

# Analisi di droghe d'abuso in urina umana usando l'estrazione liquida su supporto Agilent Chem Elut S mediante LC/MS/MS

## Autore

Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

## Abstract

Agilent Chem Elut S è un nuovo prodotto per la preparazione del campione che utilizza un adsorbente sintetico per l'estrazione liquida su supporto (SLE). Questa Nota applicativa mostra l'uso di piastre a 96 pozzetti Chem Elut S (400 mg) per l'analisi quantitativa di 24 droghe d'abuso (DOA) in urina umana mediante LC/MS/MS. Campioni di urina sono stati digeriti enzimaticamente con  $\beta$ -glucuronidasi e quindi caricati su piastre a 96 pozzetti Chem Elut S da 400 mg. Il campione acquoso è stato assorbito sul mezzo ed equilibrato per cinque minuti, quindi eluito con metil-*t*-butil etere (MTBE) per ottenere un estratto pulito contenente gli analiti target. L'accuratezza e la precisione del metodo sono state verificate e hanno evidenziato un recupero ( $100 \pm 20\%$ ) e una precisione (RSD  $<20\%$ ) eccellenti per tutti i composti tranne uno. Sono stati dimostrati vantaggi significativi rispetto ai metodi tradizionali di estrazione liquido-liquido (LLE) e SLE con terra di diatomee. I risultati indicano che Chem Elut S, basato su un adsorbente per SLE sintetico, permette una preparazione del campione rapida, semplice e costante per questa applicazione.

## Introduzione

In tossicologia forense, la quantificazione rapida e affidabile di DOA in campioni biologici è di grande interesse per i test di medicina legale.<sup>1-3</sup> Ciò è dovuto principalmente al numero crescente di DOA e di campioni da analizzare. Il test delle DOA in urina è uno dei test di medicina legale più comuni per lo screening e la quantificazione di DOA nel corpo umano. L'urina è meno complessa di altre matrici biologiche, come il plasma e il siero. Contiene, però, una grande quantità di sali, che possono interferire con l'affidabilità del test e l'utilizzabilità degli strumenti. È quindi necessaria un'appropriata preparazione del campione per la purificazione della matrice e l'estrazione delle DOA. Inoltre, gli analiti delle DOA sono spesso glucuronati e richiedono una digestione enzimatica con  $\beta$ -glucuronidasi prima della preparazione del campione per rilasciare le droghe libere per la successiva estrazione e analisi.<sup>4</sup>

Le tecniche comuni per preparare campioni per l'analisi delle DOA includono LLE, estrazione in fase solida (SPE) e SLE. La LLE può essere molto laboriosa in quanto necessita di una notevole miscelazione del campione, di una separazione manuale delle fasi e, occasionalmente, di una centrifugazione per rompere le emulsioni. Inoltre, la LLE è difficile e scomoda da automatizzare, a differenza della SLE. Nella SLE tradizionale, un campione acquoso viene caricato su un letto adsorbente contenente terra di diatomee (DE), su cui il campione si distribuisce come un film sottile. Un solvente non miscibile con acqua viene quindi fatto passare

attraverso il letto per SLE, dove estrae gli analiti target dal campione e li eluisce in una provetta di raccolta per il post-trattamento e l'analisi. Rispetto alla LLE tradizionale, la superficie di interazione tra fase acquosa e organica nella SLE è significativamente aumentata, il che migliora la ripartizione degli analiti dalla fase acquosa a quella organica e rende inutile il passaggio di miscelazione. Ciò permette significativi risparmi di tempo e manodopera rispetto alla LLE tradizionale, semplificando e migliorando la riproducibilità.

Inoltre la terra di diatomee (DE) è un materiale naturale, costituito da microrganismi fossili irregolari, ed è difficile controllare l'uniformità delle particelle di adsorbente da un lotto a un altro. La variabilità dell'adsorbente complica la fabbricazione del prodotto e il controllo della qualità e porta a incoerenze nelle prestazioni del prodotto. La DE può presentare una capacità di trattenere l'acqua inferiore e incostante rispetto ai mezzi sintetici. L'adsorbente Chem Elut S migliora notevolmente la capacità di trattenere l'acqua, l'uniformità da lotto a lotto e l'uniformità delle prestazioni. La struttura della piastra a 96 pozzetti offre un ampio spazio di testa per campioni ed eluente, un frit superiore quadrato che trattiene il campione finché non viene applicata pressione o vuoto, un bordo completo per la compatibilità hardware e una eluizione rapida e costante.

Questo studio utilizza piastre Chem Elut S a 96 pozzetti da 2 mL (400  $\mu$ L) per determinare quantitativamente 24 DOA nell'urina umana. Sono stati effettuati anche confronti sperimentali tra Chem Elut S, LLE e SLE basata su DE in termini di recupero, riproducibilità e facilità d'uso.

## Condizioni sperimentali

Tutti i reagenti e i solventi erano di grado HPLC o analitico. Metanolo (MeOH) e acetonitrile (ACN) sono stati acquistati da Honeywell (Muskegon, MI, USA) e il metil-t-butil etere (MTBE) è stato acquistato da VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, USA). Una soluzione concentrata di acido cloridrico (HCl, 38%) è stata ottenuta da VWR. Una soluzione stock standard di DOA combinate è stata ottenuta da Agilent Technologies (codice 5190-0470) e le soluzioni stock di standard interni (IS) (1 mg/mL) sono state acquistate da Cerilliant (Round Rock, TX, USA). L'enzima  $\beta$ -glucuronidasi è stato acquistato come soluzione (100.000 unità/mL) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'urina umana (Mass Spect Gold) è stata acquistata da Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, USA). Le soluzioni di reagenti sono state preparate fresche per ogni lotto per evitare la variabilità.

### Standard e soluzioni

Le soluzioni di arricchimento di standard e IS combinati sono state preparate alla concentrazione di 20  $\mu$ g/mL in MeOH diluendo il volume appropriato delle singole soluzioni stock. Tutte le soluzioni di arricchimento sono state conservate a -20 °C fino al momento dell'uso.

### Apparecchiatura e prodotti di consumo

- Agilent Chem Elut S 400  $\mu$ L (codice 5610-2004)
- Collettore a pressione positiva Agilent, PPM-96 (codice 5191-4116)
- Piastra di raccolta Agilent a 96 pozzetti quadrati da 2 mL (codice 5133009)
- Tappi di chiusura Agilent per 96 pozzetti quadrati (codice 5133005)
- Evaporatore SPE 96
- Vortexer multitubo (VWR, PA, USA)
- Dispensatore e pipette Eppendorf
- Sistema di gestione dei liquidi ViaFlo 96 (Integra, Hudson, NH, USA)

### Condizioni strumentali

- Pompa quaternaria Agilent 1290 Infinity (G4204A)
- Autocampionatore Agilent 1290 Infinity (G4226A)
- Comparto colonna termostato Agilent 1290 Infinity (G1316C)
- Termostato Agilent 1290 Infinity (G1330B)

La Tabella 1 mostra i parametri di acquisizione degli analiti e la Figura 1 mostra il cromatogramma LC/MS/MS di 1 ng/mL di DOA nell'urina. Si veda la Tabella 1 per l'identificazione dei picchi in base all'ordine di eluizione.

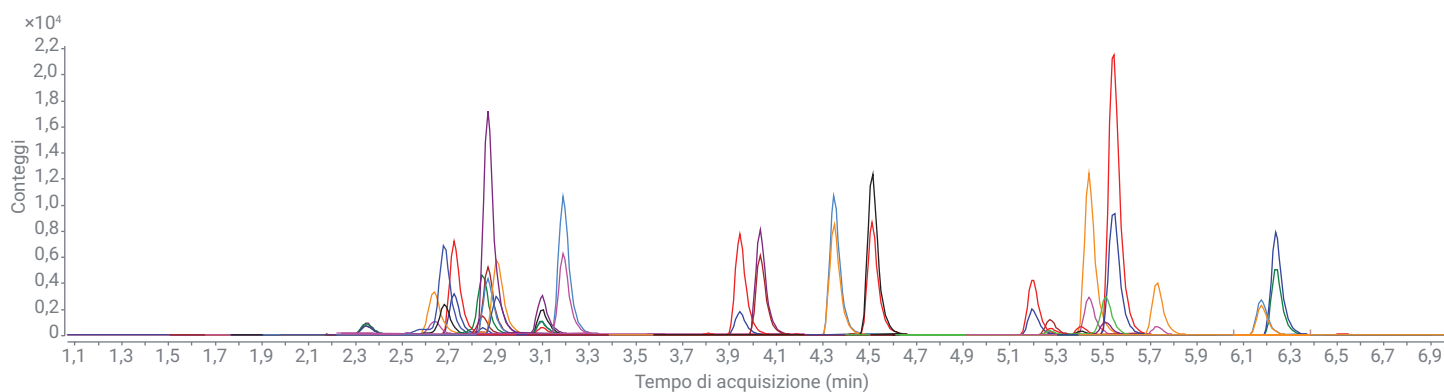
| Parametri LC              |                                                                                                                                                                 |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Colonna analitica         | Agilent Poroshell 120 EC-C8, 2,7 µm, 2,1 × 100 mm (695775-906T)<br>Precolumna Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 5 mm, 2,7 µm (821725-911)                     |
| Temperatura della colonna | 50 °C                                                                                                                                                           |
| Volume di iniezione       | 2 µL                                                                                                                                                            |
| Fase mobile A             | Formiato di ammonio 5 mM + acido formico 0,1% in acqua                                                                                                          |
| Fase mobile B             | Acido formico 0,1% in ACN                                                                                                                                       |
| Flusso                    | 0,5 mL/min                                                                                                                                                      |
| Gradiente                 | Mantenimento al 5% di B fino a 0,5 minuti<br>Incremento al 50% di B a 5 minuti<br>Incremento al 95% di B a 6 minuti<br>Mantenimento al 95% di B fino a 7 minuti |
| Tempo post-analisi        | 2 minuti                                                                                                                                                        |

### Configurazione e parametri MS/MS

| Sistema LC/MS a triplo quadrupolo Agilent 6490 con iFunnel (G6490A) |                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Modalità MS/MS                                                      | Dynamic MRM                                                                       |
| Modalità di ionizzazione                                            | Positiva                                                                          |
| Temperatura del drying gas                                          | 250 °C                                                                            |
| Flusso del drying gas                                               | 5 L/min                                                                           |
| Pressione del nebulizzatore                                         | 45 psi                                                                            |
| Temperatura dello sheath gas                                        | 325 °C                                                                            |
| Flusso dello sheath gas                                             | 11 L/min                                                                          |
| Tensione capillare                                                  | 3.000 V                                                                           |
| EMV                                                                 | 200 V                                                                             |
| Tensione ugello                                                     | 1.500 V                                                                           |
| Parametri iFunnel                                                   | RF alta pressione: 90 (Pos), 90 (Neg)<br>RF a bassa pressione: 70 (Pos), 60 (Neg) |

**Tabella 1.** Droghe target, tempo di ritenzione e parametri MRM.

| Analita                          | Standard interno | Tempo di ritenzione (min) | Ione precursore (m/z) | Ione prodotto (m/z) |        |                    |        |
|----------------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|--------|--------------------|--------|
|                                  |                  |                           |                       | Ione quantificatore | CE (V) | Ione qualificatore | CE (V) |
| Codeina                          | IS 1             | 2,35                      | 300,2                 | 128,1               | 60     | 165,1              | 40     |
| Ossicodone                       | IS 1             | 2,68                      | 316,2                 | 241,1               | 28     | 256,1              | 24     |
| Anfetamina                       | IS 1             | 2,64                      | 136,1                 | 93,0                | 13     | 124,1              | 5      |
| Anfetamina-d <sub>3</sub> (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     |
| Idrocodone                       | IS 1             | 2,84                      | 300,2                 | 128,1               | 60     | 199,1              | 28     |
| Metanfetamina                    | 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     |
| Stricnina                        | IS 1             | 3,10                      | 335,2                 | 184,1               | 40     | 156,1              | 40     |
| Fentermina                       | 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     |
| Eroina                           | IS 2             | 3,81                      | 370,2                 | 328,2               | 20     | 165,1              | 24     |
| Cocaina                          | IS 2             | 3,94                      | 304,2                 | 182,1               | 16     | 82,0               | 40     |
| Cocaina-d <sub>3</sub> (IS 2)    |                  | 3,94                      | 307,2                 | 185,1               | 30     | 82,0               | 48     |
| Meperidina                       | IS 2             | 4,03                      | 248,2                 | 220,1               | 20     | 174,1              | 48     |
| Trazodone                        | 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     |
| Metadone                         | 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 <sub>3</sub> (IS 3)   |                  | 6,18                      | 290,1                 | 198,1               | 32     | 154,1              | 24     |



**Figura 1.** Sovrapposizione dei cromatogrammi MRM LC/MS/MS di 24 droghe a 1 ng/mL nell'urina dopo trattamento con Agilent Chem Elut S.

## Preparazione di standard di calibrazione e di campioni per QC

La soluzione di arricchimento di standard di DOA (1 µg/mL) è stata usata per preparare gli standard della curva di calibrazione in urina umana. Il range dinamico per la curva di calibrazione è stato da 0,1 a 20 ng/mL e ha incluso standard a 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15 e 20 ng/mL. Le soluzioni pure di standard di calibrazione sono state preparate nella fase mobile A:ACN 85:15 e usate per ricostituire matrici in bianco per generare curve di calibrazione abbinate alla matrice. Tre livelli di campioni per il controllo qualità (QC) sono stati aggiunti all'urina prima dell'estrazione, quindi estratti e analizzati per verificare il recupero e la precisione del metodo, includendo il limite di quantificazione (LOQ) di 0,1 ng/mL, eccetto 0,5 ng/mL per anfetamina ed eroina, 1 ng/mL (QC intermedio) e 20 ng/mL (QC alto). Gli standard interni sono stati aggiunti a campioni per QC, calibratori e bianchi a 200 ng/mL.

## Procedura di preparazione del campione

La procedura di preparazione del campione è basata sul protocollo generale di SLE illustrato nella Figura 2. I quattro passaggi includono:

1. Caricamento del campione acquoso con pressione positiva/vuoto leggeri.
2. Equilibratura del campione nell'adsorbente Chem Elut S per cinque minuti.
3. Aggiunta di un solvente/miscela di solventi non miscibile con acqua per estrarre gli analiti.
4. Eluizione del solvente organico per gravità, quindi applicazione di pressione positiva/vuoto per asciugare la piastra.

I campioni di urina sono stati sottoposti a idrolisi pretrattamento con β-glucuronidasi per deglucuronare le droghe prima dell'estrazione. Sono stati sottoposti a screening diversi solventi non miscibili con acqua, tra cui MTBE, etilacetato (EA) e diclorometano (DCM);

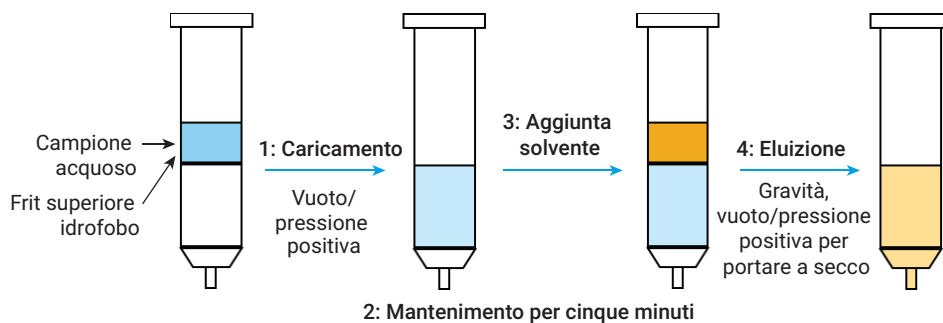


Figura 2. Diagramma del flusso di lavoro generale di Agilent Chem Elut S.

è stato scelto il MTBE perché recupero e riproducibilità erano migliori.

## Idrolisi enzimatica

1. Suddividere i campioni di urina in aliquote da 200 µL in una piastra di raccolta da 2 mL, aggiungere 175 µL di acetato di ammonio 100 mM (pH 4) e 25 µL di soluzione di β-glucuronidasi (100.000 unità/mL).
2. Miscelare e agitare in vortex per 30 secondi e incubare a 40 °C (bagnomaria) per 60 minuti.
3. Portare i campioni a temperatura ambiente, aggiungere 20 µL di idrossido di ammonio 5 M e agitare in vortex per arrestare la reazione enzimatica.

## Procedura dell'estrazione SLE

1. Utilizzare un sistema di gestione dei liquidi a 96 sonde per trasferire i campioni interi dalla piastra di raccolta alla piastra Chem Elut S da 400 µL con sotto un'altra piastra di raccolta da 2 mL. Applicare una pressione di 2-3 psi per guidare il campione acquoso nell'adsorbente finché nei pozzetti non è più visibile alcun liquido.
2. Equilibrare per cinque minuti.
3. Aggiungere 900 µL di solvente organico nei pozzetti e lasciare che il solvente eluisca per gravità. Ripetere con un secondo volume d'eluizione da 900 µL di solvente organico (1.800 µL in totale).

4. Applicare una pressione di 3-5 psi per 20-30 secondi per asciugare completamente il letto della SLE.

## Evaporazione e ricostituzione

1. Aggiungere in ogni pozzetto 10 µL di soluzione di HCl al 10%. Questo passaggio è opzionale e viene applicato solo nel caso in cui sia osservata una riproducibilità inaccettabile per droghe volatili come l'anfetamina.
2. Mettere la piastra di raccolta in un evaporatore a 96 pozzetti e portare a secco a 40 °C sotto flusso di azoto.
3. Ricostituire con 200 µL di soluzione di ricostituzione (fase mobile A/ACN 85:15) o soluzioni pure di standard di calibrazione, come appropriato.
4. Aggiungere il coperchio superiore della piastra, agitare in vortex, sottoporre a ultrasuoni, centrifugare e mettere nell'autocampionatore per l'analisi LC/MS/MS.

## Verifica del metodo

Sono stati testati recupero e riproducibilità del metodo Chem Elut S per l'analisi delle DOA nell'urina. I lotti consistevano in 2 bianchi doppi, 8 bianchi, due set di 7 calibratori e 6 campioni per QC a ogni livello; i campioni per QC erano inseriti tra due set di curve di calibrazione. Prima dell'estrazione sono stati aggiunti all'urina 200 ng/mL degli standard interni isotopici anfetamina-d<sub>3</sub>, cocaina-d<sub>3</sub> e diazepam-d<sub>5</sub>.

## Risultati e discussione

### Linearità

I dati sono stati elaborati con il software di analisi quantitativa Agilent MassHunter. Le curve di calibrazione hanno fornito valori di  $R^2$  compresi tra 0,991 e 0,999 per tutte le droghe target usando la regressione lineare e la ponderazione  $1/x^2$ .

### Recupero e riproducibilità

Lo studio ha prodotto risultati eccellenti, come mostrato dal riepilogo nella Tabella 2. I recuperi per tutti gli analiti tranne uno, proadifen, sono stati compresi tra il 79,3 e il 117,4% e la RSD è stata <16%. Proadifen ha costantemente presentato un basso recupero (circa il 55% per entrambi i metodi, SLE e LLE) ma una buona sensibilità e una elevata

riproducibilità (RSD % da 6,2 a 11,2). Il LOQ di 0,1 ng/mL è stato raggiunto per tutti i composti tranne anfetamina ed eroina (LOQ = 0,5 ng/mL), a causa dell'interferenza dovuta alla matrice o della sensibilità del metodo.

**Tabella 2.** Parametri sperimentali e risultati relativi alle droghe d'abuso in urina usando una procedura Chem Elut S ottimizzata.

| Analita       | LOQ (ng/mL) | Intervallo di calibrazione (ng/mL) | Coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) | ME media (% n = 6) | Concentrazione di arricchimento (ng/mL) | Recupero medio % (n = 6) | %RSD (n = 6) |
|---------------|-------------|------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------|--------------------------|--------------|
| Codeina       | 0,1         | 0,1 - 20                           | 0,9973                                 | 0                  | 0,1                                     | 84,8                     | 12,5         |
|               |             |                                    |                                        |                    | 1                                       | 103,4                    | 7,1          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 20                                      | 93,3                     | 9,7          |
| Ossicodone    | 0,1         | 0,1 - 20                           | 0,9915                                 | -8                 | 0,1                                     | 91,3                     | 4,3          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 1                                       | 95,3                     | 2,7          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 20                                      | 92,4                     | 1,3          |
| Anfetamina    | 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          |
| Idrocodone    | 0,1         | 0,1 - 20                           | 0,9981                                 | -14                | 0,1                                     | 112,1                    | 4,0          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 1                                       | 104,7                    | 8,7          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 20                                      | 98,3                     | 3,6          |
| Metanfetamina | 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          |
| Stricnina     | 0,1         | 0,1 - 20                           | 0,9966                                 | -8                 | 0,1                                     | 91,1                     | 15,7         |
|               |             |                                    |                                        |                    | 1                                       | 90,8                     | 4,7          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 20                                      | 90,1                     | 3,0          |
| Fentermina    | 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          |
| Eroina        | 0,5         | 0,5 - 20                           | 0,9909                                 | -9                 | 0,5                                     | 84,5                     | 6,3          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 1                                       | 79,3                     | 7,6          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 20                                      | 86,8                     | 4,1          |
| Cocaina       | 0,1         | 0,1 - 20                           | 0,9925                                 | -2                 | 0,1                                     | 93,0                     | 7,5          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 1                                       | 98,5                     | 10,3         |
|               |             |                                    |                                        |                    | 20                                      | 97,6                     | 9,7          |
| Meperidina    | 0,1         | 0,1 - 20                           | 0,9982                                 | -5                 | 0,1                                     | 113,1                    | 2,6          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 1                                       | 117,2                    | 8,9          |
|               |             |                                    |                                        |                    | 20                                      | 107,3                    | 7,1          |

| Analita    | LOQ<br>(ng/mL) | Intervallo di<br>calibrazione<br>(ng/mL) | Coefficiente di<br>correlazione<br>(R <sup>2</sup> ) | ME media<br>(% n = 6) | Concentrazione<br>di arricchimento<br>(ng/mL) | Recupero<br>medio %<br>(n = 6) | %RSD<br>(n = 6) |
|------------|----------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Trazodone  | 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             |
| Metadone   | 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             |

### Confronto tra metodi e prodotti

Chem Elut S è stato confrontato anche con LLE e una SLE basata su DE di un concorrente in termini di recupero e riproducibilità (Figura 3). I recuperi degli analiti sono stati studiati confrontando l'area del loro picco con campioni per QC pre-aricchiti e post-aricchiti a 1 ng/mL in urina. I campioni per QC pre-aricchiti sono stati correttamente arricchiti nel bianco di urina e sono stati preparati con il metodo SLE sviluppato. I campioni per QC post-aricchiti sono stati preparati ricostituendoli con 1 ng/mL di standard in matrici in bianco dopo l'estrazione.

Le stesse procedure sono state usate per la SLE basata su DE e Chem Elut S. La LLE ha usato gli stessi pretrattamenti, campioni e volumi di solvente ma ha richiesto il trasferimento manuale di MTBE con una pipetta Pasteur per separare le fasi. Di conseguenza, la LLE ha impiegato il 50% di tempo in più rispetto alla SLE e ha richiesto sforzi dell'analista e tempi significativamente superiori.

Come previsto, Chem Elut S ha presentato recupero e precisione eccellenti per tutte le droghe tranne proadifen. La SLE basata su DE del concorrente ha presentato recuperi accettabili per la maggior parte degli analiti ma significativamente inferiori per molti composti. La riproducibilità è stata particolarmente scarsa per la SLE basata su DE, con sei composti oltre il 20% di RSD per sei replicati. La capacità non costante dell'adsorbente DE di trattenere l'acqua ha determinato una degradazione variabile dei campioni da un pozzetto all'altro, che ha causato incoerenze durante la preparazione del campione. Il metodo LLE ha fornito recuperi comparabili al metodo SLE tranne per ossicodone e idrocodone, per i quali sono stati molto inferiori. Chem Elut S ha presentato recupero e precisione superiori rispetto alla LLE e alla SLE basata su DE del concorrente. Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche in altre matrici biologiche, come il plasma, e saranno evidenziati in applicazioni distinte.<sup>5</sup>

### Preparazione del campione con Chem Elut S

Le piastre Chem Elut S sono risultate facili da usare, rapide, e hanno fornito un elevato recupero e precisione degli analiti per le DOA. Il mezzo sintetico viene fabbricato attentamente per fornire un'elevata capacità di trattenimento del campione, un impaccamento uniforme e caratteristiche di flusso ottimali. Le piastre Chem Elut S sono ottimizzate per la SLE e includono materie plastiche pulite, ampio volume dello spazio di testa, bordo completo e un frit superiore quadrato in grado di trattenere i campioni acquosi per 60 o più minuti, finché non viene applicata pressione positiva o vuoto. Queste caratteristiche forniscono un'eccellente qualità dei dati, facilità d'uso e rimozione efficiente della matrice (ossia di sali e fosfolipidi parziali), specialmente per campioni biologici complessi come il plasma e il siero.<sup>5</sup>



**Figura 3.** Confronto tra Agilent Chem Elut S, SLE con terra di diatomee e LLE in termini di recupero e riproducibilità delle DOA nell'urina.

## Conclusione

Agilent Chem Elut S utilizza un mezzo sintetico per SLE progettato per risultati costanti ed elevata capacità di trattenere acqua e fornisce recupero e riproducibilità migliori rispetto ai prodotti per SLE basata su DE. Il metodo sviluppato usando le piastre Chem Elut S da 400 µL ha presentato recupero e riproducibilità eccellenti per l'analisi delle DOA nelle urine, usando una piattaforma semplificata per un'analisi rapida, costante e ad alta produttività e risultati di qualità senza i fastidi associati alla LLE. Un'ampia varietà di altri tipi di campioni e analiti beneficiano di Chem Elut S e saranno trattati in future pubblicazioni.

## Bibliografia

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. *Nota applicativa di Agilent Technologies*, numero di pubblicazione 5994-0949EN.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

**Per uso forense.**

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Stampato negli Stati Uniti, il 15 maggio 2019  
5994-09501TE

