

Разработка методик твердофазной экстракции (ТФЭ) с сорбентами смешанного типа для криминалистических задач

Методическая информация

Криминалистика и токсикология

Автор

Майк Чанг
Agilent Technologies, Inc.

Краткое содержание

ТФЭ с сорбентом смешанного типа является универсальным и мощным средством для экстракции целевых соединений из биологических матриц и одним из наиболее широко используемых методов пробоподготовки в криминалистических лабораториях. Данная методическая информация представляет собой целостный обзор разработки методик пробоподготовки в рамках метода ТФЭ с сорбентом смешанного типа Agilent Bond Elut Certify, предваряющих анализ методами ВЭЖХ-МС-МС или ГХ-МС, и имеет целью сокращение процесса разработки методик или улучшение существующих методик.

Введение

Многие скрининговые тесты наркотиков, осуществляемые на рабочем месте, выполняются посредством масс-спектрометрии в сочетании с газовой хроматографией или жидкостной хроматографией. Иногда ученые в криминалистических лабораториях сталкиваются с необходимостью изменять существующие стандартные методики работы, если требуется снижение пределов обнаружения, улучшение линейности в диапазоне больших или малых концентраций, расширение диапазона калибровки, работа с ограниченным объемом пробы или слишком частая замена аналитической колонки. При разработке новой методики твердофазной экстракции (ТФЭ) очевидных путей не существует. В этом исследовании определения фенциклидина в моче целиком рассматривается рабочий процесс ТФЭ, причем особое внимание уделяется принятию решений на пути создания окончательной методики.



Agilent Technologies

Вещества и методики

Ацетонитрил, метанол и муравьиная кислота имели степень чистоты «для ВЭЖХ-МС». Дихлорметан имел степень чистоты «для ВЭЖХ». Этилацетат имел степень чистоты «для ГХ-анализа следовых количеств веществ», а гексан, NH_4OH и KH_2PO_4 имели степень чистоты ч. д. а. Использовалась вода, профильтрованная с помощью системы Milli-Q или со степенью чистоты «для ВЭЖХ-МС». Была использована уксусная кислота высшего качества. Аналиты фенциклидин и фенциклидин-D5 были приобретены у корпорации Sigma-Aldrich. Контрольная проба мочи для токсикологического контроля Liquichek, уровень C2, была приобретена от компании Bio-Rad Laboratories. Концентрация фенциклидина составляла 19 нг/мл.

Пробоподготовка была выполнена с помощью патронов Agilent Bond Elut Certify, 130 мг, 3 мл, 50 шт./упак. (кат. номер 12102051).

Параметры оборудования

Параметры приборов для ВЭЖХ-МС-МС и ГХ-МС с импульсным вводом пробы с делением и без деления потока рассмотрены более подробно в других источниках [1].

Принципы ТФЭ

Существует широкий диапазон сорбентов ТФЭ, включая обращенно-фазовые, катионообменные, анионообменные и сорбенты смешанного типа. Принцип ТФЭ заключается в том, чтобы дать возможность пробе, содержащей целевые соединения, или мешающие компоненты, или и те и другие, связаться с твердофазным сорбентом (обычно химически модифицированным силикагелем или полимерным материалом, помещенным в патроны или луночные планшеты), затем удалить мешающие компоненты в отходы посредством промывки и, наконец, элюировать и собрать целевые соединения. Все эти этапы выполняются селективно, и мешающие компоненты и целевые соединения успешно отделяются от матрицы пробы.

Первым этапом разработки методики ТФЭ является изучение характеристик целевого соединения. Фенциклидин является относительно основным и гидрофобным соединением, с $\text{pKa} = 8,29$ и $\log P = 4,69$. В идеале использование катионообменного и гидрофобного взаимодействий было бы оптимальным выбором для ТФЭ. ТФЭ с сорбентом смешанного типа Agilent Bond Elut Certify имеет хороший баланс гидрофобных и катионообменных характеристик и прекрасно подходит для анализа фенциклидина.

Традиционный процесс ТФЭ состоит из кондиционирования, уравнивания, внесения пробы, промывки, элюирования, выпаривания и повторного растворения, как показано на рис. 1. Некоторые этапы можно исключить для снижения времени протекания процесса.

В этой процедуре сорбент для ТФЭ удерживает целевые соединения до этапа элюирования, при этом другие мешающие компоненты пробы удаляются на этапе промывки.



Рис. 1. Последовательность операций ТФЭ

Первые три этапа на рис. 2 (кондиционирование, уравнивание и внесение пробы) не требуют существенных усилий по подбору параметров для оптимизации результатов ТФЭ. Иногда этапы кондиционирования и уравнивания можно исключить для некоторых полимерных сорбентов для ТФЭ. Наиболее эффективной является оптимизация этапов промывки и элюирования. Во время внесения пробы целевые соединения связываются с материалом сорбента вместе с мешающими компонентами. Целью этапа промывки является удаление этих мешающих компонентов. Затем на этапе элюирования извлекается целевое соединение за счет ослабления взаимодействия между ним и сорбентом для ТФЭ. Максимально полное удаление мешающих компонентов при сохранении оптимальной степени извлечения целевого соединения является ключом к успешной разработке методик ТФЭ. Для контроля оптимизации методики необходимо собрать и проанализировать посредством хроматографии элюаты с каждого этапа — от внесения пробы до элюирования.

Результаты и обсуждение

После кондиционирования (2 мл метанола) и уравнивания (2 мл 100 мМ KH_2PO_4), проба мочи с добавкой аналита (1 мл) вводилась в пипетку, как показано на рис. 2. Во время этапа внесения пробы весь элюат собирали во флакон. Элюент для стадий промывки был разделен на три аликвоты по 1 мл каждая. Первая промывка выполнялась 1 мл 5% уксусной кислоты, а остальные — 1 мл метанола. Каждую фракцию элюата собирали отдельно во флакон. Элюирование выполнялось тем же образом: например, с помощью 3 порций по 1 мл, смесью ацетонитрил + 2% NH_4OH . Каждую фракцию элюата собирали отдельно во флакон. Флакон на рис. 3, содержащий продукты промывки 2, показывает, что большинство мешающих компонентов было удалено на этапе промывки метанолом. Все собранные элюаты были исследованы методом ВЭЖХ-МС-МС, все полученные хроматограммы показаны на рис. 4.



Рис. 3. Элюаты, собранные на каждом этапе методики ТФЭ (собранные элюаты (слева направо): после внесения пробы, промывки 1, промывки 2, промывки 3, элюирования 1, элюирования 2 и элюирования 3)

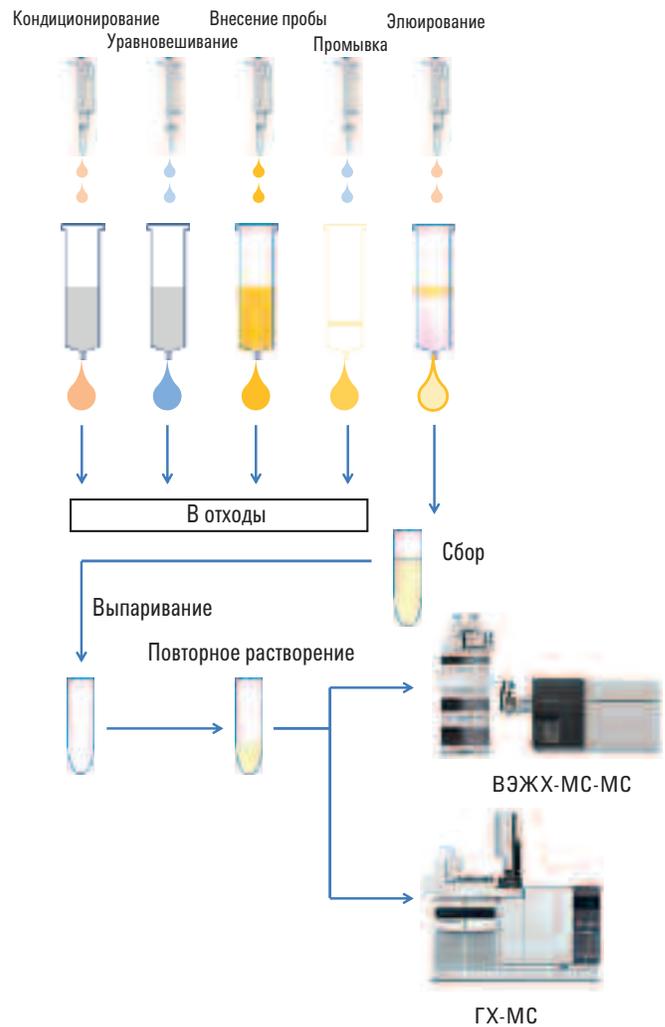


Рис. 2. Блок-схема анализа проб криминалистического характера с помощью ТФЭ

Из информации на рис. 4 видно, что целевое соединение фенциклидин (время удерживания: 1,35 минуты) не проходило через сорбент на этапе внесения пробы. Хроматограммы промывок 1–3 также подтвердили, что фенциклидин не был вымыт из сорбента на этапах промывки. На этапе элюирования фенциклидин должен выходить, и, как видно из хроматограмм элюатов 1–3, целевые соединения действительно покидали сорбент.

Флакон, содержащий продукты промывки 3, был прозрачным на вид, и на хроматограмме продуктов промывки 3 не было пика целевого соединения, поэтому стадию промывки 3 можно пропустить. Элюат 3 не содержит существенного количества фенциклидина, что означает, что одной аликвоты из 2 мл ацетонитрила + 2 % NH_4OH , объединяющей элюаты 2 и 3, было бы достаточно для осуществления единой стадии элюирования.

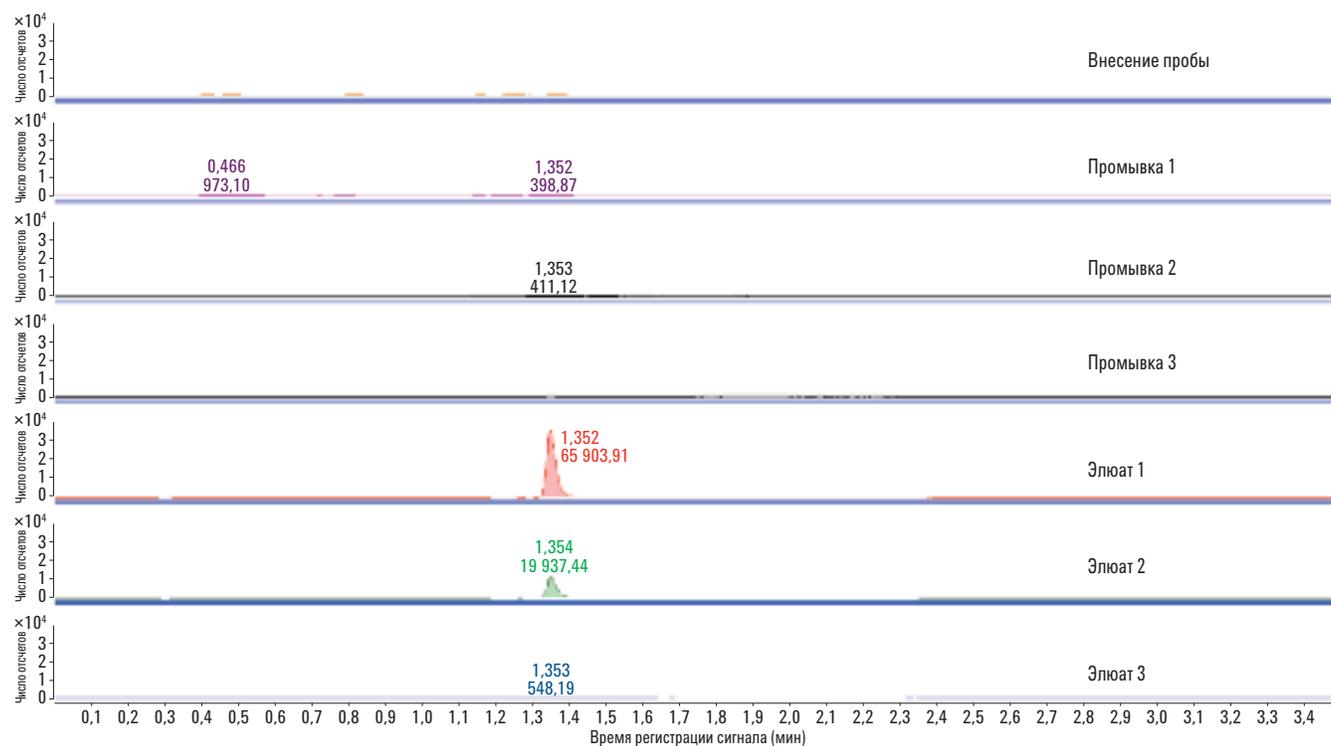
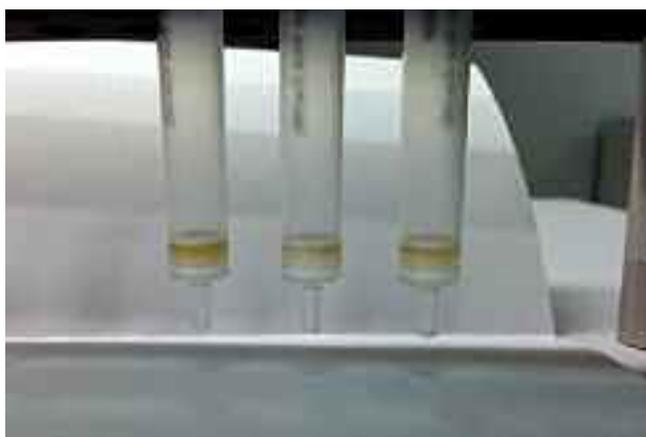


Рис. 4. Хроматограммы фенциклидина, полученные с помощью системы ВЭЖХ-МС-МС, для всех элюатов, собранных в процессе ТФЭ

Для дальнейшей оптимизации этапа элюирования можно было бы протестировать различные элюирующие растворители. Широко распространенной в криминалистике смесью растворителей для элюирования является дихлорметан:изопропиловый спирт: NH_4OH в соотношении 78:20:2. Кроме того, при использовании ВЭЖХ-МС-МС стандартным растворителем для элюирования является ацетонитрил или метанол. После тестирования трех различных растворителей для элюирования были получены пики с различной площадью, а также информация о фоне в режиме полного сканирования масс-спектра. Помимо хроматограмм, также важно визуальное наблюдение. На рис. 5 показано влияние различных растворителей для элюирования.



А) Патроны Agilent Bond Elut Certify после элюирования



В) Элюирование тремя различными растворителями



С) После выпаривания



Д) Повторное растворение в исходной подвижной фазе

Рис. 5. Исследование эффекта варьирования растворителя для элюирования (элюирование с помощью смесей (слева направо): ацетонитрил + 2% NH_4OH , метанол + 2% NH_4OH и дихлорметан:изопропиловый спирт: NH_4OH в соотношении 78:20:2)

При элюировании смесью метанол + 2% NH_4OH выходил загрязненный элюат, тогда как со смесью ацетонитрил + 2% NH_4OH и дихлорметан:изопропиловый спирт: NH_4OH в соотношении 78:20:2 экстракты были чистыми на вид. Данные, полученные посредством хроматографии, подтверждают, что элюирование на основе метанола не подходит из-за более низкой степени извлечения (рис. 6) и большего фонового шума ВЭЖХ-МС (рис. 7).

Исходя из данных на рис. 5–8, элюирование на основе ацетонитрила дает наилучшие результаты, минимизируя интерференции и максимально увеличивая площадь пика целевого соединения.

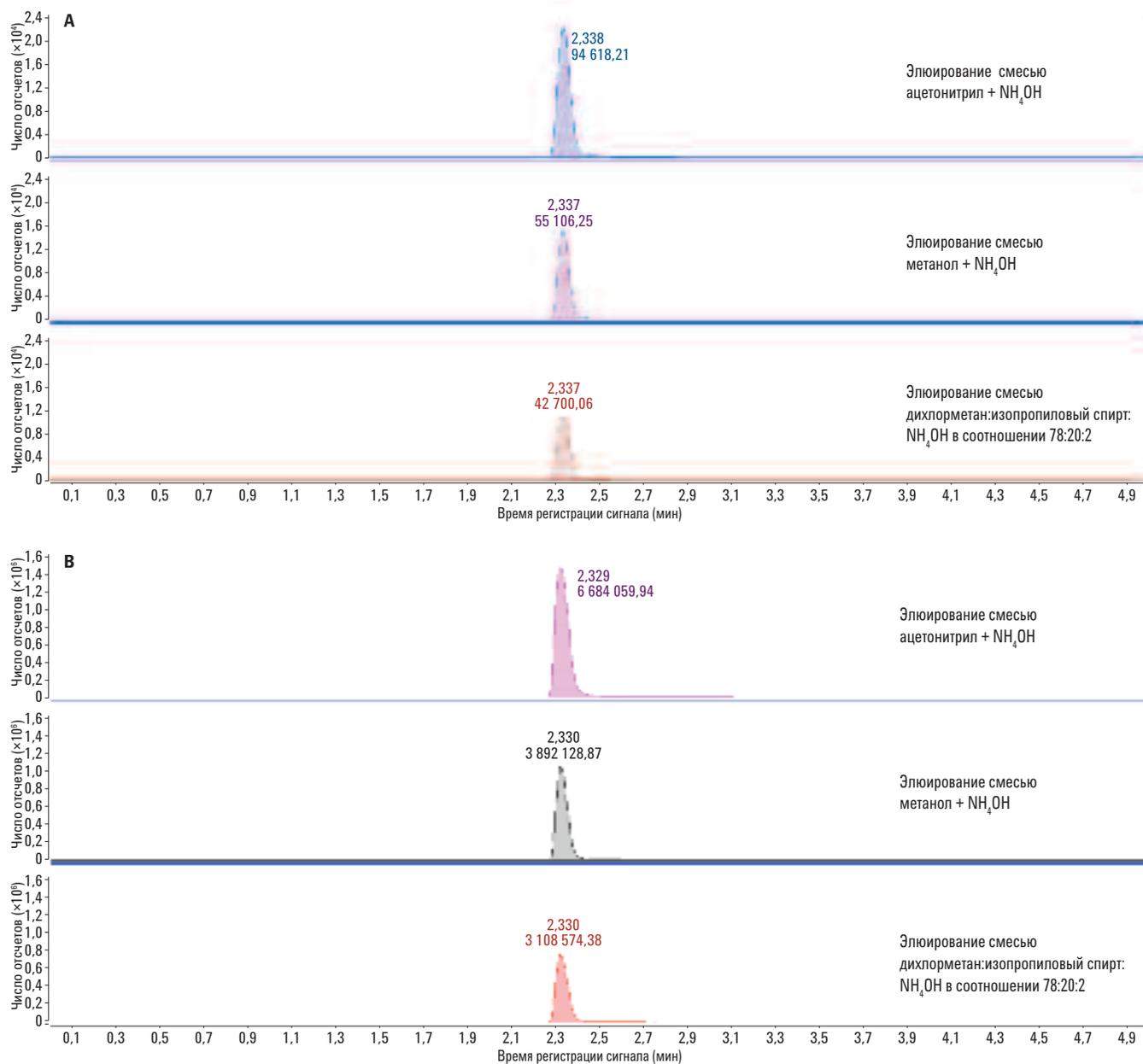


Рис. 6. Хроматограммы фенциклидина (А) и фенциклидина-d5 (В), полученные методом ВЭЖХ-МС-МС с элюированием тремя различными растворителями (сверху вниз: ацетонитрил + 2 % NH_4OH ; дихлорметан:изопропиловый спирт: NH_4OH в соотношении 78:20:2; метанол + 2 % NH_4OH)

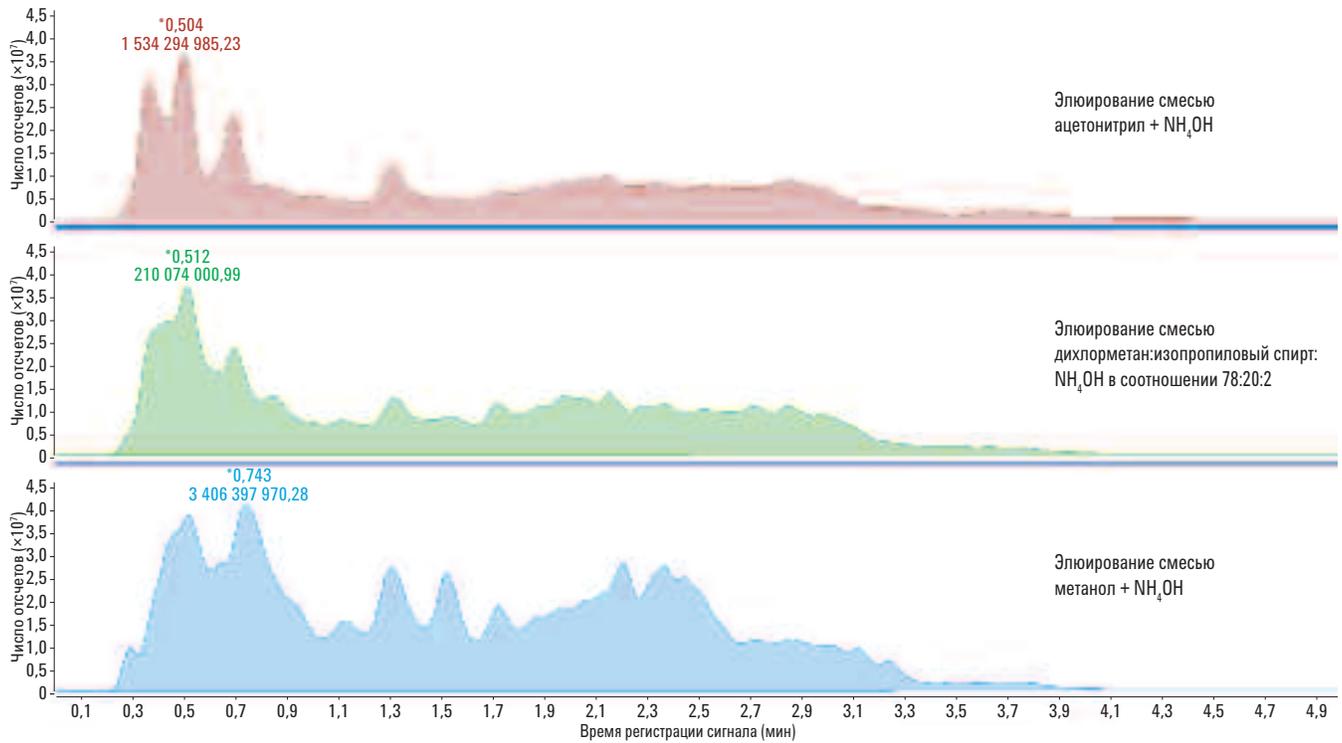


Рис. 7. Хроматограммы холостых проб мочи, подготовленных с помощью сорбентов Agilent Bond Elut Certify с элюированием различными растворителями, полученные методом ВЭЖХ-МС-МС с полным сканированием масс-спектра

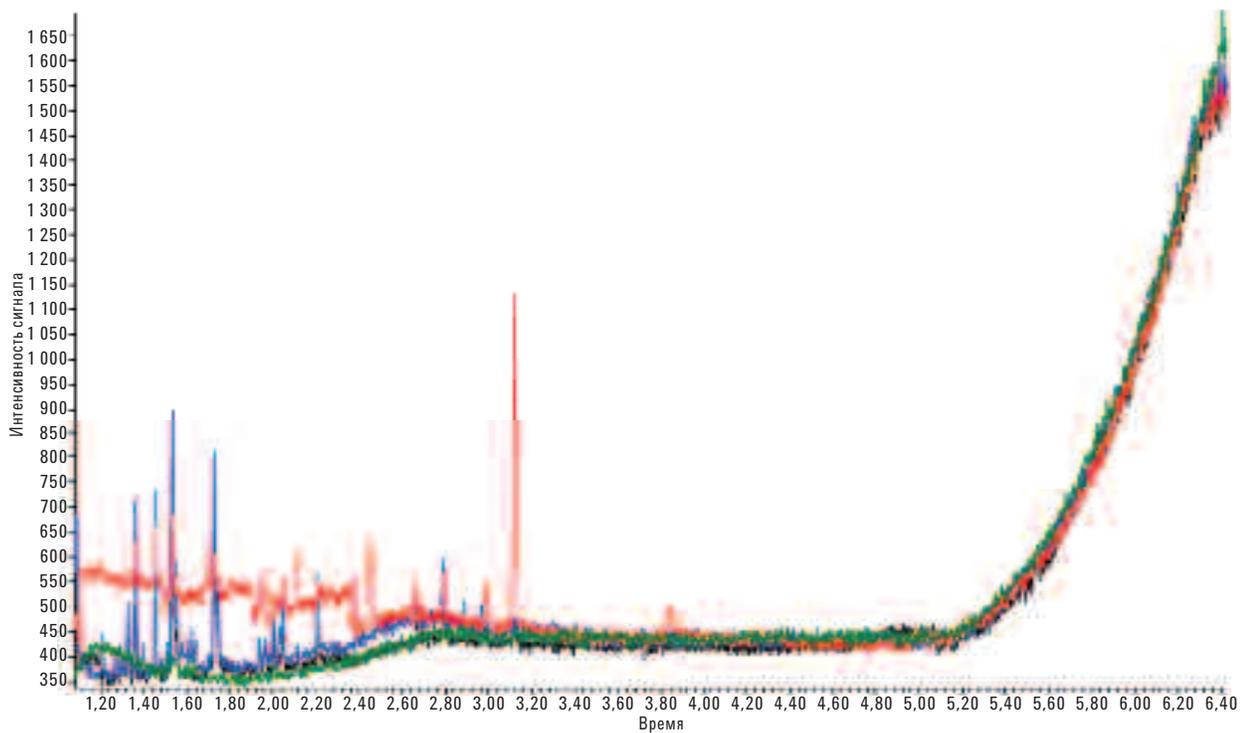


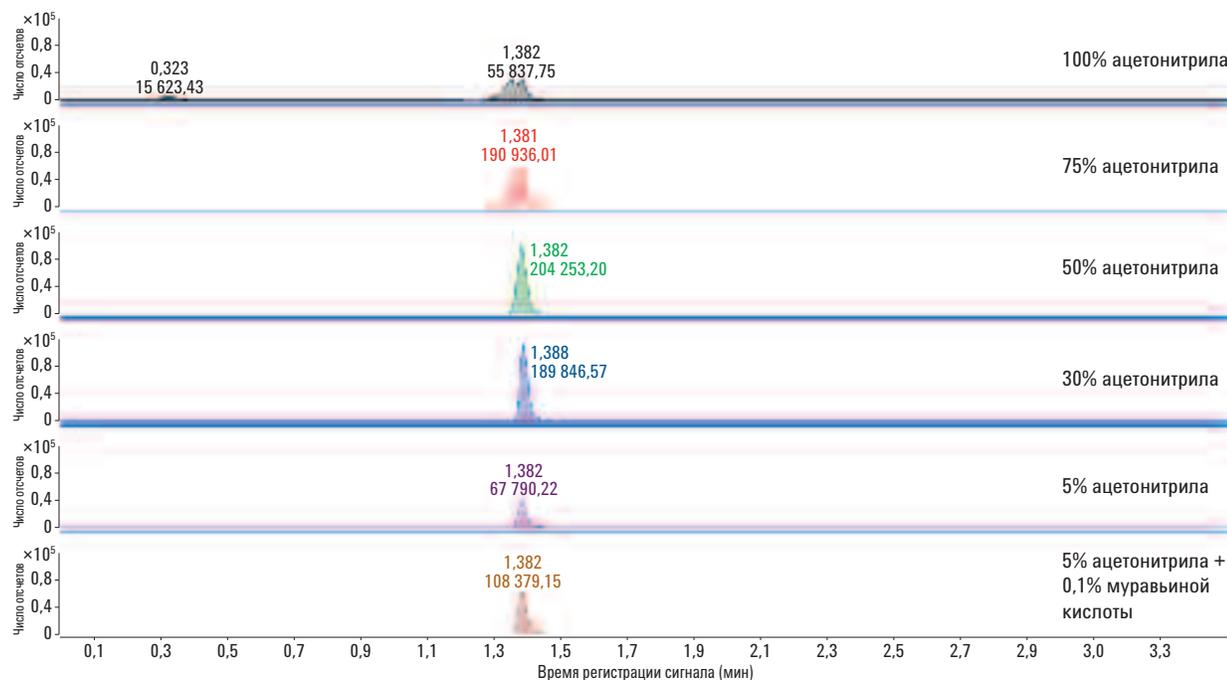
Рис. 8. Хроматограммы холостых проб мочи, подготовленных с помощью сорбентов Agilent Bond Elut Certify с элюированием различными растворителями, полученные методом ГХ-МС с полным сканированием масс-спектра

Вводимые объемы для ВЭЖХ-МС-МС могут варьироваться от менее 1 до 20 мкл. При использовании систем УВЭЖХ вводимые объемы обычно меньше. Однако если для улучшения пределов обнаружения требуется ввод большого объема, то можно выполнить исследование эффектов растворителя пробы и вводимого объема. Общим правилом является использование исходной подвижной фазы в качестве растворителя пробы. Обычно чем выше содержание органического растворителя в растворителе пробы, тем выше отклик ВЭЖХ-МС-МС за счет лучшей десольватации в источнике ионизации. Как показано на рис. 9, были протестированы различные вводимые объемы и составы растворителя пробы.

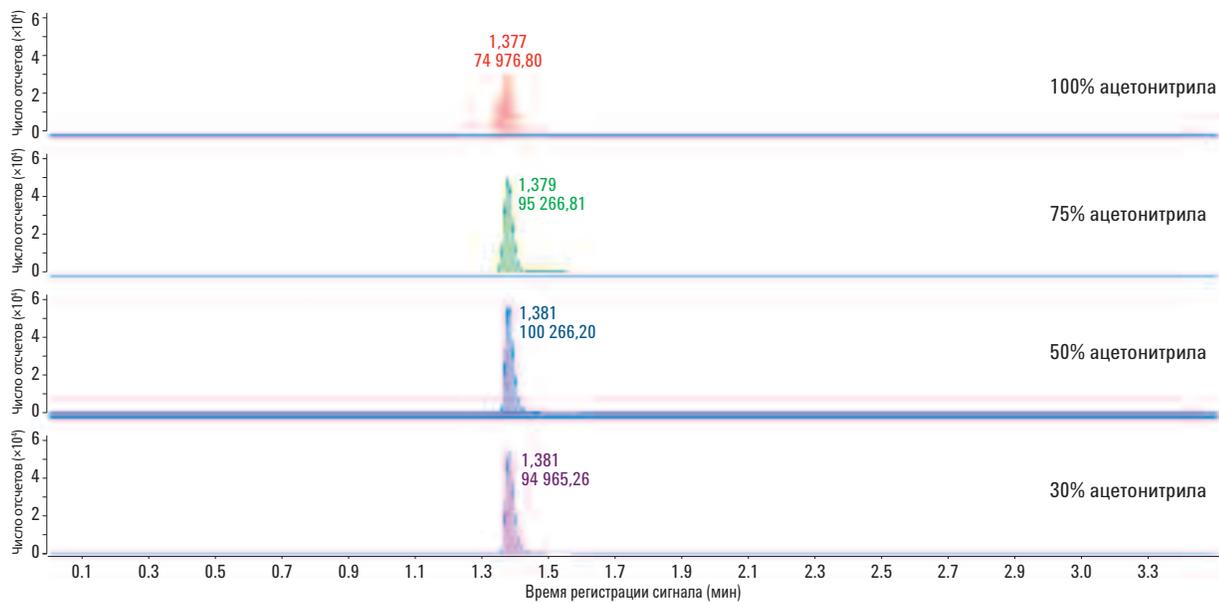
Из рис. 9 видно, что для меньших вводимых объемов, таких как 2 мкл, процентное содержание органического растворителя оказывало минимальное влияние на форму и площадь пика. При больших вводимых объемах, например 5–10 мкл, близкий к исходной подвижной фазе состав растворителя пробы позволял улучшить форму пика, а иногда и площадь пика. Эти экспериментальные данные могут различаться, в зависимости от условий ВЭЖХ-МС-МС и целевых соединений.

Последние экспериментальные условия и результаты для проб человеческой мочи, включая пробоподготовку и параметры приборов, были опубликованы в [1].

ввод 10 мкл



ввод 5 мкл



ввод 2 мкл

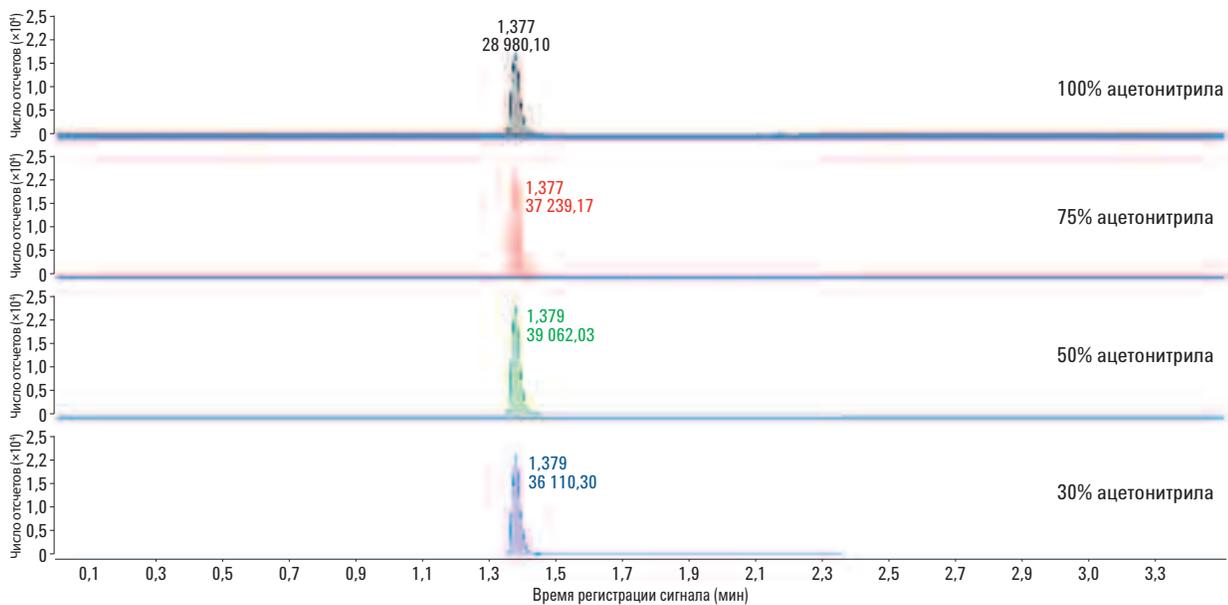


Рис. 9. Влияние вводимого объема и растворителя пробы в методе ВЭЖХ-МС-МС (вводимый объем указан сверху, а состав растворителя пробы указан на каждой хроматограмме)

Выводы

Процесс пробоподготовки с помощью ТФЭ с сорбентом смешанного типа был проиллюстрирован на основе реальных проб и хроматографических данных. Он обеспечивает оптимизированные условия, позволяющие добиться повышения качества данных в криминалистике. Для успешной разработки методик ТФЭ необходимы правильный баланс между удалением мешающих компонентов пробы и удерживанием целевых соединений, а также оптимизация элюирования для получения более чистых экстрактов.

Литература

1. *Analysis of Phencyclidine in Urine to U.S. SAMHSA Guidelines with LC/MS/MS and GC/MS. (Анализ фенциклидина в моче методами ВЭЖХ-МС-МС и ГХ-МС в соответствии с указаниями Управления по контролю за злоупотреблением наркотическими веществами и психическим здоровьем США)*
Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-4575EN (2014).

Дополнительная информация

Подробнее о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте 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 спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
Напечатано в США
29 мая 2014 г.
5991-4695RU



Agilent Technologies