

Analyse von Drogen in Humanurin mittels LC/MS/MS unter Verwendung von festkörperunterstützter Flüssigextraktion mit Agilent Chem Elut S-Kartuschen

Autor

Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Agilent Chem Elut S ist ein neues Produkt zur Probenvorbereitung, das für die festkörperunterstützte Flüssigextraktion (SLE) ein synthetisches Sorbens verwendet. Diese Application Note zeigt die Verwendung von Chem Elut S 96-Wellplates (400 mg) für die quantitative Analyse von 24 Drogen in Humanurin mittels LC/MS/MS. Urinproben wurden enzymatisch mit β -Glucuronidase verdaut und dann auf Chem Elut S 400 mg 96-Wellplates aufgegeben. Die wässrigen Proben wurden auf dem Medium adsorbiert, die Wartezeit zur Äquilibration betrug fünf Minuten. Die Proben wurden dann mit Methyl-tert.-butylether (MTBE) eluiert und ergaben einen klaren, die Zielanalyten enthaltenden Extrakt. Die Methode wurde hinsichtlich Präzision und Genauigkeit verifiziert. Sie ergab eine hervorragende Wiederfindung ($100 \pm 20\%$) und Genauigkeit (relative Standardabweichung $< 20\%$) für alle Verbindungen mit Ausnahme von einer Substanz. Es werden wesentliche Vorteile gegenüber der herkömmlichen Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und gegenüber SLE-Methoden, die Diatomeenerde verwenden, aufgezeigt. Die Ergebnisse zeigen, dass Chem Elut S, das auf einem synthetischen SLE-Sorbens basiert, für diese Applikation eine schnelle, einfache und konsistente Probenvorbereitung ermöglicht.

Einführung

In der forensischen Toxikologie ist die schnelle und zuverlässige Quantifizierung von Drogen in biologischen Proben von größtem Interesse.¹⁻³ Ein Grund hierfür ist die steigende Zahl an Drogen und an zu untersuchenden Proben. Der Urintest auf Drogen ist einer der gängigsten forensischen Tests zum Screening auf und zur Quantifizierung von Drogen im menschlichen Körper. Urin ist als Matrix nicht so komplex wie andere biologische Matrices, beispielsweise Plasma oder Serum. Er enthält jedoch große Mengen verschiedener Salze, die die Zuverlässigkeit des Tests und die Verwendbarkeit von Geräten stören können. Daher ist eine geeignete Probenvorbereitung zur Matrixaufreinigung und Extraktion der Drogen erforderlich. Außerdem sind die zu untersuchenden Drogen häufig glycosyliert, sodass ein enzymatischer Verdau mit β -Glucuronidase vor der Probenvorbereitung erforderlich ist, um die Wirkstoffsubstanz für die nachfolgende Extraktion und Analyse freizusetzen.⁴

Die gängigen Methoden für die Vorbereitung der Proben für die Drogenanalyse sind die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), die Festphasenextraktion (SPE) und die festkörperunterstützte Flüssigextraktion (SLE). Die LLE kann besonders arbeitsintensiv sein, da sie eine ausgedehnte Mischung der Proben, eine manuelle Trennung der Phasen und gelegentlich eine Zentrifugation zum Brechen von Emulsionen erfordert. Darüber hinaus ist die LLE im Gegensatz zur SLE nur schwierig und aufwändig zu automatisieren. Bei der herkömmlichen SLE wird eine wässrige Probe auf ein Sorbensbett, das Diatomeenerde (DE) enthält, geladen. Die wässrige Probe legt sich dabei als dünner Film auf das Material. Ein nicht mit Wasser mischbares Lösemittel wird dann durch das SLE-Bett geleitet, wodurch die Zielanalyten aus der Probe extrahiert und zur Vorbehandlung und Analyse in ein Sammelröhrchen eluiert werden. Im Vergleich zur herkömmlichen LLE ist die Grenzfläche zwischen der wässrigen und organischen Phase, an der Interaktionen

stattfinden können, bei der SLE erheblich größer. Dies verbessert den Übergang der Analyten von der wässrigen in die organische Phase und macht die Mischungsschritte überflüssig. Dadurch ergeben sich gegenüber der herkömmlichen LLE erhebliche Einsparungen an Zeit und Arbeit mit einer Vereinfachung der Methode und einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit.

Bei der Diatomeenerde handelt es sich um ein natürliches Material, das aus unregelmäßig geformten, versteinerten Mikroorganismen besteht. Daher ist es schwierig, die Konsistenz der Sorbenspartikel von Batch zu Batch zu steuern. Die Sorbensvariabilität macht die Produktherstellung und die Qualitätskontrolle schwierig und führt zu einer inkonsistenten Produktleistung. Bei Diatomeenerde kann im Vergleich zu synthetischen Medien eine geringere und nicht konsistente Wasseradsorptionskapazität auftreten. Das Sorbens Chem Elut S verbessert die Wasseradsorptionskapazität, die Konsistenz von Batch zu Batch und die Leistungskonsistenz erheblich. Das Design in einer 96-Wellplate bietet einen großen Headspace für Proben und Lösemittel, eine viereckige obere Fritte, die die Probe hält, bis Druck/Vakuum angelegt wird, einen umlaufenden Rahmen für Hardwarekompatibilität und schnelle, konsistente Elution.

Diese Studie verwendet Chem Elut S 2 ml 96-Wellplates (400 μ l) zur quantitativen Bestimmung von 24 Drogen in Humanurin. Es wurden auch experimentelle Vergleiche zwischen Chem Elut S, LLE und SLE auf DE-Basis hinsichtlich der Wiederfindung, Reproduzierbarkeit und Anwenderfreundlichkeit durchgeführt.

Experimentelles

Alle Reagenzien und Lösemittel waren von HPLC- oder Analysenqualität. Methanol (MeOH) sowie Acetonitril (ACN) wurden von Honeywell (Muskegon, MI, USA) und Methyl-tert.-butylether (MTBE) von VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, USA) bezogen. Eine konzentrierte Salzsäurelösung (HCl, 38 %) wurde von VWR bezogen. Eine kombinierte Standard-Stammlösung der Drogen wurde von Agilent Technologies (Bestellnummer 5190-0470) und Stammlösungen der internen Standards (IS) (1 mg/ml) wurden von Cerilliant (Round Rock, TX, USA) bezogen. Das Enzym β -Glucuronidase wurde als Lösung (100 000 Einheiten/ml) von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben. Humanurin (Mass Spect Gold) wurde von Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, USA) erworben. Reagenslösungen wurden für jedes Batch frisch hergestellt, um Schwankungen zu vermeiden.

Standards und Lösungen

Kombinierte Standard- und Zwischenlösungen der internen Standards für die definierte Zugabe wurden mit 20 μ g/ml in MeOH durch Verdünnung eines entsprechenden Volumens der einzelnen Stammlösungen hergestellt. Alle Lösungen, die zur definierten Zugabe zu Proben verwendet wurden, wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

- Agilent Chem Elut S 400 μ l (Best.-Nr. 5610-2004)
- Agilent Überdruckverteiler, PPM-96 (Best.-Nr. 5191-4116)
- Agilent 2-ml-Sammelplatte für Platten mit 96 viereckigen Wells (Best.-Nr. 5133009)
- Agilent Dichtungsdeckel für Platten mit 96 viereckigen Wells (Best.-Nr. 5133005)
- SPE 96 Verdampfer
- Multiröhrchen-Vortexer (VWR, PA, USA)
- Eppendorf-Pipetten und Mehrkanalpipette
- Pipettiergerät ViaFlo 96 (Integra, Hudson, NH, USA)

Gerätebedingungen

- Agilent 1290 Infinity quaternäre Pumpe (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity automatischer Probengeber (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity Säulenthermostat (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity Thermostat (G1330B)

Tabelle 1 führt die Parameter zur Erfassung der Analyten auf und Abbildung 1 zeigt das LC/MS/MS-Chromatogramm von 1 ng/ml Drogen in Urin. Die Peakidentifikation erfolgt nach der Elutionsreihenfolge, siehe Tabelle 1.

LC-Parameter	
Analytische Säule	Agilent Poroshell 120 EC-C8, 2,7 µm, 2,1 × 100 mm (695775-906T) Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 5 mm, 2,7 µm, Vorsäule (821725-911)
Säulentemperatur	50 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Mobile Phase A	5 mM Ammoniumformiat + 0,1 % Ameisensäure in Wasser
Mobile Phase B	0,1 % Ameisensäure in ACN
Flussrate	0,5 ml/min
Gradient	Konstant bei 5 % B bis 0,5 Minuten, Anstieg auf 50 % B bei 5 Minuten, Anstieg auf 95 % B bei 6 Minuten, Konstant bei 95 % B bis 7 Minuten
Nachlaufzeit	2 Minuten

MS/MS-Konfiguration und -Parameter

Agilent 6490 Triple Quadrupol LC/MS mit iFunnel (G6490A)	
MS/MS-Modus	Dynamisches MRM
Ionenmodus	Positiv
Trocknungsgastemperatur	250 °C
Trocknungsgasstrom	5 l/min
Zerstäuberdruck	45 psi
Sheathgas-Temperatur	325 °C
Sheathgas-Fluss	11 l/min
Kapillarspannung	3000 V
EMV	200 V
Nozzle Voltage	1500 V
iFunnel-Parameter	Hochdruck RF: 90 V (Pos), 90 V (Neg) Niederdruck RF: 70 V (Pos), 60 V (Neg)

Tabelle 1: Zieldrogen, Retentionszeiten und MRM-Parameter.

Analyt	Interner Standard	Retentionszeit (min)	Vorläuferion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)			
				Quantifizierung	CE (V)	Qualifizierung	CE (V)
Codein	IS 1	2,35	300,2	128,1	60	165,1	40
Oxycodon	IS 1	2,68	316,2	241,1	28	256,1	24
Amphetamin	IS 1	2,64	136,1	93,0	13	124,1	5
Amphetamin-d ₃ (IS 1)		2,64	141,1	91,1	20	119,1	10
MDA	IS 1	2,72	180,1	163,1	4	105,1	24
Hydrocodon	IS 1	2,84	300,2	128,1	60	199,1	28
Methamphetamin	IS 1	2,87	150,1	91,1	20	119,1	8
MDMA	IS 1	2,91	194,1	163,1	8	105,1	24
Strychnin	IS 1	3,10	335,2	184,1	40	156,1	40
Phentermin	IS 1	3,10	150,1	133,1	8	133,1	8
MDEA	IS 1	3,19	208,1	163,1	8	105,1	48
Heroin	IS 2	3,81	370,2	328,2	20	165,1	24
Kokain	IS 2	3,94	304,2	182,1	16	82,0	40
Kokain-d ₃ (IS 2)		3,94	307,2	185,1	30	82,0	48
Meperidin	IS 2	4,03	248,2	220,1	20	174,1	48
Trazodon	IS 2	4,35	372,2	176,1	24	148,1	16
PCP	IS 2	4,51	244,2	159,1	8	159,1	8
Nitrazepam	IS 2	5,20	282,1	180,1	40	236,1	24
Oxazepam	IS 2	5,27	287,1	241,1	20	104,1	40
Verapamil	IS 2	5,44	455,3	165,1	28	150,1	48
Lorazepam	IS 3	5,41	321,0	229,1	32	275,0	20
Alprazolam	IS 3	5,51	309,1	205,1	48	281,1	40
Methadon	IS 3	5,54	310,2	265,2	12	105,0	28
Temazepam	IS 3	5,73	301,1	177,0	44	255,1	16
Proadifen	IS 3	6,24	354,2	167,1	40	209,1	20
Diazepam	IS 3	6,18	285,1	193,1	32	154,1	24
Diazepam-d ₃ (IS 3)		6,18	290,1	198,1	32	154,1	24

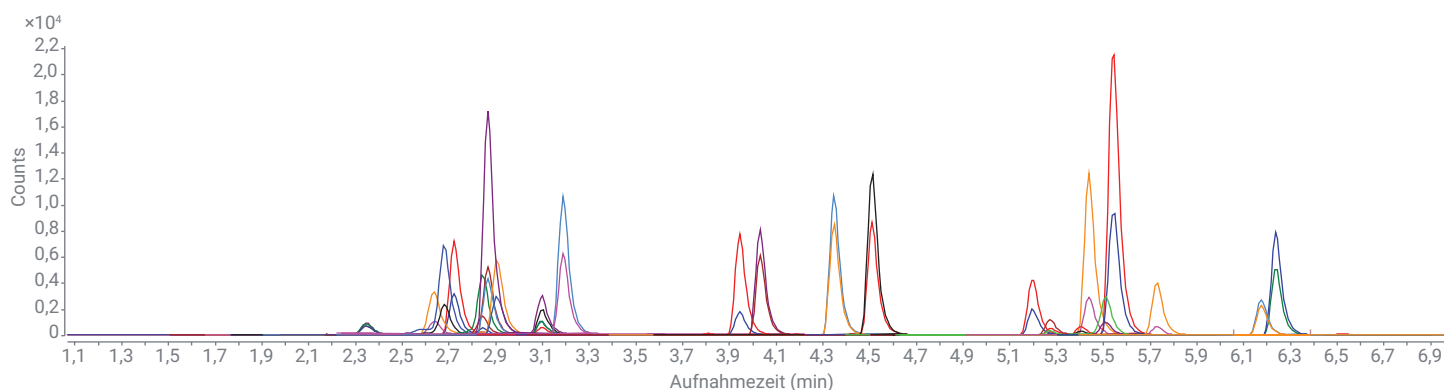


Abbildung 1: Überlagerte Darstellung der LC/MS/MS-MRM-Chromatogramme der 24 Drogen mit 1 ng/ml in Urin nach der Behandlung mit Agilent Chem Elut S.

Kalibrierungsstandards und QC-Probenvorbereitung

Die Drogenstandardlösung für die definierte Zugabe (1 µg/ml) wurde zur Herstellung von Kalibrierungsstandards in Humanurin verwendet. Der dynamische Bereich für die Kalibrierungskurve lag bei 0,1 bis 20 ng/ml bei Verwendung von Standards mit 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15 und 20 ng/ml. Reine Kalibrierungsstandardlösungen wurden in mobiler Phase A : ACN = 85 : 15 hergestellt und dann zum Wiederaufnehmen von Matrix-Blindproben verwendet, um auf die Matrix abgestimmte Kalibrierungskurven zu erstellen. Zu Urinproben wurden vor der Extraktion Qualitätskontrollproben (QC-Proben) mit drei unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben, extrahiert und zur Verifizierung der Wiederfindung und der Genauigkeit der Methode analysiert. Die verwendeten Konzentrationen waren die Quantifizierungsgrenze (LOQ) mit 0,1 ng/ml (mit Ausnahme von Amphetamin und Heroin mit 0,5 ng/ml), eine mittlere QC-Konzentration mit 1 ng/ml und eine hohe QC-Konzentration mit 20 ng/ml. Die internen Standards wurden den QC-Proben, Kalibratoren und Blindproben in einer Konzentration von 200 ng/ml zugefügt.

Verfahren zur Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem in Abbildung 2 gezeigten allgemeinen SLE-Protokoll. Es wurden die folgenden vier Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Wässrige Probe mit leichtem Überdruck/Vakuum aufgeben.
2. Probe auf dem Sorbens Chem Elut S fünf Minuten lang äquilibrieren lassen.
3. Ein nicht mit Wasser mischbares Lösemittel/Lösemittelgemisch zur Extraktion der Analyten zugeben.
4. Das organische Lösemittel mittels Schwerkraft eluieren, dann Überdruck/Vakuum anlegen, um die Platte zu entleeren.

Die Urinproben wurden vor ihrer Extraktion mit β -Glucuronidase behandelt, um die glykosylierten Drogen zu hydrolysieren. Es wurden verschiedene nicht mit Wasser mischbare Lösemittel untersucht: MTBE, Ethylacetat (EA) und Dichlormethan

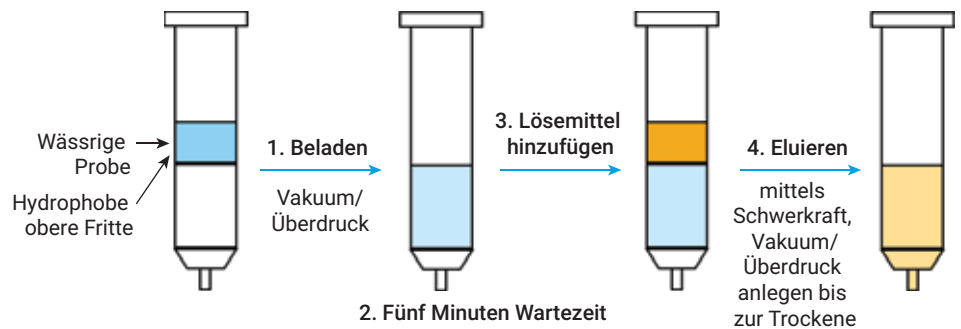


Abbildung 2: Darstellung des allgemeinen Arbeitsablaufs mit Agilent Chem Elut S.

(DCM). Aufgrund der höheren Wiederfindung und Reproduzierbarkeit wurde für die weiteren Arbeiten MTBE ausgewählt.

Enzymhydrolyse

1. Jeweils 200 µl einer Urinprobe in eine 2-ml-Sammelplatte geben. Anschließend 175 µl 100 mM Ammoniumacetatlösung (pH 4) und 25 µl β -Glucuronidase-Lösung (100 000 Einheiten/ml) zugeben.
2. Mischen und 30 Sekunden lang vortexen, danach 60 Minuten lang bei 40 °C im Wasserbad inkubieren.
3. Proben auf Raumtemperatur bringen, 20 µl 5 M Ammoniumhydroxid-Lösung zugeben und vortexen, um die Enzymreaktion zu stoppen.

SLE-Verfahren

1. Pipettiergerät für 96-Wellplates verwenden, um alle Proben der Sammelplatte in eine Chem Elut S 400 µl-Platte mit einer weiteren 2-ml-Sammelplatte darunter zu überführen. 2 bis 3 psi Druck anlegen, um die wässrigen Proben in das Sorbens zu überführen, bis in den Wells keine Flüssigkeit mehr zu sehen ist.
2. Fünf Minuten lang äquilibrieren lassen.
3. 900 µl organisches Lösemittel in die Wells zugeben und das Lösemittel durch Schwerkraft eluieren lassen. Ein zweites Elutionsvolumen von 900 µl organisches Lösemittel aufgeben (insgesamt 1800 µl).
4. 20 bis 30 Sekunden lang 3 bis 5 psi Druck anlegen, um das SLE-Bett vollständig zu trocknen.

Verdampfung und Rekonstitution

1. In jedes Well 10 µl einer 10%igen HCl-Lösung zugeben. Dieser Schritt ist optional und wird nur bei unakzeptabler Reproduzierbarkeit angewendet, wie sie für flüchtige Drogen wie Amphetamin beobachtet wird.
2. Sammelplatte in den Verdampfer für 96-Wellplates stellen und das Lösemittel bei 40 °C unter Stickstoff bis zur Trockene eindampfen.
3. Mit 200 µl Rekonstitutionslösung (mobile Phase A : ACN = 85 : 15) oder reinen Kalibrierungsstandard-Lösungen aufnehmen.
4. Obere Plattenmatte der aufliegen, vortexen, mit Ultraschall behandeln, zentrifugieren und zur LC/MS/MS-Analyse in den automatischen Probengeber stellen.

Verifizierung der Methode

Die Methode zur Analyse von Drogen in Urin mit Chem Elut S wurde auf Wiederfindung und Reproduzierbarkeit getestet. Ein Versuchsansatz bestand jeweils aus 2 Doppelblindproben, 8 Blindproben, zwei Sätzen mit 7 Kalibratoren und 6 QC-Proben auf jedem Konzentrationsniveau, wobei vor und nach den QC-Proben jeweils ein Satz an Kalibratoren bearbeitet wurde. Vor der Extraktion wurden dem Urin die isotope markierten internen Standards Amphetamin- d_3 , Kokain- d_3 und Diazepam- d_5 mit 200 ng/ml zugegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Linearität

Die Daten wurden mit der Agilent MassHunter Quantitative Analysis Software ausgewertet. Kalibrierungskurven ergaben R^2 -Werte zwischen 0,991 und 0,999 für alle Zieldrogen unter Verwendung einer linearen Regression und einer Gewichtung mit $1/x^2$.

Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Wie in der zusammenfassenden Tabelle 2 aufgeführt, lieferte die Studie gute Ergebnisse. Die Wiederfindungsraten lagen für alle Analyten, mit Ausnahme von Proadifen, bei 79,3 bis 117,4 % mit einer relativen Standardabweichung von < 16 %. Proadifen ergab durchgehend eine niedrige Wiederfindung (ungefähr 55 % für beide SLE-Methoden und

die LLE-Methode, aber eine gute Empfindlichkeit und eine hohe Reproduzierbarkeit mit einer relativen Standardabweichung zwischen 6,2 und 11,2 %). Die Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 0,1 ng/ml wurde für alle Verbindungen erreicht, mit Ausnahme von Amphetamin und Heroin (LOQ = 0,5 ng/ml) entweder aufgrund von Matrixinterferenzen oder aufgrund der Empfindlichkeit der Methode.

Tabelle 2: Experimentelle Parameter und Ergebnisse für Drogen mittels optimiertem Verfahren mit Chem Elut S.

Analyt	LOQ (ng/ml)	Kalibrierungsbereich (ng/ml)	Korrelationskoeffizient (R^2)	Durchschnittl. ME (% n = 6)	Konzentration der definierten Zugabe (ng/ml)	Durchschnittliche Wiederfindung in % (n = 6)	% RSD (n = 6)
Codein	0,1	0,1 – 20	0,9973	0	0,1	84,8	12,5
					1	103,4	7,1
					20	93,3	9,7
Oxycodon	0,1	0,1 – 20	0,9915	-8	0,1	91,3	4,3
					1	95,3	2,7
					20	92,4	1,3
Amphetamin	0,5	0,5 – 20	0,9932	-3	0,5	103,1	4,0
					1	106,6	3,9
					20	98,9	5,6
MDA	0,1	0,1 – 20	0,9946	-7	0,1	89,6	5,5
					1	107,5	4,0
					20	96,5	4,8
Hydrocodon	0,1	0,1 – 20	0,9981	-14	0,1	112,1	4,0
					1	104,7	8,7
					20	98,3	3,6
Methamphetamin	0,1	0,1 – 20	0,9977	-4	0,1	102,2	7,0
					1	105,3	3,8
					20	103,3	3,9
MDMA	0,1	0,1 – 20	0,9979	-4	0,1	83,5	6,7
					1	89,2	2,7
					20	88,4	7,6
Strychnin	0,1	0,1 – 20	0,9966	-8	0,1	91,1	15,7
					1	90,8	4,7
					20	90,1	3,0
Phentermin	0,1	0,1 – 20	0,9942	-1	0,1	89,6	8,6
					1	112,8	3,9
					20	101,7	5,4
MDEA	0,1	0,1 – 20	0,9991	-11	0,1	98,8	4,4
					1	99,9	6,2
					20	98,9	5,2
Heroin	0,5	0,5 – 20	0,9909	-9	0,5	84,5	6,3
					1	79,3	7,6
					20	86,8	4,1
Kokain	0,1	0,1 – 20	0,9925	-2	0,1	93,0	7,5
					1	98,5	10,3
					20	97,6	9,7
Meperidin	0,1	0,1 – 20	0,9982	-5	0,1	113,1	2,6
					1	117,2	8,9
					20	107,3	7,1

Analyt	LOQ (ng/ml)	Kalibrierungs- bereich (ng/ml)	Korrelationskoeffi- zient (R ²)	Durchschnittl. ME (% n = 6)	Konzentration der definierten Zugabe (ng/ml)	Durchschnittliche Wiederfindung in % (n = 6)	% RSD (n = 6)
Trazodon	0,1	0,1 – 20	0,9981	-4	0,1	109,2	6,6
					1	109,9	11,4
					20	107,3	4,8
PCP	0,1	0,1 – 20	0,9944	-15	0,1	102,6	4,2
					1	101,2	11,8
					20	96,6	3,1
Nitrazepam	0,1	0,1 – 20	0,9957	9	0,1	99,7	6,9
					1	109,5	14,9
					20	107,9	9,1
Oxazepam	0,1	0,1 – 20	0,9914	-9	0,1	116,4	12,0
					1	105,0	15,6
					20	86,8	9,6
Verapamil	0,1	0,1 – 20	0,9968	-6	0,1	93,2	6,1
					1	86,7	9,7
					20	88,9	6,6
Lorazepam	0,1	0,1 – 20	0,9920	0	0,1	105,3	9,0
					1	106,8	8,5
					20	97,6	11,2
Alprazolam	0,1	0,1 – 20	0,9985	-7	0,1	117,2	9,6
					1	111,1	9,3
					20	105,8	5,1
Methadon	0,1	0,1 – 20	0,9957	-6	0,1	102,3	5,7
					1	98,3	8,9
					20	97,3	6,5
Temazepam	0,1	0,1 – 20	0,9976	-8	0,1	117,4	8,1
					1	112,4	10,9
					20	93,5	9,8
Proadifen	0,1	0,1 – 20	0,9983	0	0,1	57,9	6,9
					1	52,8	11,2
					20	59,1	6,2
Diazepam	0,1	0,1 – 20	0,9969	1	0,1	94,3	5,7
					1	118,7	10,9
					20	111,3	5,7

Methoden- und Produktvergleich

Chem Elut S wurde hinsichtlich der Wiederfindung der Analyten und der Reproduzierbarkeit auch mit der LLE und der SLE auf DE-Basis eines anderen Anbieters verglichen (Abbildung 3). Für die Untersuchung der Wiederfindung wurden die Peakflächen der Analyten der QC-Proben verglichen, denen die Drogen definiert mit 1 ng/ml in Urin vor und nach der Extraktion zugegeben wurden. QC-Proben mit definierter Zugabe von Drogen vor der Extraktion wurden aus Urin-Blindproben hergestellt. Die Proben wurden mit der entwickelten SLE-Methode vorbereitet. QC-Proben mit definierter Zugabe von Drogen nach der Extraktion wurden durch Rekonstitution von Standards mit 1 ng/ml in Matrix-Blindproben nach der Extraktion hergestellt.

Für die SLE auf DE-Basis und die Anwendung von Chem Elut S wurde das gleiche Verfahren durchgeführt. Für die LLE wurde die gleiche Vorbehandlung durchgeführt und es wurden gleiche Proben- und Lösemittelvolumina verwendet. Bei der LLE erfolgte der Transfer des MTBE zur Trennung der Phasen dann allerdings manuell mit einer Pasteur-Pipette. Dadurch erforderte

die LLE mehr als 50 % mehr Zeit als die SLE und deutlich anspruchsvollere Arbeitsschritte mit Augenmerk auf Details.

Wie erwartet, ergab Chem Elut S eine hervorragende Wiederfindung und Genauigkeit für alle Drogen mit Ausnahme von Proadifen. Die SLE auf DE-Basis eines anderen Anbieters ergab akzeptable Wiederfindungsraten für die meisten Analyten, allerdings mit deutlich niedrigeren Wiederfindungsraten für einige Verbindungen. Die Reproduzierbarkeit war für die SLE auf DE-Basis besonders schlecht: bei sechs Verbindungen lag die relative Standardabweichung für sechs Replikate bei über 20 %. Die inkonsistenten Wasseradsorptionskapazitäten des DE-Sorbens führten zu einem unterschiedlichen Durchbruchverhalten der Proben von Well zu Well, was Inkonsistenzen bei der Probenvorbereitung verursachte. Die LLE-Methode ergab mit der SLE-Methode vergleichbare Wiederfindungsraten, mit Ausnahme von Oxycodon und Hydrocodon mit deutlich niedrigerer Wiederfindung. Im Vergleich lieferte Chem Elut S bessere Wiederfindungsraten und eine bessere Genauigkeit als die

LLE-Methode und die SLE-Methode auf DE-Basis eines anderen Anbieters. Die gleichen Ergebnisse zeigen sich auch in anderen biologischen Matrices wie beispielsweise Plasma. Sie werden in weiteren Application Notes vorgestellt.⁵

Probenvorbereitung mit Chem Elut S

Die Chem Elut S-Platten sind einfach und schnell in der Anwendung und ergaben für die Drogen hohe Analyt-Wiederfindungsraten und Präzision. Das synthetische Medium wird mit größter Sorgfalt hergestellt, um eine hohe Adsorptionskapazität der Probe, einheitliche Packung und optimale Flusseigenschaften zu gewährleisten. Chem Elut S-Platten sind für die SLE optimiert und enthalten keine Kunststoffe, ein großes Headspace-Volumen, einen umlaufenden Rahmen und eine viereckige obere Fritte, die wässrige Proben 60 Minuten lang oder länger zurückhalten kann, bis Überdruck/Vakuum angelegt wird. Die Produkte liefern eine hervorragende Datenqualität und Matrixentfernung (in Form der Salze und teilweise der Phospholipide), insbesondere für komplexe biologische Proben wie Plasma und Serum, und sind einfach in der Anwendung.⁵

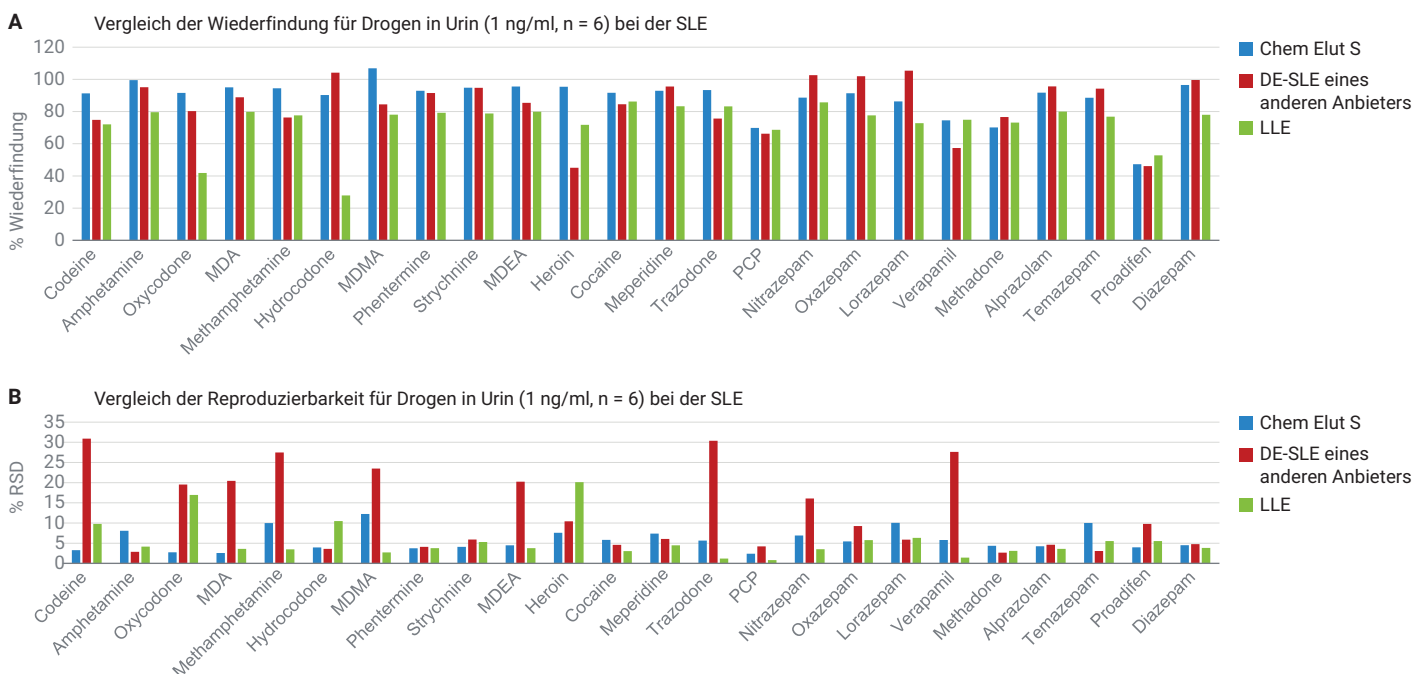


Abbildung 3: Vergleich von Wiederfindung und Reproduzierbarkeit für Drogen in Urin für Agilent Chem Elut S, SLE auf DE-Basis und LLE.

Abschließende Bemerkungen

Agilent Chem Elut S verwendet ein synthetisches Medium für die SLE, das entwickelt wurde, um Konsistenz und hohe Wasser-Adsorptionskapazität zu bieten, und liefert eine bessere Wiederfindung und Reproduzierbarkeit im Vergleich zu SLE-Produkten auf DE-Basis. Die entwickelte Methode, die Chem Elut S 400 µl-Platten verwendet, liefert eine hervorragende Wiederfindung und Reproduzierbarkeit für die Analyse von Drogen in Urin und bietet eine vereinfachte Plattform für schnelle, konsistente Analysen mit hohem Durchsatz und qualitativ hochwertige Ergebnisse ohne den mit der LLE verbundenen Aufwand. Chem Elut S eignet sich für eine große Bandbreite weiterer Proben- und Analyttypen, was in künftigen Publikationen vorgestellt wird.

Literatur

1. Eskridge, K. D.; Guthrie, S. K. Clinical Issues Associated with Urine Testing of Substances of Abuse. *Pharmacotherapy* **1997**, 17(3), 497–510.
2. Tang, M. H.; *et al.* Simultaneous Detection of 93 Conventional and Emerging Drugs of Abuse and Their Metabolites in Urine by UHPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analytl. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, 969, 272-284.
3. Rositano, J.; *et al.* Supported Liquid Extraction (SLE) for the Analysis of Methylamphetamine, Methylenedioxymethylamphetamine and Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Oral Fluid and Blood of Drivers. *Forensic Sci. Int.* **2016**, 265, 125–130.
4. Rosano, T. G.; Ohouo, P. Y.; Wood, M. Screening with Quantification for 64 Drugs and Metabolites in Human Urine using UPLC-MS-MS Analysis and a Threshold Accurate Calibration. *J. Anal. Toxicol.* **2017**, 41(6), 536-546.
5. Zhao, L. Quantitative Determination of a Panel of Endogenous Steroids in Human Serum by LC/MS/MS using Agilent Supported Liquid Extraction (SLE) Chem Elut S Plate. *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5994-0949EN.

www.agilent.com/chem

Für forensische Zwecke.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Gedruckt in den USA, 15. Mai 2019
5994-0950DEE

