

## Авторы:

Lizhong Yang

Chengyuan Cai

PerkinElmer Inc. Shanghai, China

Saba Hariri

Tyrally Ordinario

Feng Qin

Jingcun Wu

PerkinElmer Inc.

Woodbridge, Canada

## Определение 44 сильнодействующих веществ в моче методом ВЭЖХ-МС/МС

### Введение

Злоупотребление сильнодействующими препаратами и их незаконный оборот оказывают пагубное воздействие на здоровье людей, является причиной социальных проблем и порождает преступность. В современном мире масштаб наркотической угрозы вышел на один уровень с международным терроризмом, поэтому определение сильнодействующих препаратов в различных матрицах имеет первостепенное значение для токсикологических и судебно-медицинских исследований.

Цель данного исследования – разработка быстрого и чувствительного метода количественного определения 44 сильнодействующих препаратов в моче с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС.

### Экспериментальная часть

#### Оборудование и программное обеспечение.

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ PerkinElmer LX50 с масс-спектрометрическим детектором QSign 220 (масс-анализатор - тройной квадруполь) с двойным источником ионизации. Управление прибором, сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Simplicity 3Q™ (PerkinElmer).

#### Пробоподготовка.

0.5 мл образца мочи помещали в пробирку для центрифугирования вместимостью 10 мл, добавляли 2 мл ацетонитрила, встряхивали содержимое пробирки в течение 2 минут и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 3 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и анализировали.

#### Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра представлены в таблицах 1, 2 и 3.

**Таблица 1. Хроматографические условия.**

<b>Хроматографическая колонка</b>	Kinetex Biphenyl, 100 x 2.1 мм, 2.6 мкм	
<b>Температура термостата</b>	40°C	
<b>Вводимый объем</b>	2 мкл	
<b>Скорость потока</b>	0.35 мл/мин	
<b>Программа градиентного элюирования</b>		
<b>Время (мин)</b>	<b>Подвижная фаза А (%)</b>	<b>Подвижная фаза В (%)</b>
	5 mM формиат аммония и 0.1% муравьиная кислота	Ацетонитрил
<b>0</b>	<b>90</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>10</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>10</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>90</b>	<b>10</b>
<b>7</b>	<b>90</b>	<b>10</b>

**Таблица 2. Параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора.**

<b>Параметр</b>	<b>Значение</b>
<b>Режим ионизации</b>	ESI +
<b>Осушающий газ</b>	100 единиц
<b>Распыляющий газ</b>	150 единиц
<b>Напряжение ESI +</b>	5500 В
<b>Температура источника</b>	500°C

Таблица 3. Времена удерживания  $t_R$  и параметры MRM переходов определяемых соединений.

Компонент	$t_R$ (мин)	Родительский ион (m/z)	Дочерний ион (m/z)	CE (эВ)*
Морфин	1.70	286.2	201.1	-33
		286.2	165.1	-50
Эфедрин	1.95	166.2	148.1	-17
		166.2	133.1	-28
Амфетамин	2.10	136.0	91.0	-29
		136.0	119.1	-11
6-Ацетилморфин	2.22	328.2	165.2	-49
		328.2	211.1	-34
Кодеин	2.23	300.3	199.2	-39
		300.3	165.1	-53
Метамфетамин	2.27	150.0	119.1	-15
		150.0	91.0	-29
3,4-Метилendioкси амфетамин (MDA)	2.28	180.2	163.1	-14
		180.2	135.0	-26
Оксикодон	2.32	316.2	298.2	-24
		316.2	241.2	-40
3,4-Метилendioкси метамфетамин (MDMA)	2.42	194.2	163.2	-18
		194.2	135.0	-29
Этилморфин	2.50	314.2	165.1	-63
		314.2	229.1	-33
3,4-Метилendioкси-N-этил амфетамин (MDEA)	2.57	208.2	163.1	-18
		208.2	133.2	-28
Мепробамат	2.68	219.2	158.3	-13
		219.2	97.1	-22
Бензоилэксгонин	2.70	290.2	168.1	-26
		290.2	105.1	-44
Трамадол	2.73	264.3	58.0	-58
		264.3	246.2	-15
Норкетамин	2.77	224.2	207.1	-16
		224.2	125.0	-33
Меперидин	2.85	248.3	174.2	-28
		248.3	220.2	-29
Кетамин	2.88	238.2	125.0	-38
		238.2	179.2	-24
7-Аминоклоназепам	2.92	286.2	121.1	-41
		286.2	222.2	-33
Кокаин	2.92	304.2	182.2	-26
		304.2	151.1	-36
Кокаэтилен	3.08	318.2	151.1	-35
		318.2	196.2	-27
Доксепин	3.28	280.3	107.2	-33
		280.3	220.2	-34
Фентанил	3.28	337.3	188.3	-31
		337.3	105.2	-50
Флуразепам	3.38	388.2	315.2	-31
		388.2	288.2	-33
Декстрометорфан	3.43	272.2	147.2	-41
		272.2	213.2	-35

Компонент	$t_R$ (мин)	Родительский ион (m/z)	Дочерний ион (m/z)	CE (эВ)*
Фенциклидин	3.45	244.3	86.2	-16
		244.3	159.1	-20
Лоразепам	3.48	321.1	275.1	-30
		321.1	303.0	-19
Бупренорфин	3.50	468.3	55.2	-85
		468.3	187.1	-58
Нортриптилин	3.52	264.3	233.2	-20
		264.3	191.1	-28
Клоназепам	3.55	316.2	270.1	-33
		316.2	214.1	-50
Оксазепам	3.57	287.2	269.1	-21
		287.2	241.1	-30
2-Этилиден-1,5-диметил-3,3- дифенилпирролидин (EDDP)	3.58	278.3	234.2	-41
		278.3	249.2	-32
Амитриптилин	3.58	278.3	233.2	-23
		278.3	191.2	-32
Нитразепам	3.60	282.2	236.2	-32
		282.2	180.1	-51
Дезалкилфлуразепам (Норфлуразепам)	3.60	289.2	140.0	-41
		289.2	226.2	-39
Метадон	3.70	310.3	265.3	-19
		310.3	105.0	-38
Флунитразепам	3.80	314.2	268.2	-33
		314.2	239.2	-45
Триазолам	3.82	343.1	308.1	-33
		343.1	315.1	-36
Эстазолам	3.85	295.2	267.1	-31
		295.2	205.2	-52
Темазепам	3.85	301.2	255.2	-29
		301.2	283.1	-18
Ниметазепам	3.88	296.2	250.2	-34
		296.2	222.2	-39
Алпразолам	3.90	309.2	281.2	-33
		309.2	274.2	-33
Мидазолам	3.97	326.2	291.2	-35
		326.2	244.1	-34
2-Этил-5-метил-3,3- дифенилпирролидин (EMDP)	4.17	264.3	220.1	-40
		264.3	235.2	-30
Тетрагидроканнабинол (THC)	4.32	315.3	193.1	-29
		315.3	259.2	-26
SKF-525A**	3.74	354.3	209.3	-25
		354.3	167.3	-37
d5-Диазепам**	3.50	290.2	198.2	-45
		290.2	159.2	-36

\*- CE (эВ) - (Collision energy) – энергия соударений.

\*\* - Внутренний стандарт.

## Обсуждение результатов

MRM хроматограммы определяемых соединений с концентрацией 5.0 мкг/л представлены на рисунке 1. Как видно из рисунка 1, время анализа 44 определяемых компонентов составляет около 4.5 минут.

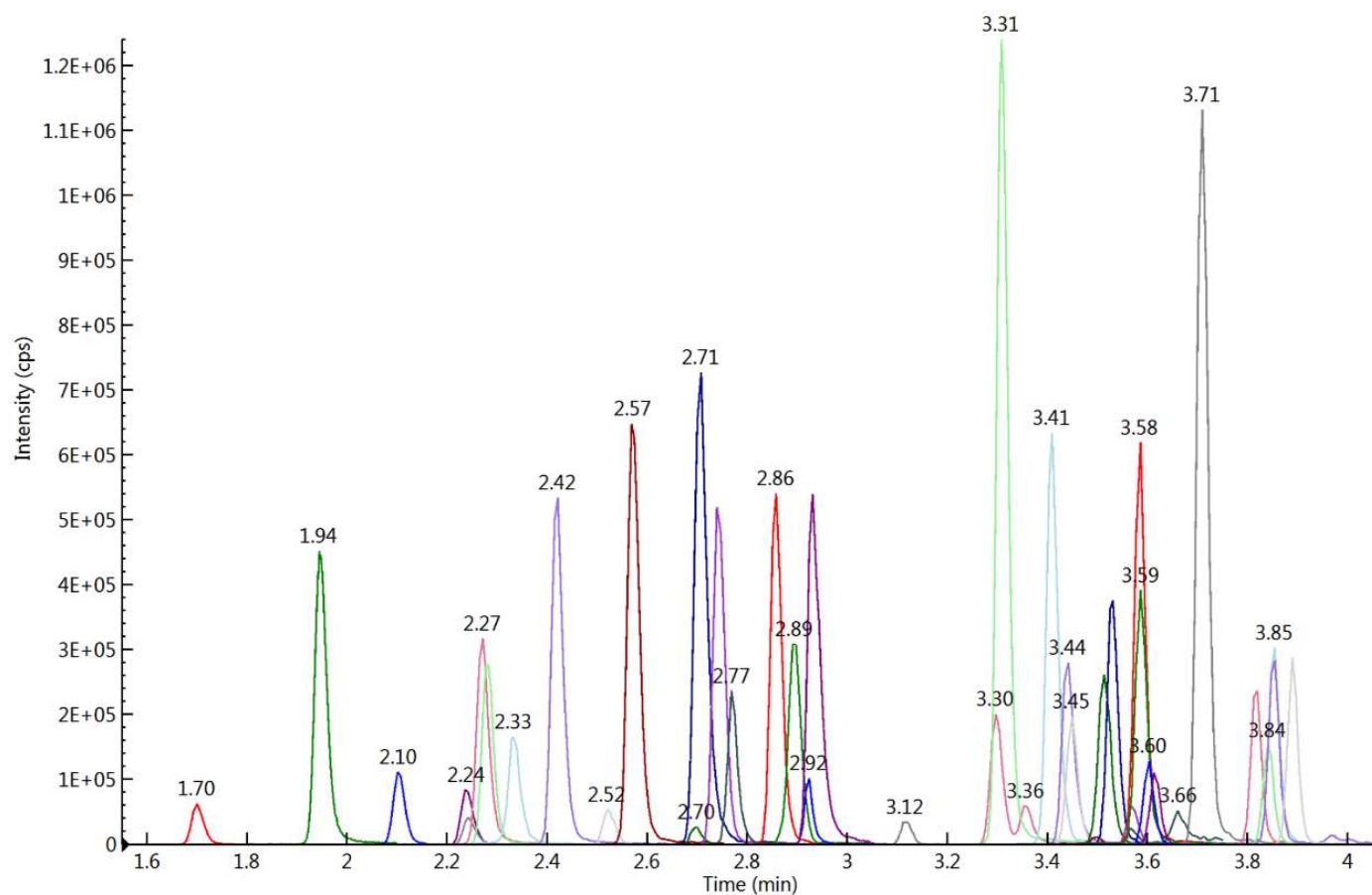


Рисунок 1. MRM хроматограммы определяемых соединений с концентрацией 5.0 мкг/л.

Примеры типичных калибровочных кривых некоторых широко употребляемых сильнодействующих веществ (эфедрин, клоназепам, 7-аминоклоназепам, amitриптилин, декстрометорфан, трамадол, меперидин, фенциклидин и мепробамат) показаны на рисунке 2. Калибровочные кривые имели хорошую линейность – квадрат коэффициента линейной корреляции определяемых компонентов для диапазона концентраций от 0.5 до 80 мкг/л был более 0.997 ( $R^2 > 0.997$ ).

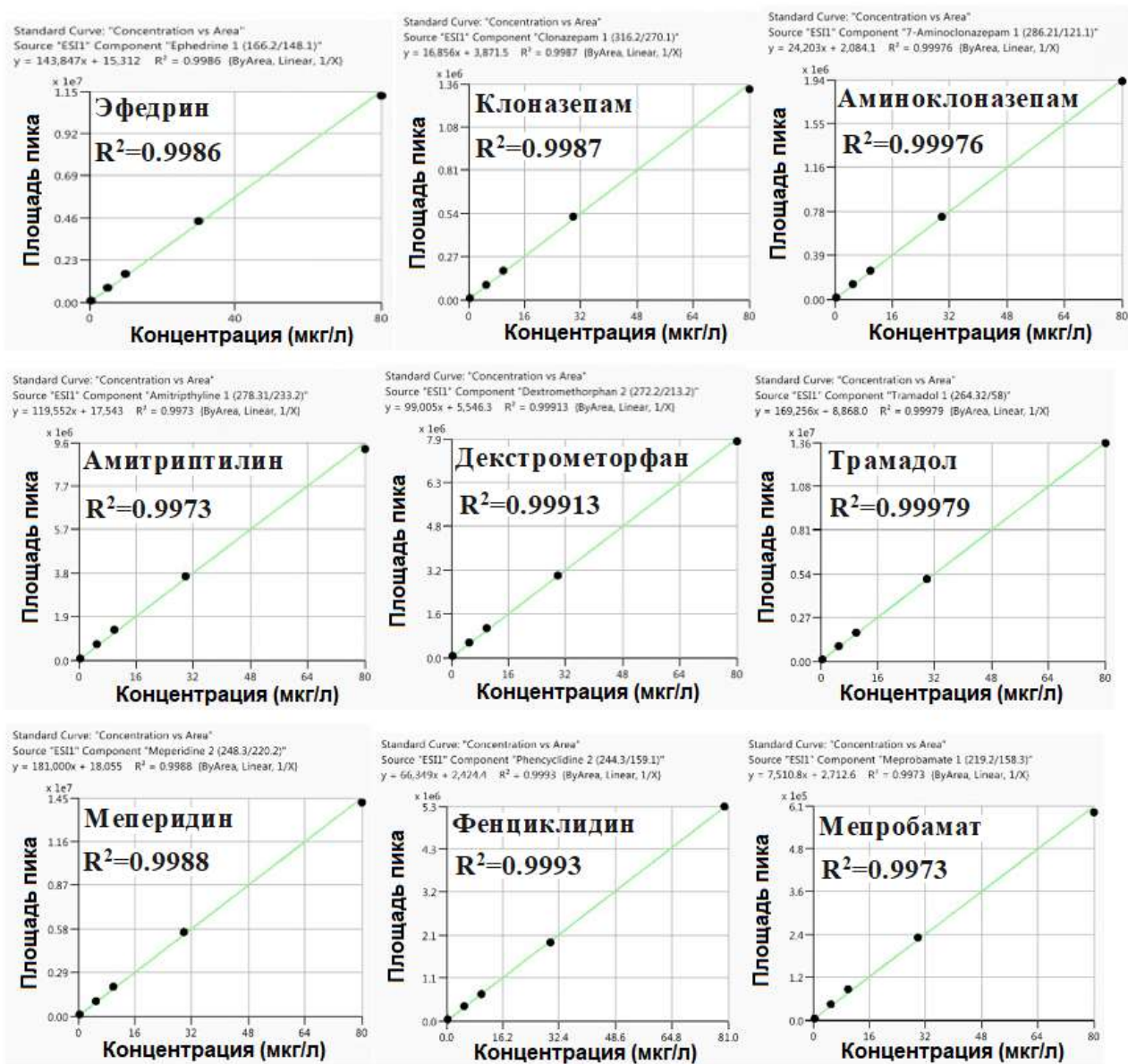


Рисунок 2. Калибровочные кривые эфедрина, клоназепама, 7-аминоклоназепама, амитриптилина, декстрометорфана, трамадола, меперидина, фенциклидина и мепробамата (диапазон концентраций 0.5 - 80 мкг/л).

Установленные пределы количественного определения (ПКО) варьировались от 0.025 до 2.5 мкг/мл в зависимости от компонента и приведены в таблице 4.

Для определения степени извлечения использовали образцы мочи (образцы с добавкой) с концентрацией целевых компонентов равной 1 мкг/л за исключением оксазепама и темазапама, чьи концентрации были равны 2.5 мкг/л. Как видно из таблицы 4, установленные значения степеней извлечения лежат в диапазоне от 83.6% до 120.2% с СКО <7%.

Таблица 4. Значения ПКО, степени извлечения (СИ) и СКО% для определяемых компонентов.

Компонент	ПКО (мкг/л)	СИ (%)	СКО (%)
Морфин	0.50	85.2	3.2
Эфедрин	0.50	83.6	2.1
Амфетамин	0.50	117.1	5.3
6-Ацетилморфин	0.50	114.3	4.9
Кодеин	0.50	93.1	5.2
Метамфетамин	0.50	120.2	3.1
3,4-Метилendioкси амфетамин (MDA)	0.50	95.6	1.9
Оксикодон	0.50	90.2	5.6
3,4-Метилendioкси метамфетамин (MDMA)	0.30	102.9	2.0
Этилморфин	0.30	93.2	3.6
3,4-Метилendioкси-N-этил амфетамин (MDEA)	0.30	96.5	2.8
Мепробамат	0.90	90.7	6.1
Бензоилэкгонин	0.05	116.3	3.9
Трамадол	0.05	109.8	4.2
Норкетамин	0.25	89.7	3.9
Меперидин	0.025	94.9	1.3
Кетамин	0.05	111.8	0.9
7-Аминоклоназепам	0.05	106.2	1.6
Кокаин	0.10	112.5	3.4
Кокаэтилен	0.10	100.9	3.8
Доксепин	0.50	98.6	2.6
Фентанил	0.025	113.8	1.8
Флуразепам	0.15	109.2	5.3
Декстрометорфан	0.15	87.9	3.6
Фенциклидин	0.50	86.9	5.9
Лоразепам	1.0	118.8	5.2
Бупренорфин	0.50	90.6	4.1
Нортриптилин	0.1	96.6	2.9
Клоназепам	1.0	104.3	6.2
Оксазепам	2.50	98.6	5.3

Компонент	ПКО (мкг/л)	СИ (%)	СКО (%)
2-Этилиден-1,5-диметил-3,3-дифенилпирролидин (EDDP)	0.25	113.9	2.7
Амитриптилин	0.15	116.1	2.9
Нитразепам	0.50	97.2	4.3
Дезалкилфлуразепам (Норфлуразепам)	0.30	83.9	5.6
Метадон	0.10	85.3	4.9
Флунитразепам	0.75	108.5	4.7
Триазолам	0.40	119.6	5.6
Эстазолам	0.30	98.1	4.6
Темазепам	2.5	102.3	6.3
Ниметазепам	0.50	94.6	3.3
Алпразолам	0.20	86.9	2.5
Мидазолам	0.15	89.3	2.9
2-Этил-5-метил-3,3-дифенилпирролидин (EMDP)	0.10	92.1	3.9
Тетрагидроканнабинол (THC)	0.90	107.6	5.3

### Заклучение

В данном исследовании разработан простой и быстрый метод количественного определения 44 сильнодействующих препаратов в моче с помощью ВЭЖХ-МС/МС QSight 220 (PerkinElmer). Полученные результаты демонстрируют хорошую чувствительность, селективность, линейность и степень извлечения, что позволяет использовать данный метод для скрининга и количественного определения целевых компонентов в токсикологических и криминалистических исследованиях.

**Scheltec авторизованный дистрибьютор PerkinElmer в странах СНГ, Грузии и Монголии**

<http://www.scheltec.ru>

PerkinElmer, Inc.  
940 Winter Street  
Waltham, MA 02451 USA  
P: (800) 762-4000 or  
(+1) 203-925-4602  
[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)



For a complete listing of our global offices, visit [www.perkinelmer.com/ContactUs](http://www.perkinelmer.com/ContactUs)

Copyright ©2020, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.