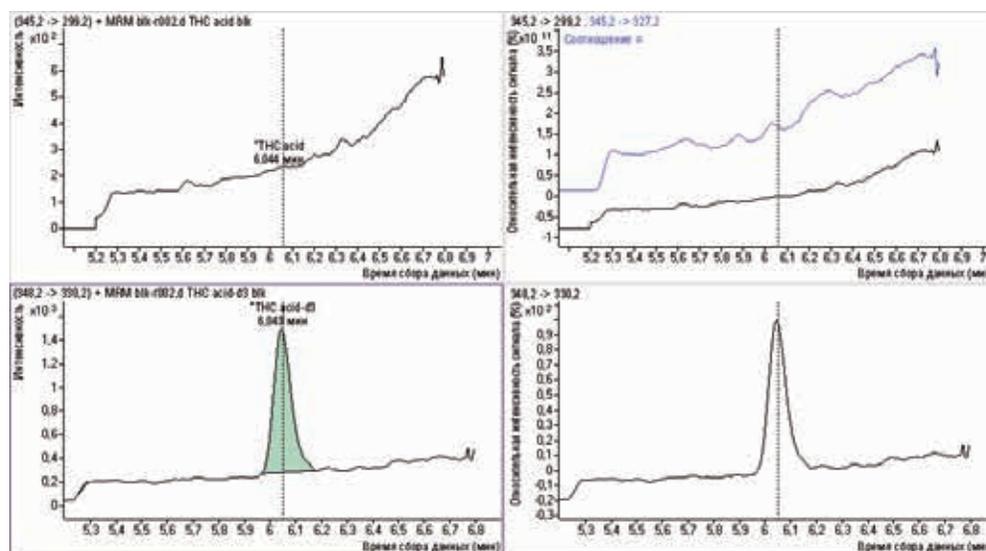
Селективность

Для определения мешающих компонентов у добровольцев взяли пять различных проб и проверили с внутренним стандартом (IS) и без него. При анализе всех проб во время удерживания аналита и IS не было обнаружено пиков мешающих компонентов (рис. 1 А и 1 В).



А

Рис. 1 А. Холостая проба слюны с IS (ТКГ-СООН/D3). Во время удерживания ТКГ пики мешающих компонентов не обнаружены



В

Рис. 1 В. Холостая проба слюны с IS (ТКГ-СООН/D3). Во время удерживания ТКГ-СООН пики мешающих компонентов не обнаружены

Линейность и чувствительность

Калибровочная кривая была построена по данным пяти анализов проб с известной концентрацией ТГК и ТГК-СООН: для ТГК—0,1, 0,25, 0,5, 1,0 и 10,0 нг/мл; для ТГК-СООН—0,25, 0,5, 1,0 и 10,0 нг/мл. Калибровочные кривые обоих аналитов отображают зависимость относительного отклика на определяемые вещества (результата деления площади пика аналита на площадь

пика внутреннего стандарта) от концентрации этих веществ. Калибровочные кривые, рассчитанные по регрессионному методу наименьших квадратов, были линейны в определяемом диапазоне. Уравнение калибровочной зависимости для ТГК $y = 0,186665x + 0,020813$, $R^2 = 0,9930$, для ТГК-СООН $y = 0,272733x - 0,001036$, $R^2 = 0,9977$ [рис. 2 А и 2 В].

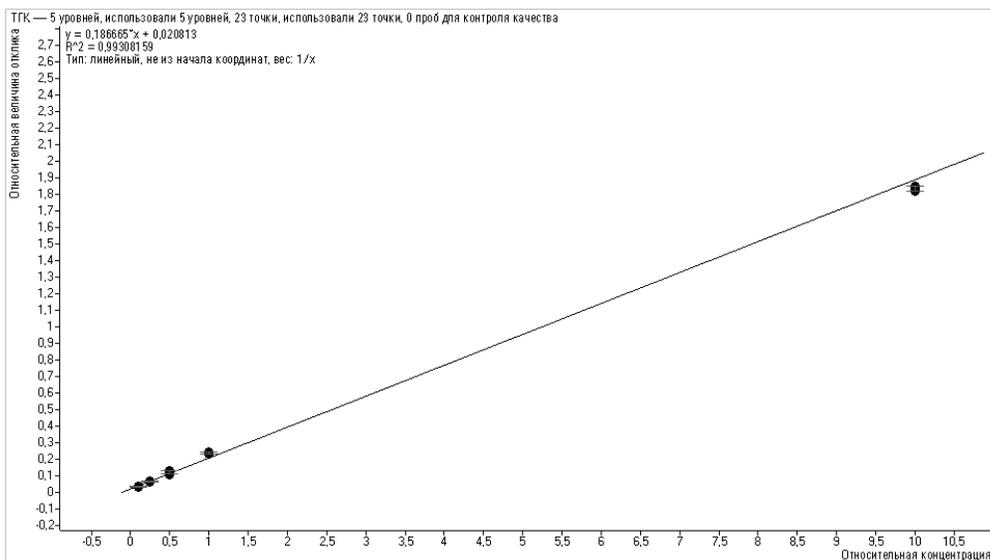


Рис. 2 А. ТГК на калибровочной кривой слюны. Диапазон калибровки: от 0,1 до 10 нг/мл.

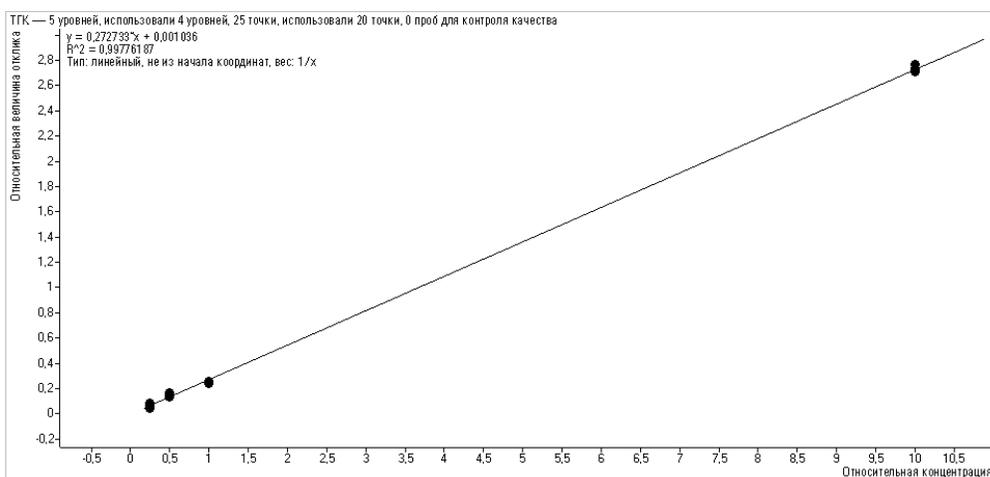


Рис. 2 В. ТГК-СООН на калибровочной кривой слюны. Диапазон калибровки: от 0,25 до 10 нг/мл.

Нижний предел количественного определения (LLOQ) — значение самой низкой концентрации, при которой точность измерений за один день и в разные дни сохраняется, а ОСО < 20%. LLOQ для ТГК в слюне составил 0,1 нг/мл (0,0625 пг на колонку) (рис. 3), а для ТГК-СООН — 0,25 нг/мл (0,156 пг на колонку) (рис. 4). Предел обнаружения (LOD) — минимальная концентрация, при которой соотношение «сигнал — шум» равно 3. LOD для ТГК в слюне составил 0,01 нг/мл (0,00625 пг на колонку), а для ТГК-СООН — 0,1 нг/мл (0,0625 пг на колонку). Для расчета отношения «сигнал — шум» по алгоритму среднеквадратического значения использовали ПО MassHunter.

Воспроизводимость и точность

Показатели воспроизводимости и точности методики были оценены с помощью анализа выборки проб слюны при концентрациях 0,1 (LLOQ для ТГК), 0,25 (LLOQ для ТГК-СООН), 1,0 и 10,0 нг/мл. В течение трех непоследовательных дней было сделано пять повторов. Значения точности и воспроизводимости данных за день и в разные дни соответствовали требованиям руководств судебно-медицинской экспертизы, при этом на уровне LLOQ ОСО всегда было ниже 20%, а при более высоких концентрациях не превышало 15%. Результаты анализов, проводимых в один день, приведены в табл. 2.

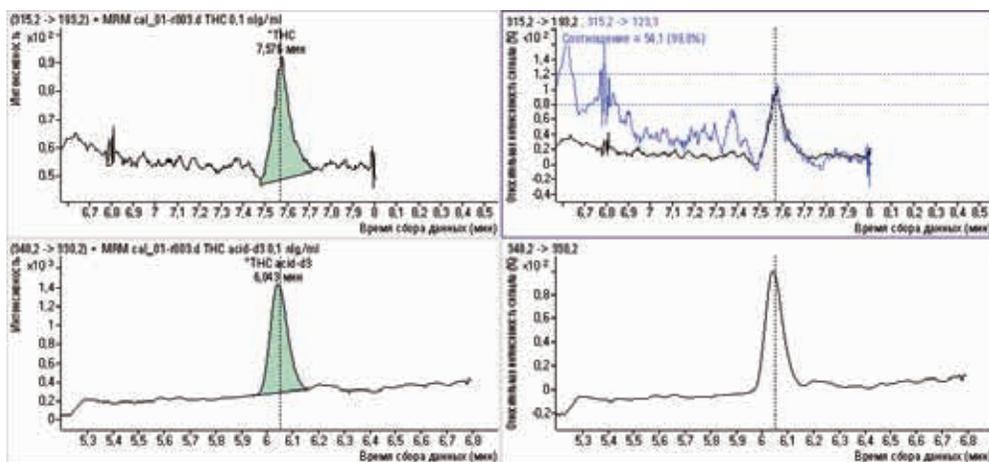


Рис. 3. Концентрация ТГК в пробе слюны с IS 0,1 нг/мл (LLOQ)

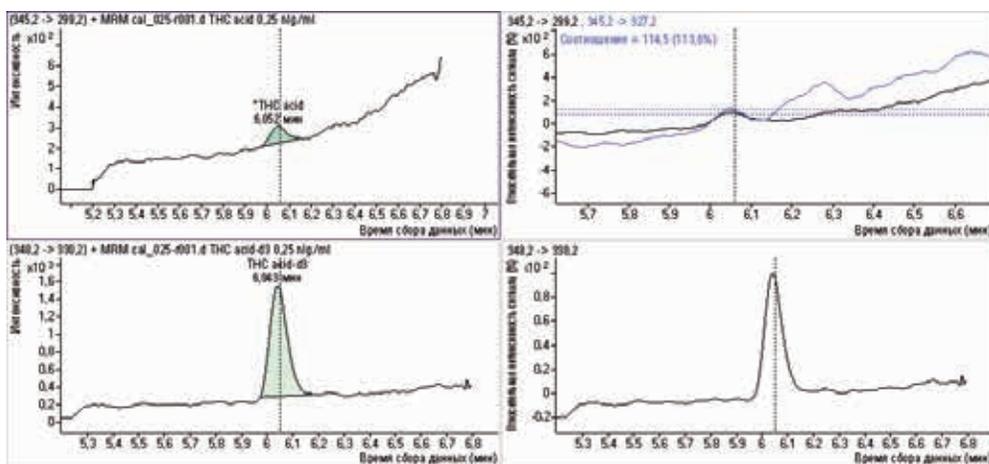


Рис. 4. Концентрация ТГК-СООН в пробе слюны с IS 0,25 нг/мл (LLOQ)

Параметр	ТГК 1,1 нг/мл	ТГК-СООН 0,25 нг/мл	ТГК 1,0 нг/мл	ТГК-СООН 1,0 нг/мл	ТГК 10,0 нг/мл	ТГК-СООН 10,0 нг/мл
Среднее значение (нг/мл)	0,088	0,24	1,06	0,97	9,8	10
Стандартное отклонение (SD)	0,017	0,03	0,12	0,07	0,3	0,11
ОСО, %	19	12	11	7	3	1,1
Ошибка измерения, %	-11	-3	+6	-3	-2	+0,12

Таблица 2. Сводная таблица результатов анализов ТГК и ТГК-СООН, проводимых в один день, для выбранных проб слюны

Выводы

Растущая необходимость тестирования препаратов, вызывающих лекарственную зависимость, влечет за собой повышение требований к чувствительности и точности токсикологических анализов. Метод совместного использования ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии был разработан не только для скрининга, но и для одновременного подтверждения присутствия каннабиноидов в пробах слюны в одном цикле анализа. Получаемые по этому методу данные селективности, чувствительности, точности и воспроизводимости действительно соответствуют требованиям руководств судебно-медицинской экспертизы. Преимущество ВЭЖХ-МС для анализа каннабиноидов по сравнению с ГХ-МС состоит в том, что за счет метода простого разбавления сокращается трудоемкий процесс пробоподготовки.

Литература

1. С. Страно-Росси (Strano-Rossi S.), Е. Кастрингано (Castrignanò E.), Л. Анзиллотти (Anzillotti L.), Д. Серпелони (Serpelloni G.), Р. Молика (Mollica R.), Ф. Таглиаро (Tagliaro F.), Д. П. Паскали (Pascali J.P.), Д. Ди-Стефано (di Stefano D.), Р. Сгала (Sgalla R.), М. Чияротти (Chiarotti M.).
Оценка четырех приборов для анализа проб слюны (DDS[®], Drugtest 5000[®], Drugwipe 5+[®] и RapidSTAT[®]) на наличие наркотических веществ, проводимого на месте взятия пробы, в сравнении с проведением анализа по методу УВЭЖХ-МС/МС.
Forensic Sci Int., 221, 1–3, **2012**.
2. Д. Ли (Lee D.), М. А. Хуэстис (Huestis M.A.).
Современное представление о нахождении каннабиноидов в слюне.
Drug Test Anal., **2013**.
- Ф. Т. Петерс (Peters F.T.), О. Х. Драммер (Drummer O.H.), Ф. Масшоф (Musshoff F.).
Валидация новых методик.
Forensic Sci Int, 2–3, 165, **2007**.
3. Б. К. Матушевски (Matuszewski B.K.), М. Л. Констанцер (Constanzer M.L.), С. М. Чавезенг (Chavezeng C.M.).
Стратегии оценки влияния матрицы в биоаналитических методах количественного определения с помощью ВЭЖХ-МС/МС.
Anal Chem., 75, 13, **2003**.



Решения для аналитических компаний
Программы для рынков и отраслей
www.solutions-to-win.com

The Measure of Confidence

Продукция Agilent предназначена только для исследовательских целей.
Не для использования при диагностических процедурах.
Информация, описания и технические характеристики, содержащиеся в этом документе, могут быть изменены без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
Напечатано в США 14 февраля 2014 г.
5991-3977RU



Agilent Technologies