

## СУДМЕДЭКСПЕРТИЗА И ТОКСИКОЛОГИЯ

# ПРИМЕНЕНИЕ ОН-ЛАЙН ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ МОДУЛЯ AGILENT 1290 FLEX CUBE С ПОСЛЕДУЮЩИМ ВЭЖХ-МС-МС АНАЛИЗОМ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ОБРАЗЦОВ МОЧИ В СКРИНИНГОВОМ АНАЛИЗЕ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ.

Аналитические решения  
Markets and Applications Programs

### Авторы

А.В. Лабутин

Областное государственное учреждение здравоохранения «Томский областной наркологический диспансер»

В качестве примера пробоподготовки представлен пример использования он-лайн твердофазной экстракции на базе Agilent 1290 Flex Cube в химико-токсикологическом анализе образцов мочи подвергшихся минерального гидролизу, с последующим анализом методом ВЭЖХ-МС-МС (qTOF). Применение подобной пробоподготовки значительно сокращает трудозатраты и продолжительность исследования.

### Введение

Проблема незаконного употребления наркотических средств как синтетического так и растительного происхождения с каждым годом приобретает все большую актуальность и социальную значимость. Не менее актуальным является разработка и внедрение достоверных, простых и быстрых способов поиска наркотических средств и их метаболитов в биологических средах организма, с целью диагностики состояния опьянения. Наиболее распространенным объектом в практике химико-токсикологических лабораторий для такого анализа является моча. С одной стороны именно в моче всегда бывает достаточно высока концентрация ксенобиотиков (к которым относятся в том числе наркотические средства), особенно в период их максимального выведения. С другой стороны моча - относительно простой объект для проведения пробоподготовки, так как содержит небольшое количество высокомолекулярных, а также низкополярных соединений.

Но тем не менее пробоподготовка для образцов, приготовленных из мочи все равно необходима, так как эти объекты в большом количестве содержат минеральные соединения (как естественные соли организма, так и соли образующиеся в ходе нейтрализации минеральных кислот и оснований после гидролиза), большое количество сильно полярных азотсодержащих и кислородсодержащих соединений, таких как сахара и продукты их минеральной деградации, креатинин, мочевины, гиппуровая кислота,



аминокислоты и пр. Наличие таких соединений в больших количествах не желательно для ВЭЖХ-мс анализа, так как во первых они перегружают колонку, во вторых загрязняют источник ионизации и могут в значительной мере подавлять ионизацию целевых соединений. Классическим способом пробоподготовки является жидкость-жидкостная либо оф-лайн твердофазная экстракция. Основным недостатком этих методов является их трудоемкость, временные затраты, влияние человеческого фактора на успешное протекание процессов пробоподготовки. Однако в настоящее время стали активно появляться сообщения о успешном использовании методов он-лайн твердофазной экстракции для подобного вида анализа. Применение этого метода позволяет свести трудозатраты и расход реактивов к минимуму.

## Экспериментальная часть

### Оборудование

Описание	Номер по каталогу
Agilent 1200 Infinity Online SPE Solution	
Agilent 1260 Infinity Binary Pump	G1312B
and LAN card	G1369C
Agilent 1260 Infinity Standard Autosampler	G1329B
with 900 µL head	G1313-60007
and an Agilent 1290 Infinity Flexible Cube	G4227A
Agilent 1200 Infinity Online SPE starter kit including one 2-position/10-port valve	G4742A
Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment	G1316C
Agilent G6450 Q-TOF LC/MS System with Agilent Jet Stream Technology	
<b>Analytical Column</b>	
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 3.5 µm	959763-902
<b>Trapping Columns</b>	
Guard Column Hardware Kit	820999-901
PLRP-S Cartridges, 4.6 × 12.5 mm, 15-20 µm	5982-1270
<b>Software</b>	
Agilent MassHunter data acquisition for q-TOF mass spectrometer, Version 06.00	
Agilent MassHunter data analysis for q-TOF mass spectrometer, Version 06.00	

### Пробоподготовка

Перед анализом пробы мочи подвергают минеральному гидролизу. Наиболее информативным с точки зрения наличия метаболитов является совместное проведение кислотного и щелочного гидролиза. Для проведения гидролиза две аликвоты мочи каждая по 4 мл вносят в две стеклянные емкости, к одной добавляют 6Н раствор минеральной щелочи (NaOH либо KOH), к другой добавляют 6Н раствор HCl., после чего обе емкости герметично закрывают и нагревают в течении 40 минут при 90 °С.

После чего обе емкости остужают до комнатной температуры, и смешивают содержимое. При необходимости доводят pH до значения 8 с помощью буфера.

Полученную смесь гидролизатов далее фильтруют через фильтр с размером пор 0,45µм и вводят в систему ВЭЖХ-МС, снабженную оборудованием для он-лайн твердофазной экстракции.

## Конфигурация системы и принцип работы.

Система он-лайн твердофазной экстракции была построена на базе модуля Agilent 1290 flex cube G4227A с использованием одного 10-портового крана и насоса для

твердофазной экстракции (Piston Pump). Схема подключения и работы системы он-лайн ТФЭ приведена ниже (рис.1-2). Порядок работы системы представлен в таблице 1.

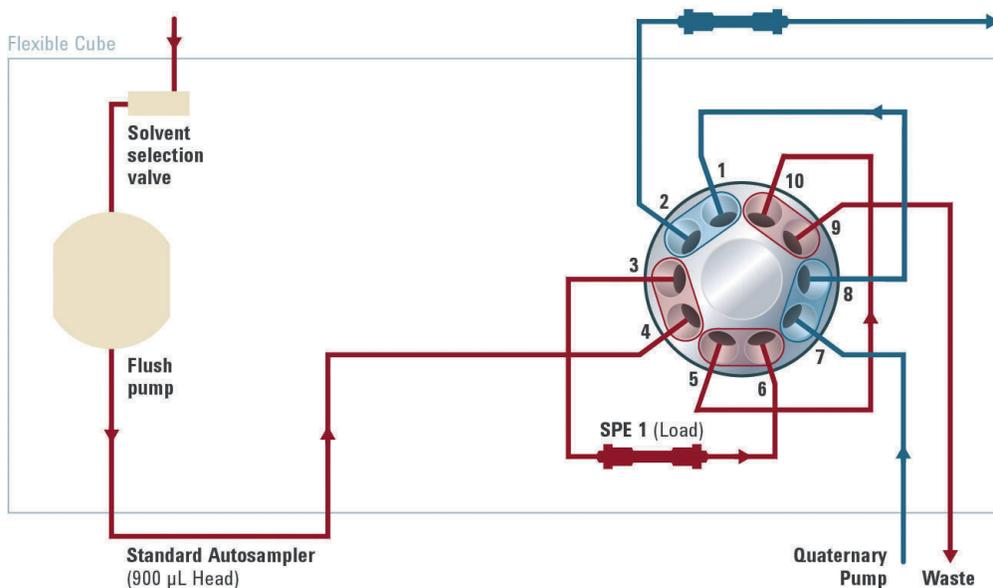


Рисунок 1. Схема работы он-лайн ТФЭ при загрузке образца на картридж.

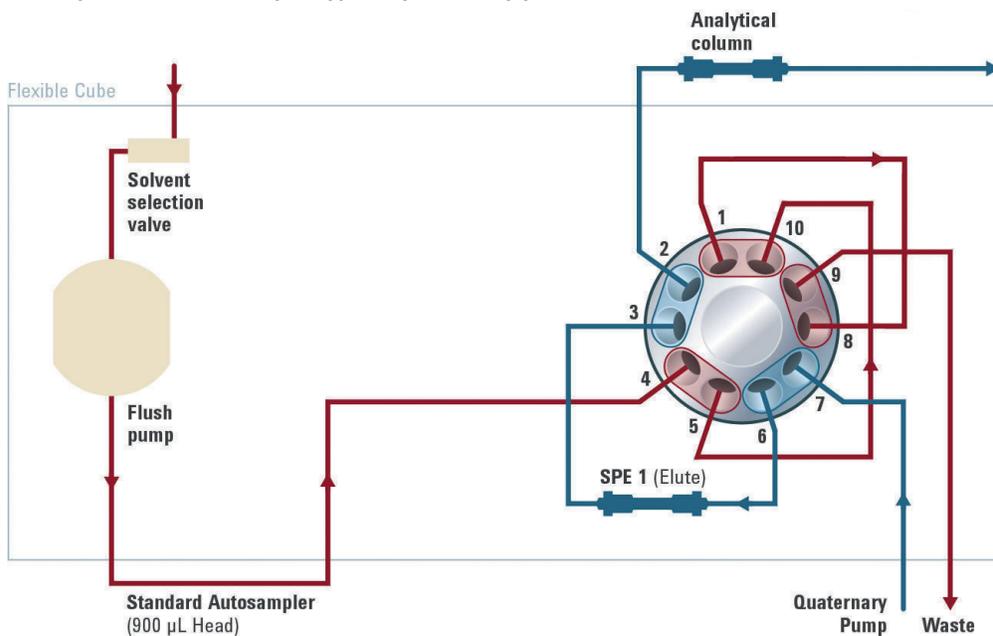


Рисунок 2. Схема работы он-лайн ТФЭ при смывке с картриджа на колонку.

При загрузке образца в картридж кран находится в положении Position 2, при этом через картридж пропускается сначала проба в количестве 30мкл, затем 2мл промывочного раствора, для удаления основных балластных веществ и минеральных компонентов. Промывочный раствор представляет собой 5% раствор этанола в воде с pH доведенной до значения 8-9,

с помощью аммиачно-цитратного буфера. Затем через систему пропускают 0,5мл, Буфера А из системы ВЭЖХ для уравнивания pH системы. После чего 10-ти портовый кран переключается в положение Position 1 (рис 2) и через картридж ТФЭ пропускается рабочий элюент ВЭЖХ и попадает в колонку. Программа градиента ВЭЖХ приведена в таблице 2.

Время	Операция	Действие
0	Промывка элюентом 1	Пропускание через картридж 1-го элюента (B2) на протяжении 119с со скоростью 1мл/мин
2	Промывка элюентом 2	Пропускание через картридж 2-го элюента (A2) на протяжении 28с со скоростью 1мл/мин
2,51	Переключение 10-ти портового крана	Переключение в положение Position 1
3	Промывка элюентом 2	Пропускание элюента 2 через коммуникации узлы ввода ) на протяжении 90с со скоростью 0,5мл/мин
3.6	Промывка элюентом 3	Пропускание элюента 3 через коммуникации узла ввода на протяжении 120с со скоростью 0,5мл/мин
5,7	Промывка элюентом 1	Пропускание элюента 1 через коммуникации узла ввода на протяжении 60с со скоростью 0,5мл/мин
9	Переключение 10-ти портового крана	Переключение в положение Position 2
9,02	Промывка элюентом 3	Пропускание элюента 3 через картридж твердофазной экстракции на протяжении 190 секунд со скоростью 1мл/мин (регенерация картриджа)
14,91	Промывка элюентом 1	Пропускание элюента 1 через картридж твердофазной экстракции на протяжении 150 секунд со скоростью 1мл/мин (приведение картриджа к начальным условиям)

Таблица 1. Порядок работы системы он-лайн твердофазной экстракции.

Time $\Delta$	Function	Parameter
0	Pump for time	▼ Pump 119s, Flow: 1mL/min, Channel A: A2, Channel B: B2
2	Pump for time	▼ Pump 28s, Flow: 1mL/min, Channel A: A2, Channel B: B1
2.51	Left valve change positi...	▼ Position 1 (Channel 1)
▶ 3	Pump for time	▼ Pump 90s, Flow: 0.5mL/min, Channel A: A2, Channel B: B1
3.6	Pump for time	▼ Pump 120s, Flow: 0.5mL/min, Channel A: A1, Channel B: B1
5.7	Pump for time	▼ Pump 60s, Flow: 0.5mL/min, Channel A: A2, Channel B: B2
9	Left valve change positi...	▼ Position 2 (Channel 2)
9.02	Pump for time	▼ Pump 190s, Flow: 1mL/min, Channel A: A1, Channel B: B1
14.91	Pump for time	▼ Pump 150s, Flow: 1mL/min, Channel A: A2, Channel B: B2

Рисунок 3. Пример программирования системы flex cube в ПО MassHunter.

## Условия ВЭЖХ анализа

Параметр	Значение	
1260 Infinity BinaryPump	SOLVENT A 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде	
	SOLVENT B ацетонитрил скорость потока 0.3 mL/min	
Таблица градиента	Время (мин)	%B
	0	3
	2,5	3
	8,3	99
	15	99
Stop time:	15 минут	
Post time:	2,5 мин.	
Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment	температура колонки 45 °C	
Agilent 1290 Infinity Flexible Cube	Valve 2-position/10-port QuickChange valve head	
	Solvent B2: 5% раствор этанола в воде с pH 8-9 (первый элюент)	
	Solvent A2: 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде (второй элюент)	
	Solvent A1: этанол (третий элюент)	
Agilent 1260 Infinity Standard Autosampler	объем вводимой пробы 30 µL	
	промывка иглы: деионизованная вода	
	промывка петли – этанол	

## МС метод

детектор Agilent 6540 работал в режиме положительной электрораспылительной ионизации в следующих условиях: температура источника ионов – 350 °C, напряжение на капилляре – 3.5 кВ, напряжение на фрагментаторе – 100 В, напряжение на скиммере – 65 В, расход газа-осушителя 8 л/мин, расход вспомогательного газа 8 л/мин, диапазон сканирования ионов-предшественников – 100–500 Да, диапазон регистрации ионов-продуктов – 50–500 Да. Газ для соударений – азот, давления газа для соударений в ячейке соударений – 1.37 кПа, энергия соударений 20 эВ. Режим работы детектора – высокое разрешение (40000 на половине высоты при m/z 622, точность измерения масс 0.08 ppm), скорость сканирования – 5 сканов в сек.

Настройка прибора и автоматическая коррекция точности измерения масс в реальном времени

проводилась с использованием стандартных растворов, рекомендованных производителем прибора, состоящих из трифторацетата натрия, пурина и гексакис(2,2,3,3-тетрафторпропокси)фосфазина (HP-0921).

Работа проводилась в режиме «auto-ms», предполагающим автоматический отбор пяти наиболее интенсивных ионов-предшественников, и их последующей фрагментацией, активированной соударениями. При проведении отбора иона предшественника окно пропускания квадрупольного фильтра масс задавалось 1,3 а.е.м

## Реактивы

Использованы следующие реактивы: вода деионизованная (из системы водоподготовки Milli-Q, Millipore, США), ацетонитрил, квалификации «чистый для хроматографии», муравьиная кислота, квалификации “х.ч.”.

## Результаты и их обсуждение

Для проверки работоспособности системы готовили контрольные растворы модельных соединений, по свойствам близких к определяемым в обычной практике соединениям. Один раствор представлял собой водный раствор содержащий по 25нг/мл толперизона и димедрола и 50нг/мл индометацина., другой раствор представлял собой холостой образец мочи подвергшийся гидролизу, с добавкой этих же соединений в аналогичных концентрациях, рН раствора доведено до 8. [2]

В ходе исследования анализировали указанный выше водный раствор как с использованием системы он-лайн ТФЭ, так и без нее, используя прямой ввод аналогичного количества вещества непосредственно в аналитическую колонку, после чего анализировали с применением метода он-лайн ТФЭ образец гидролизованной мочи с добавкой указанных соединений. Результаты измерений площадей пиков указанных веществ приведены в таблице 3

вещество	Площадь пика без ТФЭ	Площадь пика с системой ТФЭ (% от прямого ввода)	Площадь пика из реальной матрицы (гидролизат мочи) (% от прямого ввода)
<b>Толперизон</b>	1034308	1128612 (109)	897530 (79)
<b>Димедрол</b>	435035	271369 (62)	167450 (38)
<b>Индометацин</b>	75304	53233 (71)	34233 (45)

Таким образом видно, что использование системы он-лайн ТФЭ позволяет использовать ее в качестве части метода пробоподготовки для таких сложных образцов как гидролизаты мочи. Использование данного метода позволяет избавиться от минеральных соединений, вредных для источника ионизации, и кроме того также от большого количества гидрофильных органических соединений, имеющих в матрице, во время стадии промывки буферным раствором содержащим небольшое количество органического растворителя, в то же время переключение крана модуля ТФЭ сразу после выхода на плато градиента ацетонитрила и последующая промывка картриджа этанолом, позволяет недопустить попадания сильно гидрофобных веществ в колонку и таким образом продляет срок ее службы. Использование предложенного метода пробоподготовки позволяет провести весь анализ после стадии гидролиза за 15 минут, в то время как применяя традиционные методы пробоподготовки

- жидкость-жидкостную и офф-лайн твердофазную экстракцию, только стадия выпаривания растворителя применяемого для экстракции может занимать около получаса. Кроме того, сокращается расход растворителей и контакт оператора с токсичными растворителями. Так единственный растворитель который применяется в методе кроме ацетонитрила - относительно безопасный и дешевый этанол. Существенным ограничением предложенного метода является невозможность анализировать сравнительно гидрофильные вещества, такие как морфин, кодеин. Амфетамин в ряде случаев также показывает плохие результаты по степени извлечения при анализе указанным методом. Также стоит отметить что перед использованием предложенного варианта пробоподготовки для анализа конкретных соединений необходимо проверить степень их извлечения в данных условиях, и возможность их анализировать в рабочих объектах на требуемых пределах обнаружения.

## Заключение

Предложен способ пробоподготовки основанный на он-лайн твердофазной экстракции реализованной с помощью блока Agilent flexcube 1290, для автоматизации и упрощения процедуры проведения химико-токсикологического анализа образцов гидролизованной мочи. Предложенный способ существенно сокращает время анализа и трудозатраты на пробоподготовку. Потери анализов хотя и весьма заметны при использовании данного

метода, однако сравнимы с таковыми в случае применения более традиционных способов пробоподготовки, а ряде случаев даже превосходят их. [1]. Кроме того потери анализов при извлечении компенсируются высокой чувствительностью оборудования, которая дополнительно может быть повышена при использовании других режимов работы масс-селективного детектора.

## Список литературы

1. Катаев С.С. Дворская О.Н. "Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества" // Судебно-медицинская экспертиза Том 55 2012г.
2. А.Б. МЕЛЕНТЬЕВ «Влияние рН среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами» СМЭ, - 2003. - №2. - с.40-43.  
удк 340.67:616-074:543.544

Контакты: Agilent MAPs:  
**maps\_agilent@agilent.com**

Дополнительная информация:  
**<http://www.your-analytical-solution.com>**

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Published in USA, January 22, 2015  
5991-5514RURU

The Measure of Confidence



**Agilent Technologies**