



LC/MS/MS Approaches for Identifying emerging NPS...

Considerations for Targeted LC-MS Assays

Современные тенденции в судебной токсикологии Виртуальный / Интернет симпозиум

Хостинг RTI и ForensicED Рекламные
компании Agilent Technologies

Май 23, 2018

Overview

- Сравнение целевых подходов LC-QTOF-МС и ЖХ-МС-МС
- Конкретные проблемы в судебной токсикологии
- Аналитические соображения для количественных анализов
- Метод разработки и проверки соображения
- Преимущества подхода HRMS

Generally Held Beliefs

- **ЖХ-МС-МС**

- Более чувствительны
- Предпочтительный метод для целевой количественной оценки
- Обилие опубликованных методов
- Общепринятый
- Понятно хорошо

- **ЖХ-МС-QTOF**

- Предпочтительный метод для качественной идентификации (например, метаболиты)
- Менее широко используется для количественной оценки целевой
- Более сложный сбор данных
- Меньшее количество опубликованных методов для количественного определения
- Круче кривой обучения

Realities....

- Как производительность LC-QTOF-MS Измеряемый?
- Подумайте за чувствительности анализа ...
- При каких ситуациях может LCQTOF-MS быть выгодным?
- Потенциально превзойти LC-MSMS?



General Challenges

- Распространение АПЛ
 - Массивная нагрузка для разработки метода
 - *количественный* анализ столь необходимый (для установления интерпретирующих баз знаний)
- Многие соединения с аналогичными структурами
 - Изомеры
 - Постоянно развивается
- Разработка методов и время проверки потребление
 - Меченные изотопами внутренние стандарты и метаболиты могут быть недоступны

Question...

Может ЖХ-МС-QTOF превосходят ЖХ-МС-МС для
количественного анализа?

Answer...

Иногда.....

Examples

- Приведите примеры, связанные с выполнением анализа для методов, разработанных и проверенных в нашей лаборатории
- Случаи, когда ЖХ-МС-QTOF превзошли LCMS-MS в ходе экспериментов по валидации
- Сделано нас переосмыслить наш подход и общепринятые убеждения
- Общие темы / факторы в количественных показателях для анализа
- Мы можем сделать лучший выбор авансом? До развития?

Side-by-Side Comparisons

- ЖХ-МС-QTOF

- Компания Agilent 6530
AccurateMass Q-TOF-MS
- 1290 Система Бесконечность
Binary LC

- ЖХ-МС-МС

- Agilent 6470 QQQ
- 1290 Система Бесконечность
Binary LC

#1

Cathinones in Blood and Urine



Journal of Chromatography B

Volume 1035, 1 November 2016, Pages 91-103



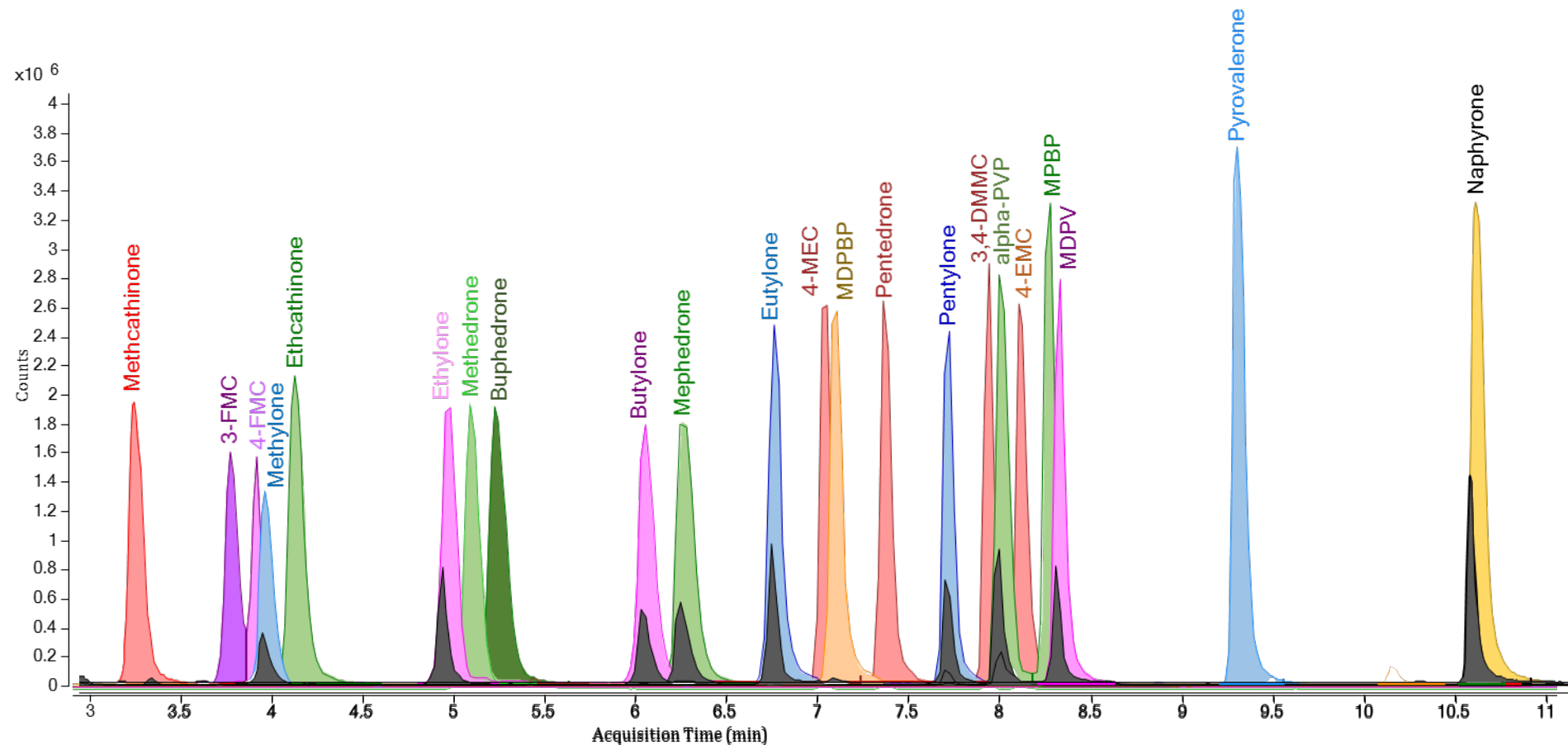
Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry

Lindsay Glicksberg, Kelsie Bryand, Sarah Kerrigan PhD  

Cathinones in Blood & Urine

- Целенаправленный анализ на 22 катинон в крови и моче
- Девять дейтерированных доступны во время анализа
- Выделение с помощью SPE
- Количественный анализ с помощью LC-MS-QTOF
- Poroshell 120 EC-C18 (2.1x100 мм, 2,7 мкм)
- МП ФА (0,1%) в DIW / ACN
- Проверка в соответствии с рекомендациями SWGTOX

Chromatographic Separation



Validation Summary

параметр	Кровь	урина
Калибровка модели	Квадратичные, 1 / x	
Предел обнаружения	1 - 5 нг / мл	0,25 - 5 нг / мл
Предел количественного определения	1 - 5 нг / мл	0,25 - 5 нг / мл
Inter-анализа точности (n = 15)	3 - 12%	2 - 12%
Точность внутри пробы (n = 3)	0 - 17%	0 - 11%
Уклон (n = 15)	- 7 - 11%	- 3 - 12%
Точность (n = 15)	93 - 111%	97 - 112%
Аналитическое восстановление (n = 4)	81 - 91%	84 - 104%
Матричные эффекты (n = 10)	- 15 - 3%	- 21 - -1%
Целостность Разбавление	2- и 4-кратное	
Интерференционные исследования (> 50 препаратов)	Нет качественные помехи, наблюдаемые в каждой матрице	

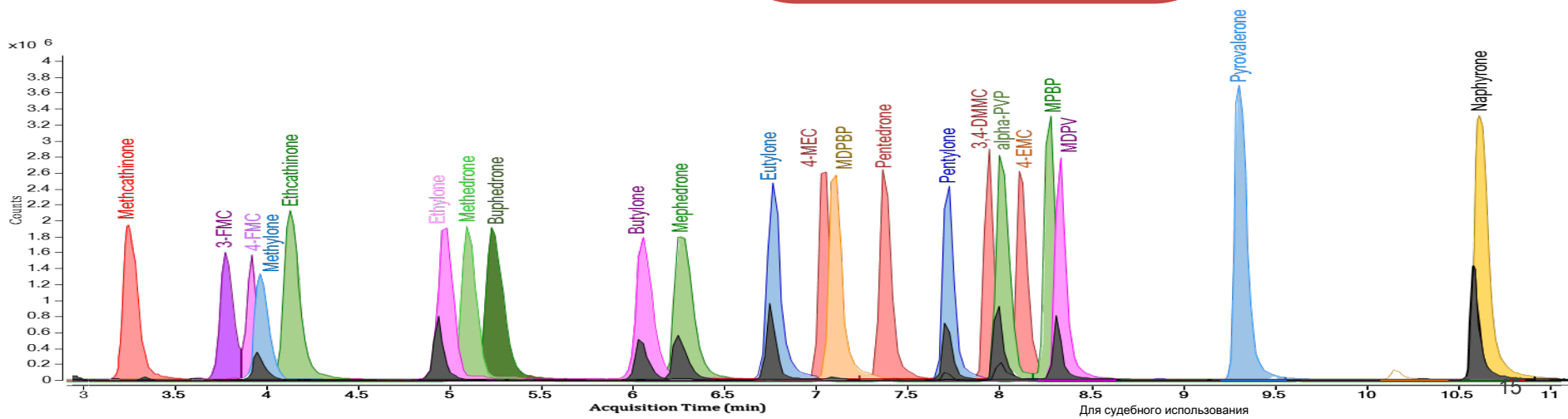
Interference Studies

- Матричные помехи (N = 10)
- Внутренний стандарт
- Другие препараты (> 50)
 - 25 амфетамина типа
- Качественная интерференция
 - NEG и POS QCs
- **Количественная интерференция**
 - Использование POS БОК (10 & 100 нг / мл) с 10- и 100-кратным избытком другого лекарственного средства (1000 нг / мл)

Quantitative Interferences

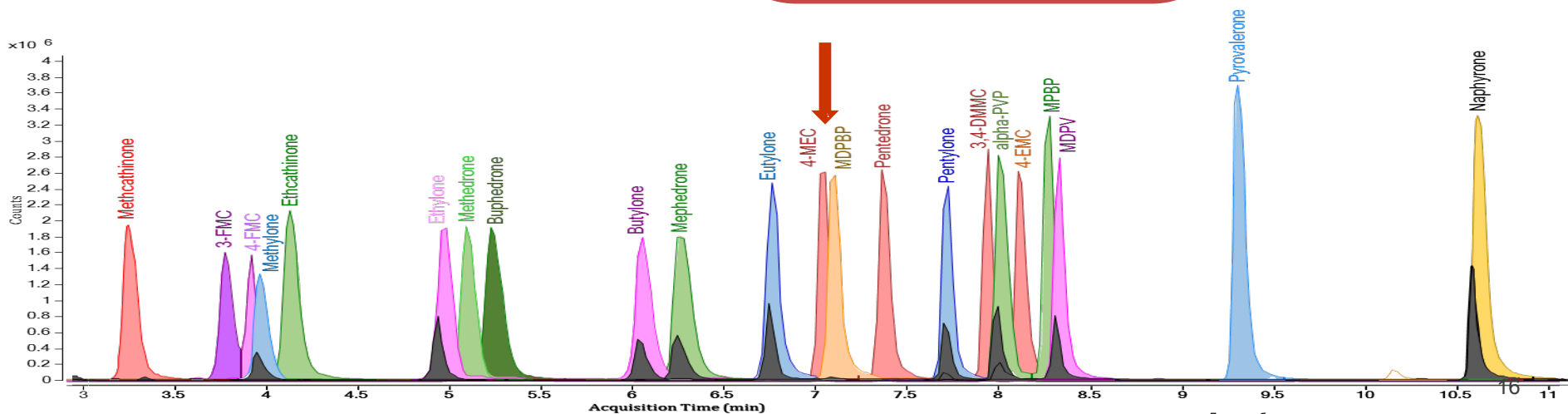
Cathinone Assay

Наркотики [M + H]	ЯВЛЯЕТСЯ	RT (мин)	предвзятость	Уклон (10: 1)	Уклон (100: 1)	Interferent
4-MEC [192]	Mephedrone-D3	7,20	-8,1	- 55%	- 75%	Кетамин (7,25 м)
MDPBP [262]	Eutylone-Д5	7,28	4,3	- 41%	- 77%	Кетамин (7,25 м)
MPBP [232]	Naphyrone-Д5	8,44	-1,0	- 40%	- 25%	Кокаин (8,5 м)
3,4-DMMC [192]	Methylone-D3	8,13	-0.7	- 51%	- 71%	2С-С (8,2 м)
Ethcathinone [178]	Бутилон-D3 (6,31 мин)	4,30	0.0	+ 49%	+ 89%	2С-Н (6,27 м)



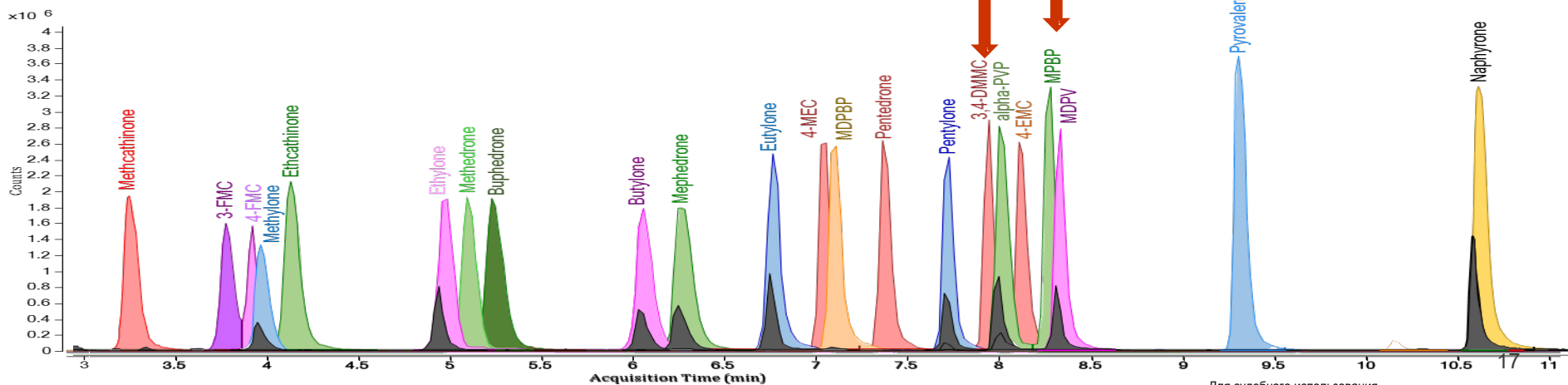
Interferences

Наркотики [M + H]	ЯВЛЯЕТСЯ	RT (мин)	предвзятость	Уклон (10: 1)	Уклон (100: 1)	Interferent
4-MEC [192]	Mephedrone-D3	7,20	-8,1	- 55%	- 75%	Кетамин (7,25 м)
MDPBP [262]	Eutylone-D5	7,28	4,3	- 41%	- 77%	Кетамин (7,25 м)
MPBP [232]	Naphyrone-D5	8,44	-1,0	- 40%	- 25%	Кокаин (8,5 м)
3,4-DMMC [192]	Methylone-D3	8,13	-0.7	- 51%	- 71%	2C-C (8,2 м)
Ethcathinone [178]	Бутилон-D3 (6,31 мин)	4,30	0.0	+ 49%	+ 89%	2C-H (6,27 м)



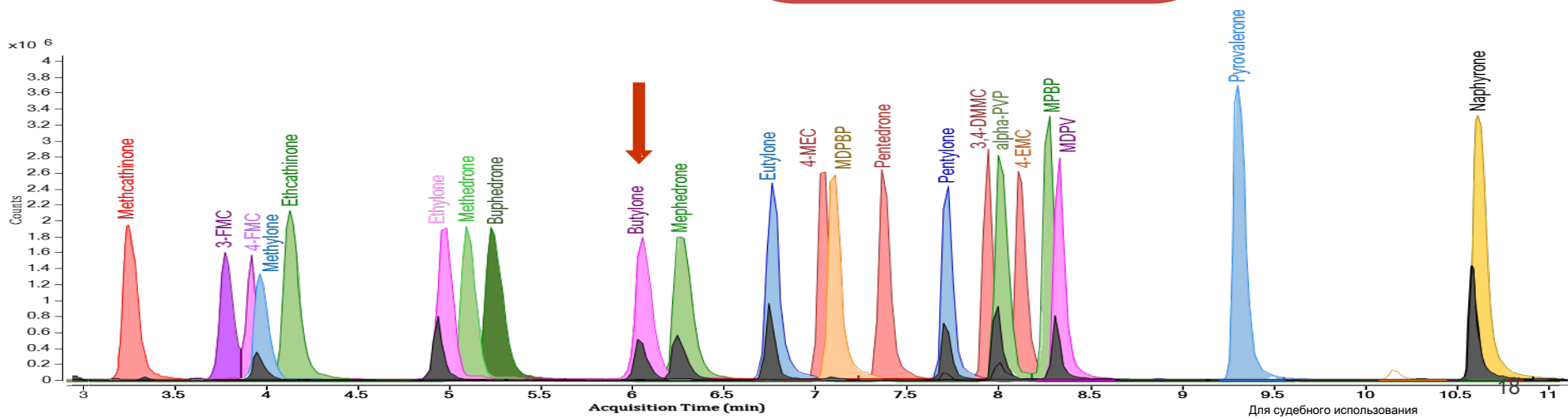
Interferences

Наркотики [M + H]	ЯВЛЯЕТСЯ	RT (мин)	предвзятость	Уклон (10: 1)	Уклон (100: 1)	Interferent
4-MEC [192]	Mephedrone-D3	7,20	-8,1	- 55%	- 75%	Кетамин (7,25 м)
MDPBP [262]	Eutylone-Д5	7,28	4,3	- 41%	- 77%	Кетамин (7,25 м)
MPBP [232]	Naphyrone-Д5	8,44	-1,0	- 40%	- 25%	Кокаин (8,5 м)
3,4-DMMC [192]	Methylone-D3	8,13	-0.7	- 51%	- 71%	2С-С (8,2 м)
Ethcathinone [178]	Бутилон-D3 (6,31 мин)	4,30	0.0	+ 49%	+ 89%	2С-Н (6,27 м)



Interferences

Наркотики [M + H]	ЯВЛЯЕТСЯ	RT (мин)	предвзятость	Уклон (10: 1)	Уклон (100: 1)	Interferent
4-MEC [192]	Mephedrone-D3	7,20	-8,1	- 55%	- 75%	Кетамин (7,25 м)
MDPBP [262]	Eutylone-D5	7,28	4,3	- 41%	- 77%	Кетамин (7,25 м)
MPBP [232]	Naphyrone-D5	8,44	-1,0	- 40%	- 25%	Кокаин (8,5 м)
3,4-DMMC [192]	Methylone-D3	8,13	-0.7	- 51%	- 71%	2C-C (8,2 м)
Ethcathinone [178]	Бутилон-D3 (6,31 мин)	4,30	0.0	+ 49%	+ 89%	2C-H (6,27 м)



Interferences

Наркотики [М + Н]	ЯВЛЯЕТСЯ	RT (мин)	предвзятость	Уклон (10: 1)	Уклон (100: 1)	Interferent
4-MEC [192]	Mephedrone-D3	7,20	-8,1	- 55%	- 75%	Кетамин (7,25 м)
MDPBP [262]	Eutylone-D5	7,28	4,3	- 41%	- 77%	Кетамин (7,25 м)
MPBP [232]	Naphyrone-D5	8,44	-1,0	- 40%	- 25%	Кокаин (8,5 м)
3,4-DMMC [192]	Methylone-D3	8,13	-0.7	- 51%	- 71%	2С-С (8,2 м)
Ethcathinone [178]	Бутилон-D3 (6,31 мин)	4,30	0.0	+ 49%	+ 89%	2С-Н (6,27 м)

- Интерференция независимо от иона-предшественника
- Значительное смещение, вызванное coeluting / близко элюирование препарата (отрицательное смещение)
- Величина смещения увеличивается с увеличением [помехи]
- Снижение эффективности ионизации (конкуренция со стороны interferent)
- Положительное смещение в связи с coelution из interferent с ЯВЛЯЕТСЯ
- Подчеркивается важность меченных изотопами внутренних стандартов

Problem....

- Нет качественную интерференции присутствующей
- Количественные помехи присутствовать из-за coeluting препарата
 - 11 минут выполнения (не быстро ЖХ)
 - Невозможно исключить возможность *Любые* coeluting вещество
- Отсутствие индикации помех от RT, соотношения ионов
 - Помехи, следовательно, невидимые для аналитика / обозревателя
- **Больше внимания количественным помех, необходимых в дальнейшем развитии анализа**
- ЖХ-МС-QTOF и ЖХ-МС-МС одинаково восприимчивы?

#2

Suvorexant (Belsomra®) in Blood & Urine

Identification of Suvorexant in Urine Using Liquid Chromatography–Quadrupole/Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC–Q/TOF–MS)

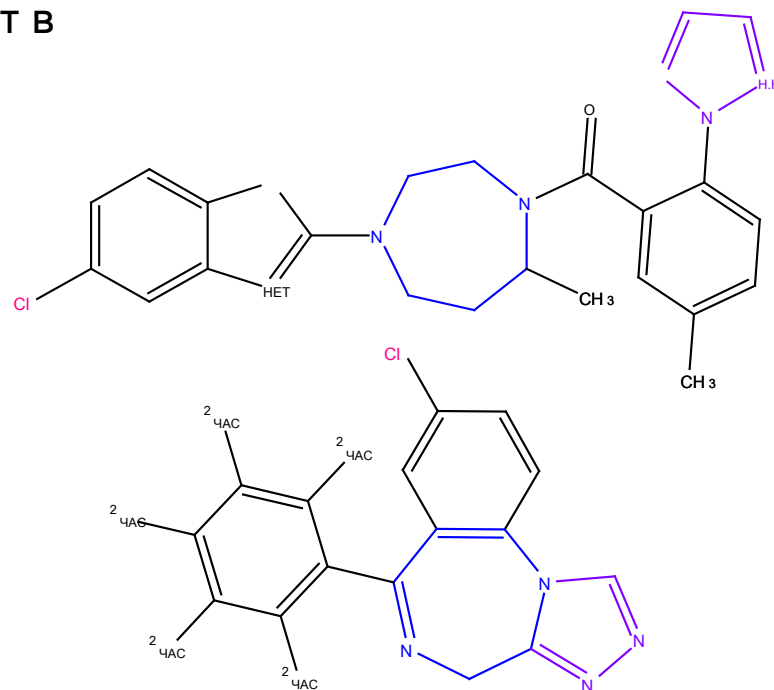
Sydney Sullinger, Kelsie Bryand, Sarah Kerrigan ✉

Journal of Analytical Toxicology, Volume 41, Issue 3, 1 April 2017, Pages 224–229,
<https://doi.org/10.1093/jat/bkw132>

Published: 30 December 2016

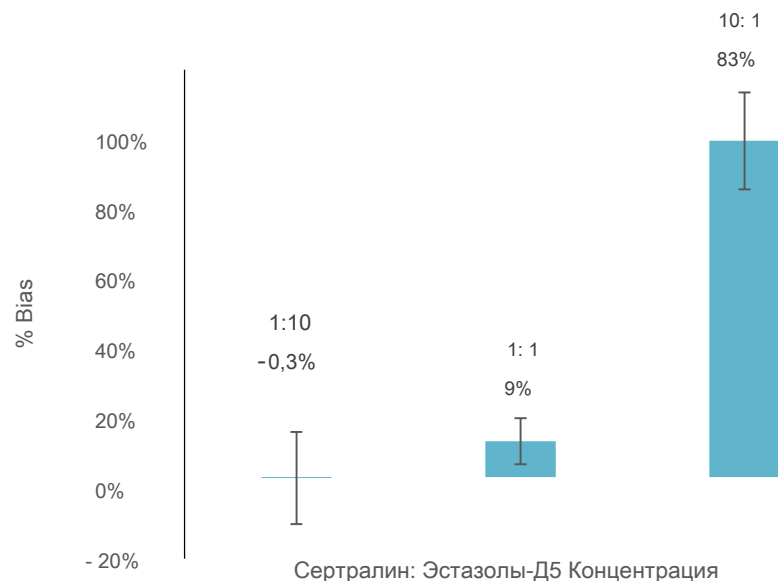
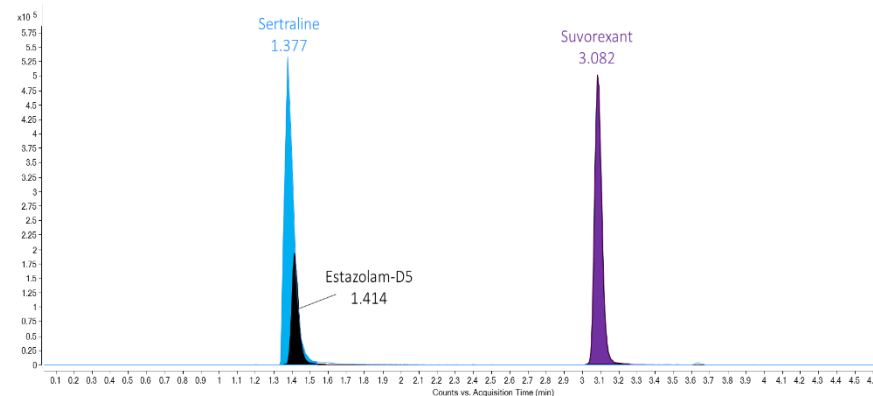
Suvorexant in Blood & Urine

- Целенаправленный анализ на суворексант в крови и моче
- NO дейтерированная не доступна
 - Эстазолы-D5 выбран
- Выделение с помощью LLE
- ЖХ-МС-QTOF
- Проверка в соответствии с рекомендациями SWGTOX



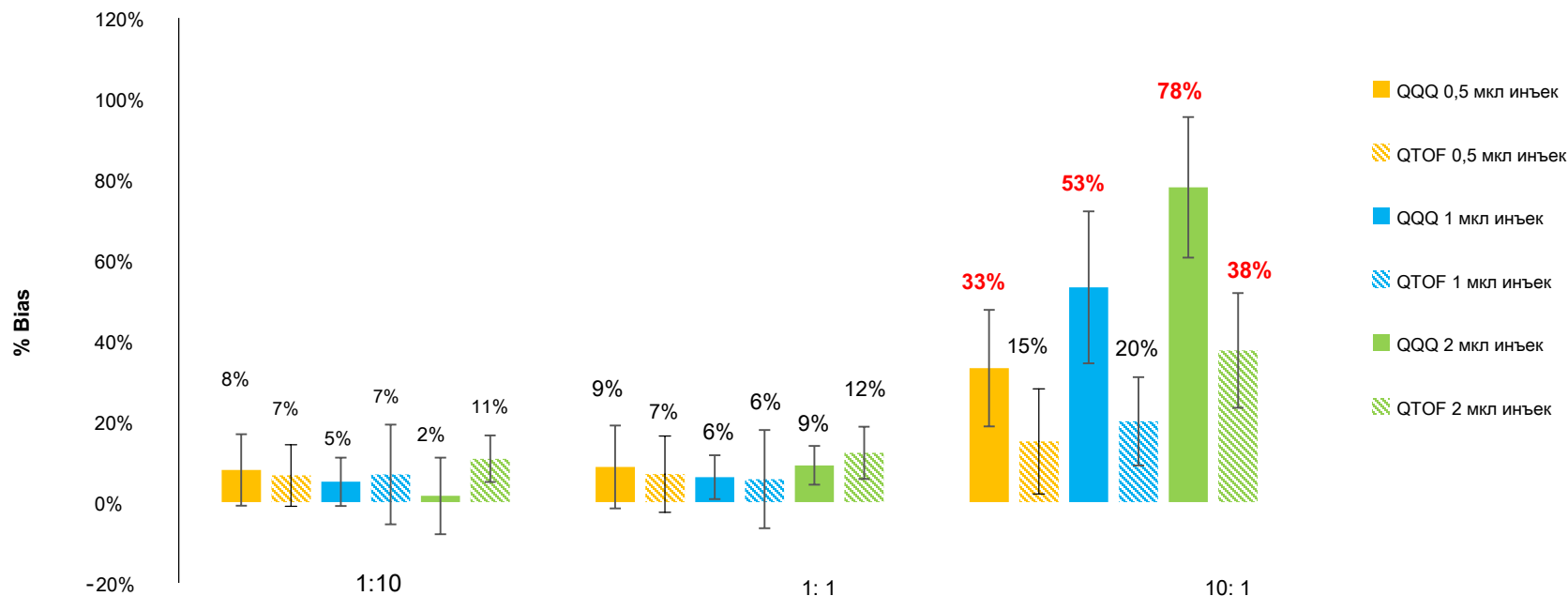
Quantitative Interference (Blood)

- Не качественное вмешательство
- Сертралин похож на PT IS (эстазолы-Д5) - 100 нг / мл
- Сертралин: IS 1:10, 1: 1, 10: 1 (п = 3)
- Значительное смещение в 10: 1 сертралин: Концентрации эстазолов-D5



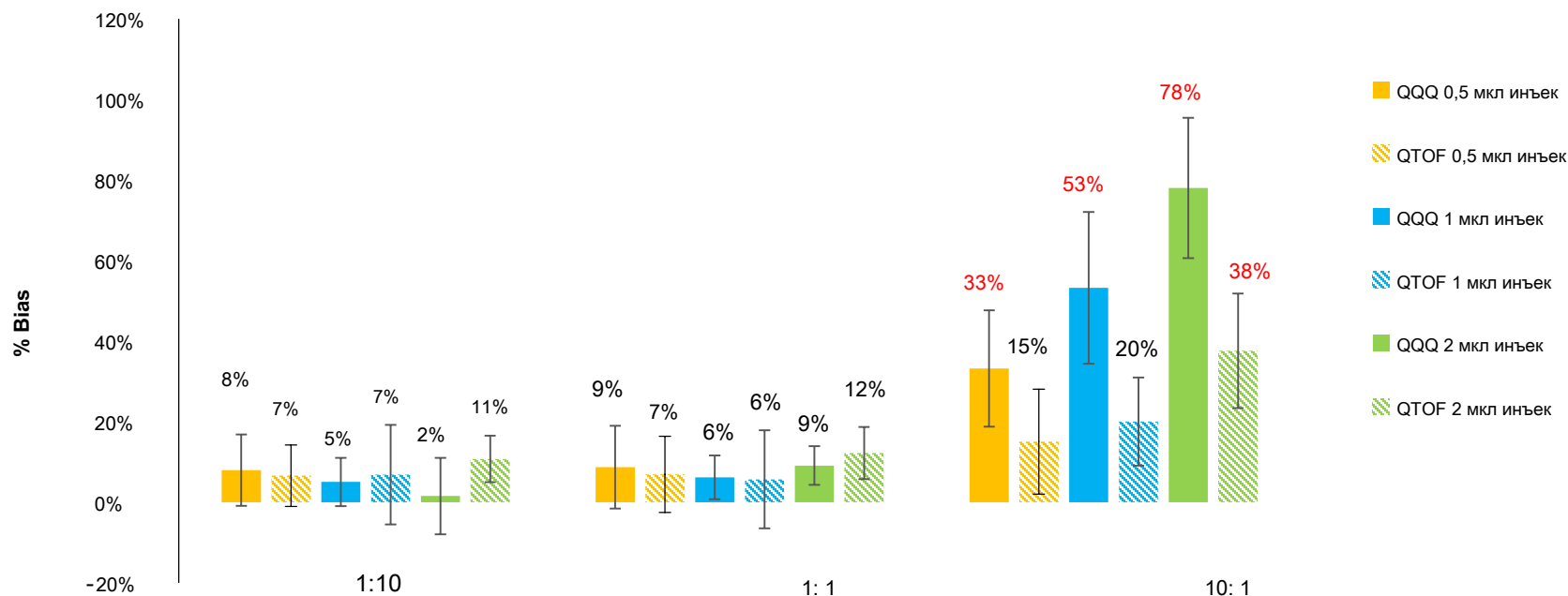
Minimize Quantitative Interferences?

- QTOF & MSMS сравнение?
- Свести к минимуму эффект?



QTOF vs. MS/MS

- QTOF чуть менее восприимчивым
- Снижение объема впрыска помогает



QTOF vs. MS/MS

- Подавление Ион> 25% наблюдали с использованием LCMS / MS, но не ЖХ-Q / TOF-MS во время валидации метода

<i>Средняя Матрица</i> <i>Эффект (n = 10)</i>	суворексант		Эстазолы-Д5	
	<i>QTOF</i>	<i>QQQ</i>	<i>QTOF</i>	<i>QQQ</i>
Низкий КК (20 нг / мл)	16%	- 35%	19%	12%
Высокий КК (100 нг / мл)	15%	- 26%	11%	6%

Desomorphine in Urine

- ЖХ-МС-МС (ПКО 0,5 нг / мл)
 - Нет количественную интерференции (66 препаратов, в том числе. 24 опиоидов)

Интерференция дезоморфина Среднее Конц.			точность	предвзятость
500 нг / мл	0 нг / мл	0	-	-
	5 нг / мл	5,3 ± 0,04	95%	5%
	50 нг / мл	51,0 ± 0,22	98%	2%
	500 нг / мл	516,3 ± 8,9	97%	2%

- ЖХ-МС-QTOF (ПКО 0,5 нг / мл)
 - Нет количественную интерференции (66 препаратов, в том числе. 24 опиоидов)

Интерференция дезоморфина Среднее Конц.			точность	предвзятость
500 нг / мл	0 нг / мл	0	-	-
	5 нг / мл	4,6 ± 0,06	108%	7%
	50 нг / мл	46,3 ± 0,86	108%	- 8%
	500 нг / мл	467,1 ± 22	107%	- 7%

Summary

- ЖХ-МС могут быть восприимчивы к помехам при количественных изотопно помечены не доступна (NPSS)
 - Бдительность необходима
 - Вопросы для экспериментального проектирования
 - Большое количество лекарственных средств
 - Превышение концентрации (зависит от концентрации смещения)
 - Смягчение возможно
- ЖХ-МС-QTOF вне выполняется LC-MS-MS в некоторых критериев валидации

Summary

- Улучшенные пределы обнаружения для LC-MS-MS? Не всегда так
- ЖХ-МС-QTOF целевой quantitations может предложить сопоставимую чувствительность
- QTOF-МС был менее чувствительным к МЕ в некоторых анализах с использованием бок о бок сравнения
- QTOF-МС немного менее восприимчивы к помехам количественных наркотиков
 - Избегайте быстрых методов LC для количественного анализа по мере возможности
 - Используйте меченных изотопами IS везде, где это возможно
 - ЖХ-МС более восприимчивы к помехам, чем наркотиков ГХ-МС из-за ионизации в заторможенном ESI (конкуренция)
 - Прочные исследования помех необходимы
 - Некоторые исправления для этих явлений могут быть сделаны во время разработки методы

Conclusions

- Количественные помехи могут легко остаться незамеченными
- Проверка SWGTOX требует только *качественный* Интерференционные исследования, не *количественный*
- Коэффициенты Ion, время удерживания не влияет
- **Ни в коем случае для идентификации неизвестного количественного вмешательства в реальных судебных делах**
- Должны быть тщательно оценены в ходе разработки метода / проверки
- Помехи (в источнике) *т.е.* предварительно массовая фильтрация, поэтому возможно с использованием как LC-MS / MS и LCQTOF-MS

Acknowledgements

- Данные, представленные была взята из проектов, поддержанных Национальным институтом юстиции, Управления юстиции программы, Министерство юстиции США (премии Цифры 2013-R2-CXK006 2015-R2-CX-0031, 2016-DN-BX-0006). Мнения, выводы и заключения или рекомендации, выраженные в данной публикации, автора (ов) и не обязательно отражают точку зрения Министерства юстиции.
- Стефани Basiliere, BS
- Джессика Winborn, BS
- Бритни Skillman, BS
- Kelsie Bryand, MC
- Линдсей Гликсберг, доктор философии

Contact Information

Dr. Sarah Kerrigan

Professor and Chair

Department of Forensic Science, SHSU

Director, Institute for Forensic Research, Training and Innovation

Email: sarah.kerrigan@shsu.edu
www.forensics.shsu.edu
www.IFRTI.org