

Analisi forense di droghe d'abuso con il GC Agilent 8890

Autore

Abbey Fausett
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

La nota applicativa presenta un metodo per l'identificazione accurata di droghe comunemente sottoposte a screening. Il flusso di lavoro ha incluso un GC Agilent 8890, un rivelatore MSD Agilent 5977A, un campionatore automatico per liquidi Agilent 7693A e una colonna ad elevata efficienza Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert. Questo metodo permette di ottenere una risoluzione eccellente di droghe comuni ed è altamente riproducibile.

Introduzione

La conferma analitica delle sostanze stupefacenti richiede un elevato livello di affidabilità dei dati e un margine di errore estremamente basso. La presenza nei campioni forensi di droghe d'abuso, sia da strada che soggette a prescrizione medica, è spesso confermata usando tecniche gascromatografiche (GC) abbinate alla spettrometria di massa a singolo quadrupolo (MS), note anche come GC/MS. Le analisi delle droghe confiscate spesso non prevedono la quantificazione ma si affidano a spettri di massa ad alta qualità riconosciuti da confronti con librerie. Per ottenere una migliore corrispondenza degli spettri dei picchi, la cromatografia deve essere ottimizzata e i sistemi devono essere sottoposti abitualmente a manutenzione. Molte pubblicazioni Agilent hanno dimostrato il successo di condizioni analitiche che prevedono l'impiego di colonne di dimensioni standard per MS, sia in studi su droghe confiscate¹ che in studi forensi o clinici^{2,3}. Nella presente nota applicativa, è stata selezionata una colonna ad elevata efficienza per la valutazione con il GC 8890. Le colonne ad elevata efficienza richiedono un eccellente controllo della pressione a causa del loro minore diametro interno e della maggiore restrizione. L'EPC di sesta generazione, disponibile sul GC 8890, dimostra controllo e precisione eccezionali nell'erogazione delle pressioni necessarie per flussi GC/MS inferiori a 2 mL/min. Il GC 8890 può implementare e registrare contatori di manutenzione configurabili dall'utilizzatore, eventi diagnostici e altri parametri di sistema, apportando un nuovo livello di affidabilità ai dati acquisiti. Il GC 8890 integra inoltre funzioni dei GC Agilent di precedente generazione, come il retention time locking, prodotti di consumo trattati per essere inerti e un'interfaccia software familiare.

Condizioni sperimentali

Il flusso di lavoro prevedeva un GC 8890 con iniettore split/splitless, un rivelatore MSD 5977 e un campionatore automatico per liquidi (ALS) Agilent 7693A. Per acquisire ed elaborare i dati è stato usato il software per GC/MS Agilent MassHunter. Lo standard da 5 µg/mL usato nell'analisi era una miscela di controllo per tossicologia forense per GC/MS Agilent (codice 5190-0471). Questa miscela a 28 composti contiene anfetamine, oppiacei, benzodiazepine e altre droghe comunemente sottoposte a screening. Per lo screening degli analiti

è stata usata una colonna Ultra Inert (UI) ad elevata efficienza e per ridurre al minimo la discriminazione all'iniettore è stato usato un liner UI a bassa caduta di pressione¹. In generale, le colonne ad elevata efficienza richiedono l'iniezione di quantità molto più basse di campione perché si sovraccaricano facilmente. Il modo più semplice per ottenere tale risultato è di utilizzare, nel metodo, un maggiore rapporto di splittaggio. In alternativa, un'ulteriore diluizione dei campioni può essere di aiuto quando si effettua una separazione con una colonna ad elevata efficienza.

Tabella 1. Prodotti di consumo utilizzati per l'acquisizione dei dati sulle droghe d'abuso.

Codice	Descrizione
Siringa per ALS	Siringa per ALS Agilent, 10 µL, Blue Line (codice G4513-80204)
Vial, certificati per MS	5182-0716
Setti	Advanced Green (codice 5183-4761)
Liner	Liner per iniettore, UI, bassa caduta di pressione (codice 5190-2295)
Colonna	Agilent J&W DB-5ms UI, 30 m × 180 µm × 0,18 µm (codice 121-5522UI)
Extractor lens	9 mm (codice G3870-20449)

Tabella 2. Condizioni del metodo per le droghe d'abuso con il GC 8890.

Parametro	Valore
Dimensione della siringa	10 µL
Volume di iniezione	1 µL
Tipo di iniettore	Split/splitless
Modalità dell'iniettore	Split
Temperatura dell'iniettore	250 °C
Flusso splittaggio	30 mL/min
Rapporto di splittaggio	20:1
Tempo del gas saver	Off min
Modalità di spurgo del setto	Standard
Septum purge	3 mL/min
Gas di trasporto	Elio
Colonna	J&W DB-5ms UI, 20 m × 180 µm, 0,18 µm
Flusso in colonna	1,5 mL/min
Equilibratura del forno	1 min
Programma del forno	95 °C, 20 °C/min fino a 300 °C, isoterma 3,5 minuti
Tempo di analisi GC	13,75 minuti
Transfer line per MSD	280 °C

Tabella 3. Condizioni analitiche per le droghe d'abuso con un GC/MSD 5977 (Extractor).

Condizioni del GC/MSD 5977	
Parametro	Valore
Sorgente	Extractor, lente da 9 mm
Pompa da alto vuoto	Turbo
Modalità	Scansione
Intervallo	m/z tra 40 e 500
Algoritmo di tune	Etune
Temperatura sorgente	250 °C
Temperatura del quadrupolo	175 °C

Risultati e discussione

Durante l'ottimizzazione del metodo, il sovraccarico è stato più evidente con i composti anfetaminici, per cui il rapporto di splittaggio è stato ottimizzato sulla base della forma dei picchi di tali composti. La rilevazione di lorazepam, oxazepam e trazadone è risultata ridotta in quanto questi composti producono già una bassa risposta rispetto agli altri farmaci della miscela. Solitamente, le conferme vengono effettuate a concentrazioni relativamente alte, con conseguenti rapporti di splittaggio maggiori rispetto a quanto mostrato con questo campione a concentrazione intermedia. La risposta con uno splittaggio 20:1 è stata sufficiente a integrare con successo i picchi, estrarre gli spettri e generare una elevata corrispondenza per lorazepam, oxazepam e trazadone in queste condizioni ma la loro risposta inferiore richiede una spiegazione.

Con la colonna ad elevata efficienza è stata ottenuta una risoluzione eccellente. Tutti i 28 picchi sono stati facilmente identificati e, quando gli spettri risultanti sono stati elaborati usando una libreria NIST, ogni picco è stato correttamente identificato come migliore corrispondenza, fornendo match score eccellenti. L'implementazione della sottrazione del fondo, specialmente a temperatura maggiore, ha migliorato significativamente la qualità della corrispondenza. La Figura 1 mostra un cromatogramma ionico totale (TIC) rappresentativo e la Tabella 4 presenta un riepilogo dei composti.

Sono stati eseguiti studi di riproducibilità e la deviazione standard relativa (RSD) del tempo di ritenzione di tutti i composti è risultata compresa tra 0

e 0,08% escludendo la d-anfetamina e la fentermina. La maggior parte dei composti ha mostrato una RSD del tempo di ritenzione dello 0,03% su 25 iniezioni replicate. Questi due composti sono stati rimossi dall'analisi statistica a causa della loro limitata interazione con le fasi in quanto eluiscono immediatamente dopo la coda del solvente. Rapporti di splittaggio

maggiori migliorano la riproducibilità delle prime anfetamine ma sacrificano la risposta di oxazepam, lorazepam e trazadone. Si è lavorato per migliorare la risposta di questi composti⁴ usando colonne per GC/MS tradizionali con diametri da 250 µm. Questi tentativi sono utili anche per le colonne ad elevata efficienza.

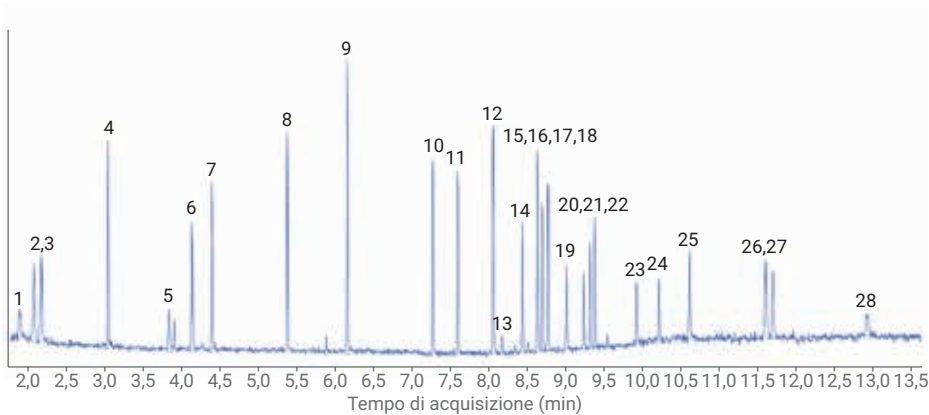


Figura 1. TIC di un'iniezione di una miscela di droghe (splittaggio 20:1 di 5 µg/mL, intervallo completo di scansione m/z da 40 a 500).

Tabella 4. Riepilogo dei composti.

Indice	Composto	RT
1	d-anfetamina	1,85
2	Fentermina	2,05
3	Metanfetamina	2,14
4	Nicotina	3,03
5	MDA	3,83
6	MDMA	4,14
7	MDEA	4,40
8	Meperidina	5,40
9	Fenciclidina	6,19
10	Metadone	7,35
11	Cocaina	7,68
12	Proadifen	8,14
13	Oxazepam	8,26
14	Codeina	8,53
15	Lorazepam	8,61
16	Diazepam	8,73
17	Idrocodone	8,79

Indice	Composto	RT
18	THC	8,86
19	Ossicodone	9,10
20	Temazepam	9,33
21	Flunitrazepam	9,41
22	Eroina	9,47
23	Nitrazepam	10,02
24	Clonazepam	10,31
25	Alprazolam	10,72
26	Verapamil	11,71
27	Stricnina	11,81
28	Trazadone	13,04

Conclusione

Questo metodo ha prodotto un'eccellente risoluzione delle droghe analizzate e tutti e 28 i componenti sono stati accuratamente identificati. I tempi di ritenzione, inoltre, sono risultati riproducibili su 25 iniezioni, con RSD pari allo 0,03% determinate per la maggior parte dei composti. L'iniettore split/splitless del GC 8890 offre un controllo termico e pneumatico preciso generando dati di alta qualità con l'uso di colonne per GC e GC/MS ad elevata efficienza. Il sovraccarico delle colonne è il principale timore quando si impiegano colonne ad elevata efficienza, quindi esse sono un'opzione ideale quando:

- È possibile utilizzare rapporti di splittaggio maggiori.
- I volumi di iniezione possono essere ridotti.
- I composti di interesse sono impurezze o è noto che si trovano a basse concentrazioni.

Spesso, i vantaggi in termini di velocità fanno propendere per la scelta di colonne ad elevata efficienza ma nella loro adozione si devono considerare la quantità da iniettare, l'intervallo di calibrazione e la risoluzione desiderata. Il software Agilent Method Translator⁵ è uno strumento ideale per facilitare la valutazione e il confronto delle impostazioni gascromatografiche e include il calcolo della capacità della colonna. Il GC 8890 è un sistema di nuova generazione che offre funzioni di tecnologia intelligente pur garantendo la compatibilità con tutti i prodotti di consumo Agilent comprovati in un flusso di lavoro.

Bibliografia

1. Zhao, L.; Quimby, B., Analysis of Drugs of Abuse by GC/MS using the Ultra Inert Inlet Liners with Wool. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-7596EN, **2011**.
2. Quimby, B. Improved Forensic Toxicology Screening Using a GC/MS/NPD System with a 725-Compound DRS Database. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-8582EN, **2008**.
3. Churley, M.; Rodriguez, L. C. Effettua lo screening di un maggior numero di sostanze d'abuso con l'analizzatore GC/MS Agilent per tossicologia con sorgente ad alta efficienza. *Agilent Technologies Nota Applicativa*, publication number 5991-6294ITE, **2015**.
4. Dang, N. A. Analyze Drugs of Abuse with Agilent J&W Ultimate Plus Tubing in an Inert Flowpath. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5303EN, **2016**.
5. Agilent YouTube channel, Method Translator Education Series, <https://www.youtube.com/watch?v=Q-359Q4qD-Q>.

www.agilent.com/chem

Per uso forense.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.