



法務部法醫研究所

Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justice

Эволюция Методологии поддающегося анализу посмертных проб

Донг-Лян Лин, Ph.D.

Отдел судебно-медицинской токсикологии
Института судебной медицины
New Taipei City
Тайвань

Рэй Х. Лю, Ph.D.

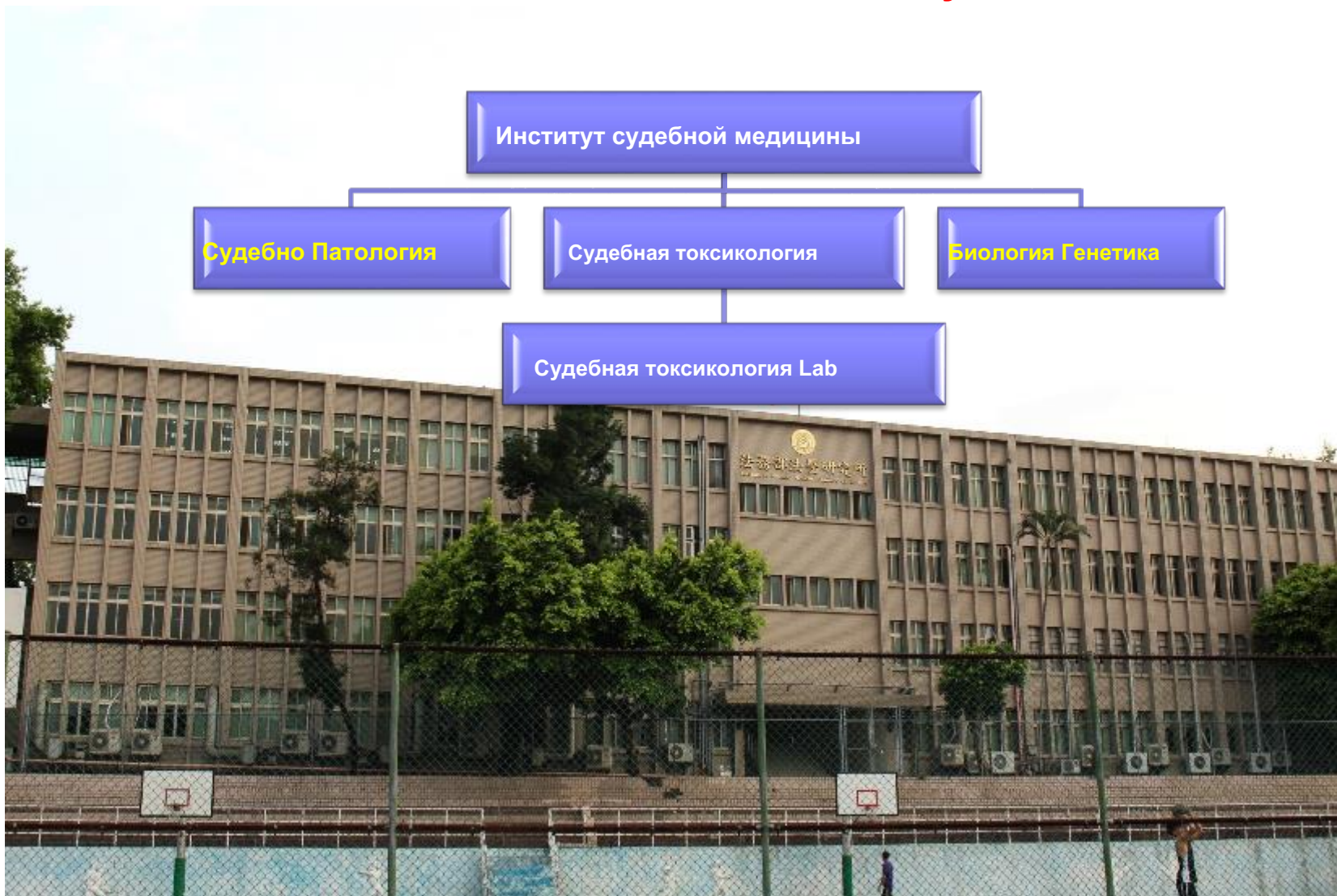
Отдел уголовного правосудия
Univ. Ала. в Бирмингеме
Бирмингем, Алабама
США

презентация

Контур

- Введение -The лаборатория
- Методологии (принята в различные периоды времени)
 - Предварительный экран
 - пробоподготовки
 - Подтверждение / Количественное
- Основные выбранных methodologies
 - Предварительный экран - LC-QTOF / MS
 - Подтверждение / Количественное - LC-QQQ / MS
- Что дальше?
 - Пробоподготовки -QuEChERS

Введение-Институт



Судебная токсикология Lab



Токсиколог	7
Научный сотрудник	11
Адм. Помощник	5
Весь персонал	23

Введение-майор приборостроение

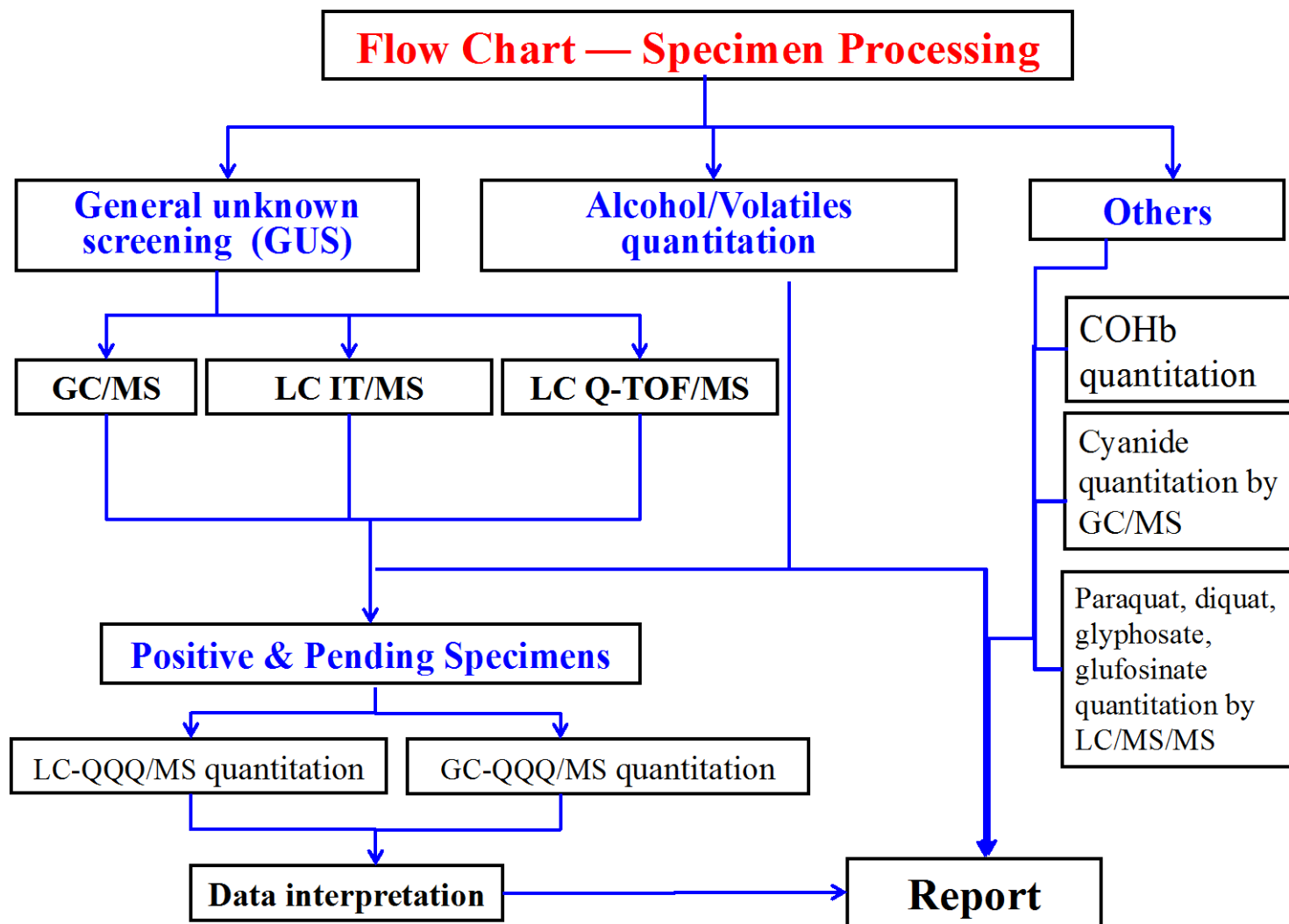
Инструмент #		Применение
FPIA (AxSYM) 1	Экран: AM, OPI, COC, THC, PCP, BAR, BEN ...	
GX / MC	7	GUS: 5-библиотека / в доме базы данных (> 450000 ДСП); Cyanide колич.
LC-IT / MC	4	GUS: в доме-базе данных (> 1500 ДСП); Поиск по MS ² спектры
LC-QTOF / MC	2	GUS: Внутренний-базы данных (> 1500 ДСП); Поиск по формуле, Авто MC / MC, точная масса
HS-GC	2	Квант .: этанол / метанол / ацетон / изопропанол
HS-GX / MC	2	Конф .: (этанол / метанол / ацетон / IPA / толуол / бензин)
GC-QQQ / MC	2	Quant .: Трамадол, флуоксетин, мirtазапин, клотиапин, пропофол, вальпроевая кислота ...
LC-QQQ / MC	5	Квант .: Опиаты, кокаин, THC, барбитураты, бензодиазепины, NPS, параквато ...)

Introduction- # прецедентного и публикации

Случаи \ Год	2002	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017			
токсикология	+884	2760	2832	3024	2927	3003	3513	3654	3557	3477			
Дело запрос	110	265	355	443	618	650	499	764	759	752			
Всего	+994	3025	3187	3467	3426	3621	4163	4418	4316	4229			

Журнал (2002-2017)	Нет.	Журнал (2002-2017)	Нет.
<i>J Anal Toxicol</i>	16	<i>Анал Chem</i>	2
<i>J Chromatogr</i>	2	<i>J Forensic Sci</i>	1
<i>Rapid Commun Mass Spectrom</i> 1		<i>Анал Bioanal Chem</i>	1
Аналитик	1	<i>Forensic Sci Rev</i>	3
другие	4	Всего	31

Диаграмма Введение-Flow



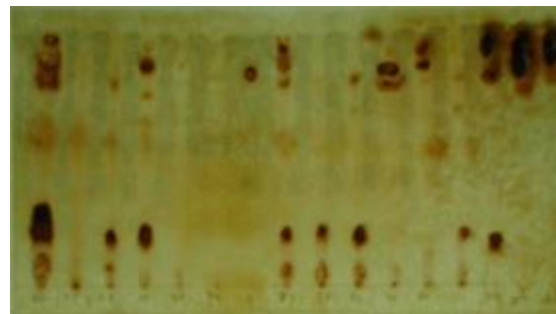
Методика-экран (1)

иммуноанализ

EIA (EMIT[®]) (1980-1990)



ТСХ (1980-1990)



ФПИА (TDX) (1990-2000)



ФПИА (AxSYM) (2000-2013)



Методика-экран (2)

ГХ-МС



LC-IT / MC



UHPLC-QTOF / MC



Анал Chem **81**: 9002-9011 (2009)

Rapid Commun Mass Spectrom **24**: 75-84 (2010)

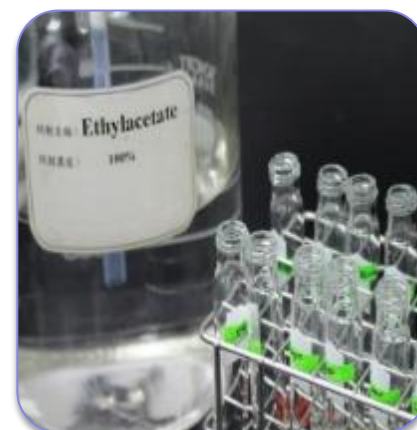
Автоматизированная библиотека поиска

J Анал Toxicol **41**: 421-430 (2017)

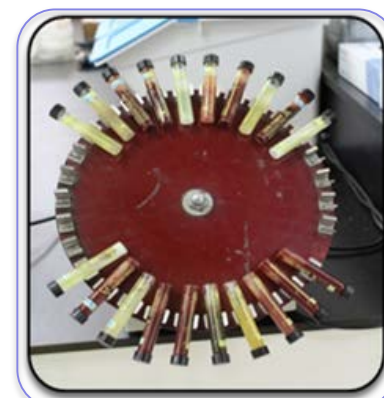
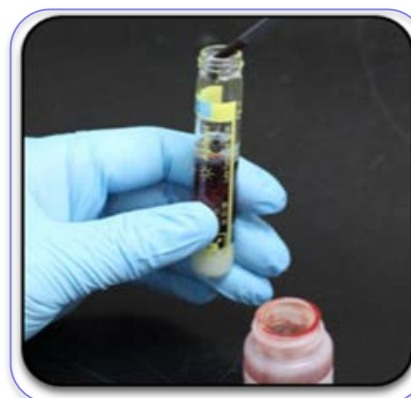
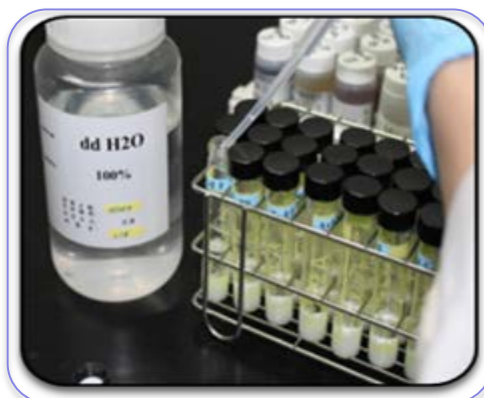
Методика-Преп Образец (1)

Жидкостно-жидкостная экстракция

Пробирка



Toxi-
Tube®



Методика-Преп Образец (2)

Твердофазные экстракции (SPE)

SPE -

Руководство по эксплуатации



SPE -

Автоматизированная

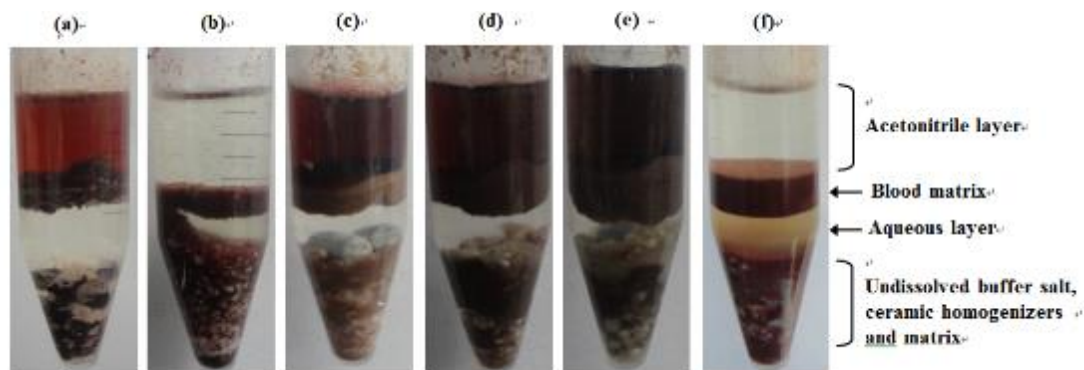


Дисперсионный SPE

QuEChERS (**Qu** Ик,

E ASY, **Ch** ear,

E ffective, **p** ugged, & **S** AFE)



法務部法醫研究所

Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justice

Для судебного использования

ГХ-МС



- Бупренорфин и его метаболиты [**моча**]:
Chromatogr 1217: 1688-1694 (2010)
- Метадон в **кровь, плазма и ротовая жидкость** : *Анал Bioanal Chem 405*: 3921-3928 (2013)

LC-QQQ / MS



- Амфетамины и опиаты в **волосы** : *J Анал Toxicol 39*: 183-191 (2015)
- Опиаты, метамфетамин, бупренорфин, метадон и метаболитов в **ротовая жидкость** : *J Анал Toxicol 39*: 472-480 (2015)
- **Метамфетамин, кетамин, опиатные и метаболиты**
моча ; *J Анал Toxicol 41*: 679-687 (2017)



Инструменты & Key параметры

- Agilent 1290 UHPLC
 - Колонка: Agilent Zorbax SB-Aq
- Компания Agilent 6540 QTOF / MS
 - Электрораспылительная / позитивный режим
 - Квадрупольный: выделения ионов-предшественников
 - Линейная ячейка гексапольно столкновения: 10, 20, 40 эВ
 - TOF-MS: Масс-спектр, 100-1000 м / г; MS / MS, 50-800 м / г
 - Сбор данных: MassHunter Acquisition
 - Персональная база данных Соединение и библиотеки программного обеспечения
 - Молекулярная характеристика: масса (основной изотоп), изотоп модель; масса (M + 1 & M + 2)
 - формула
 - Авто MS / MS



LC Параметры & Sample подготовка

- Подвижная фаза & элюции
 - Подвижная фаза: 0,1% муравьиная кислота в воде (A); метанол (B)
 - Первоначальный растворитель (A: B, 88:12) 4 мин; снизится до 0% A в 8 мин; проведено 1 мин для полоскания; увеличить до 88% в течение 1 мин
- стандарт
 - 1-5 мкг / мл в растворителе начального градиента
- Образец (моча / кровь)
 - Toxi-Tubes® A
 - Буфер: натрия карбонат / бикарбонат, pH 9,0
 - Растворитель: дихлорметан / дихлорэтан / *n*-гептан / этилацетат (1/1/1/1, v)
 - Экстракт сушат; растворенный в растворителе начального градиента



ESI-MS QTOF Library-I

- Ионы
 - Предшественник ион: протонированные ионы
 - МС / МС-спектры: 10, 20, 40 эВ
- В доме библиотека с 1200 соответствующими соединениями
 - Соединение: название, химическая формула, химическая структура, моноизотопная масса (5 знаков после запятой, вычисляется автоматически)
 - Время удержания
 - ИДС МС / МС-спектры: 3-спектры (10, 20, 40 эВ), каждый в среднем по ширине пика при элюировании



Highlight- LC-QTOF для GUS экрана (4)

J Anal Toxicol 41: 421-430 (2017)

ESI-MS QTOF Библиотека-II,

ЖХ-МС-QTOF в доме базы данных данных для 21 опиоидов

<u>Drugs</u>	<u>Retention time (min)</u>	<u>Formula</u>	<u>Monoisotopic mass</u>	<u>[M+H]⁺ mass</u>	<u>Observed mass</u>	<u>Mass error</u>	<u>LOD (ng/mL)</u>
Normorphine	1.331	---	271.12084	---	271.12067	---	5.0
Dihydromorphine	1.333	---	287.15214	---	287.15510	---	1.0
Morphine	1.351	---	285.13649	---	285.13647	---	2.5
Noroxymorphone	1.405	---	287.11576	---	287.11575	---	5.0
Oxymorphone	1.494	---	301.13141	---	301.13152	---	5.0
Hydromorphone	1.678	---	285.13649	---	285.13666	---	5.0

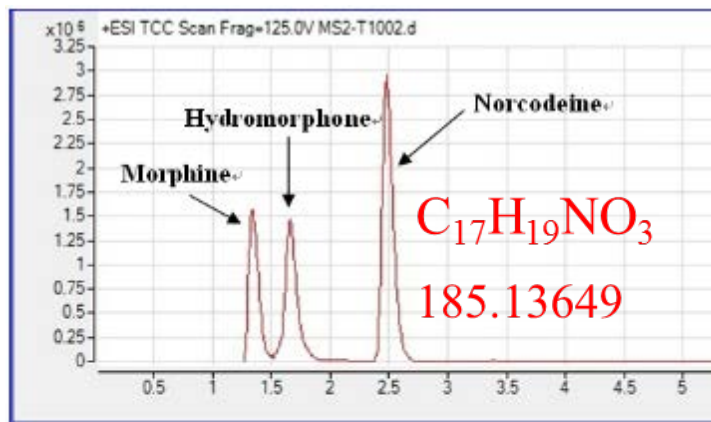
6-Acetylmorphine	3.934	---	327.14706	---	327.14710	---	10
6 β -Naltrexol	4.026	---	343.17836	---	343.17860	---	2.5
6-Acetylcodeine	7.154	---	341.16271	---	341.16286	---	2.5
Heroin	7.248	---	369.15762	---	369.15777	---	5.0
Norbuprenorphine	8.258	---	413.25661	---	413.25659	---	5.0
Buprenorphine	8.921	---	467.30356	---	467.30349	---	2.5



Аналит Identification-3 Поиск

Алгоритмы

(A) Molecular особенность: матч оценка морфин (96.68) (B) формула: морфин (99.45), гидроморфон (99.62), норкодеин (99.95) (C) Авто MC / MC: морфин (98.08), гидроморфон (95.94), норкодеин (98.12)



(B)

Compound Table										
Compound Label	RT	Mass	Abund	Name	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	HFG Formula	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 6: Morphine	1.346	285.136	20696	Morphine	C17H19NO3	285.1365	-1.63	C17H19NO3	C17H19NO3	1.63
Cpd 7: Hydromorphone	1.66	285.136	64029	Hydromorphone	C17H19NO3	285.1365	-1.72	C17H19NO3	C17H19NO3	1.72
Cpd 6: Norcodeine	2.477	285.1361	145774	Norcodeine	C17H19NO3	285.1365	-1.49	C17H19NO3	C17H19NO3	1.49

Compound Label	Name	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 6: Morphine	Morphine	308.1253	1.343	Find By Formula	285.136

Compound Label	Name	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 7: Hydromorphone	Hydromorphone	308.1254	1.66	Find By Formula	285.136

Compound Label	Name	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 6: Norcodeine	Norcodeine	308.1256	2.477	Find By Formula	285.1361

FBF

(C)

Compound Table								
Compound Label	RT	Mass	Name	Formula	HFG Formula	DB Formula	DB Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 13: Morphine	1.344	285.1359	Morphine	C17H19NO3	C17H19NO3	C17H19NO3	2.13	3
Cpd 19: Hydromorphone	1.716	285.1357	Hydromorphone	C17H19NO3	C17H19NO3	C17H19NO3	2.9	3
Cpd 23: Norcodeine	2.48	285.136	Norcodeine	C17H19NO3	C17H19NO3	C17H19NO3	1.86	3

Compound Label	Name	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 13: Morphine	Morphine	286.1431	1.344	Auto MS/MS	285.1359

Compound Label	Name	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 19: Hydromorphone	Hydromorphone	286.1429	1.716	Auto MS/MS	285.1357

Compound Label	Name	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 23: Norcodeine	Norcodeine	286.1432	2.48	Auto MS/MS	285.136

AMM

AMM

(A)

Compound Table						
Compound Label	RT	Mass	Name	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)
Cpd 1: Morphine	1.346	285.1359	Morphine	C17H19NO3	285.1365	-1.94

Compound Label	Name	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: Morphine	Morphine	286.1431	1.346	Find by Molecular Feature	285.1359

MFE



Highlight- LC-QTOF для GUS экрана (6)

J Anal Toxicol 41: 421-430 (2017)

САР РТ Образцы -ТА, ТВ, ТС 2014 токсикологии

<u>образчик</u>	<u>лекарственный</u>	<u>LC-QTOF / MC ЖХ-ИТ / MC ГХ / MC</u>		
T-01 сыворотка	оксикодон	да	да	да
	Оксиморфон	да	да	-
	бупренорфин	да	да	-
	Norbuprenorphine	да	-	-
T-02 урина	оксикодон	да	да	да
	Оксиморфон	да	да	-
	бупренорфин	да	да	-
	Norbuprenorphine	да	-	-
T-06 сыворотка	Фентанил	да	да	-
	Norfentanyl	да	-	-
	метанол	да	да	-
	EDDP	да	-	-
T-07 урина	Фентанил	да	да	-
	Norfentanyl	да	да	-
	метанол	да	да	да
	EDDP	да	да	да



Highlight- LC-QTOF для GUS Screen (7)

J Anal Toxicol 41: 421-430 (2017)

Количество соединения, идентифицированные

- В 10 опийных случаях смертельных (кровь и моча) -

# лекарственный идентифицированный	метод		
	<u>LC-QTOF / MC ЖХ-ИТ / MC ГХ / MC</u>		
Всего	146	97	31
6-ацетилморфин	11	10	6
6-ацетилкодеина	4	5	3
героин	2	2	0

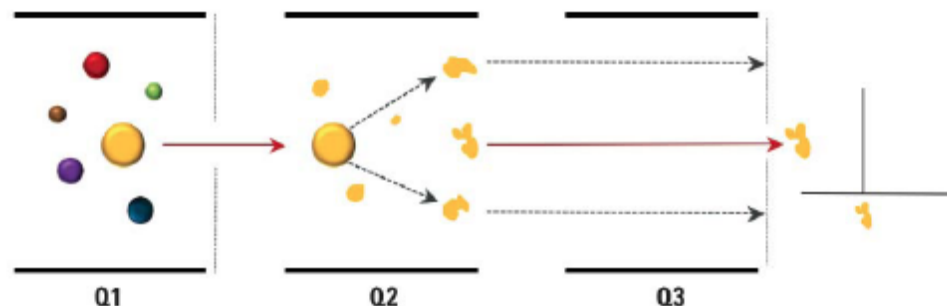
Инструменты & Key параметры

- Система Agilent 1200 LC-бесконечность
- Колонка: Agilent Zorbax SB-Aq
- Компания Agilent 6410 QQQ / МС
 - Электрораспылительная, позитивный режим
 - Предшественник ширина изоляции ионов: 4 а.е.м.
 - Приобретение: динамический множественный мониторинг реакции
 - Энергия столкновений: оптимальная для каждого иона-предшественника
 - Два ионы перехода для каждого аналита

21 Динамический
Multiple
Мониторинг
реакции

(2)

J Anal Toxicol 41: 679-687 (2017)



Источник: Agilent Technologies
5990-3595EN

- «... (Q1) выбирает и передает ион-предшественник с конкретным m/z . Этот ион затем фрагментирован в ... (Q2 столкновении клетки), и конкретный ион продукта с определенным m/z выбираются и передаются в ... (Q3)»
- «Ион переходы и окно времени удерживания для каждого анализируемого вещества сохраняется в методе. Списки переходов MRM затем строится динамически всюду по LC / MS перспективы, на основе временного окна удерживания для каждого аналита. ... аналитов контролируются только в то время как они элюирование от LC»

J Anal Toxicol 41: 679-687 (2017)

LC Параметры & Sample подготовка

- Подвижная фаза & элюции
 - Подвижная фаза: 0,1% (об / об) муравьиной кислоты в воде (А); метанол (В)
 - Первоначальный растворитель (А: В, 90:10) 1,5 мин; снизится до 0% А в 5,5 мин; проведено 1 мин для полоскания; увеличится до 90% в течение 1 мин; Ручная 1 мин
- стандарты
 - 50, 125, 250, 500, 1000 нг / мл в воде
- Образцы (моча / кровь)
 - Буфер: 0,1 М фосфатный
 - SPE: ACCUBOND EVIDEX (Agilent), Biotage / суппорт / Zymark
RapidTrace НПП Рабочая станция
 - Элюирование: этилацетат / метанол / NH₄ OH (75: 25: 2, об / об / об)
 - Экстракт сушат; растворенный в растворителе начального градиента; центрифугируют



Переход и МС / МС параметры

J Anal Toxicol 41: 679-687 (2017)

- Десять аналитов и их внутренние
стандарты

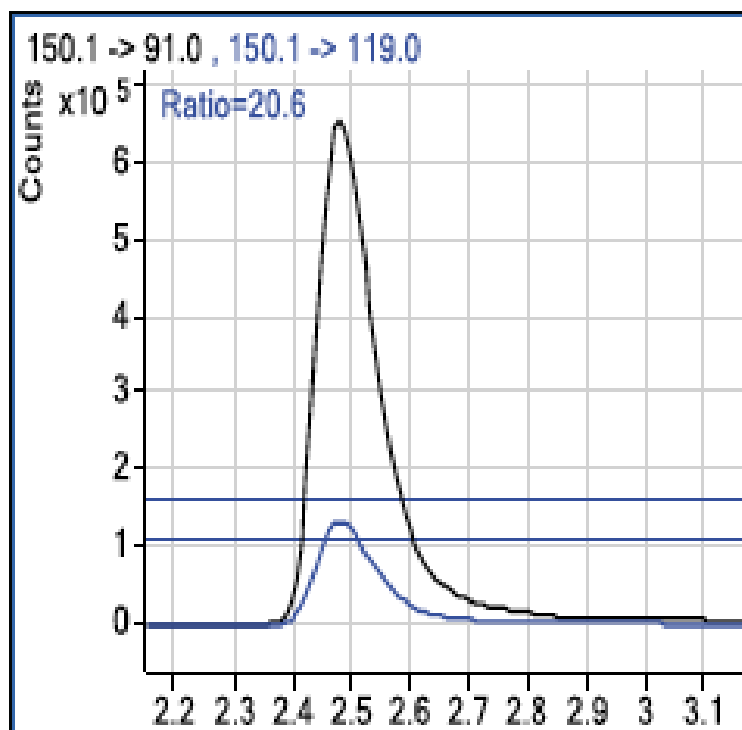
<u>Drugs</u>	<u>Retention time (min)</u>	<u>Precursor ion</u>		<u>Target ion</u>		<u>Qualifier ion</u>	
		<u>m/z</u>	<u>Frag (V)</u>	<u>m/z</u>	<u>Col (V)</u>	<u>m/z</u>	<u>Col (V)</u>
Methamphetamine	2.66	150.1	87	119	8	91	16
Methamphetamine-d ₈	2.61	158.2	92	124.1	8	93	20
MDMA	3.92	194.1	92	163	8	105	24
MDMA-d ₅	3.88	199.1	97	165	8	107	24
Morphine	1.45	286.2	166	181	36	165.1	44
Morphine-d ₆	1.44	292.2	166	181	36	153.1	48
6-Acetylcodine	6.90	342.2	161	225	28	165.1	60
6-Acetylcodine-d ₆	6.90	345.2	162	225.1	29	115	60
Norketamine	6.20	224	92	207	5	125	25
Norketamine-d ₄	6.20	228.1	102	211	8	129	28



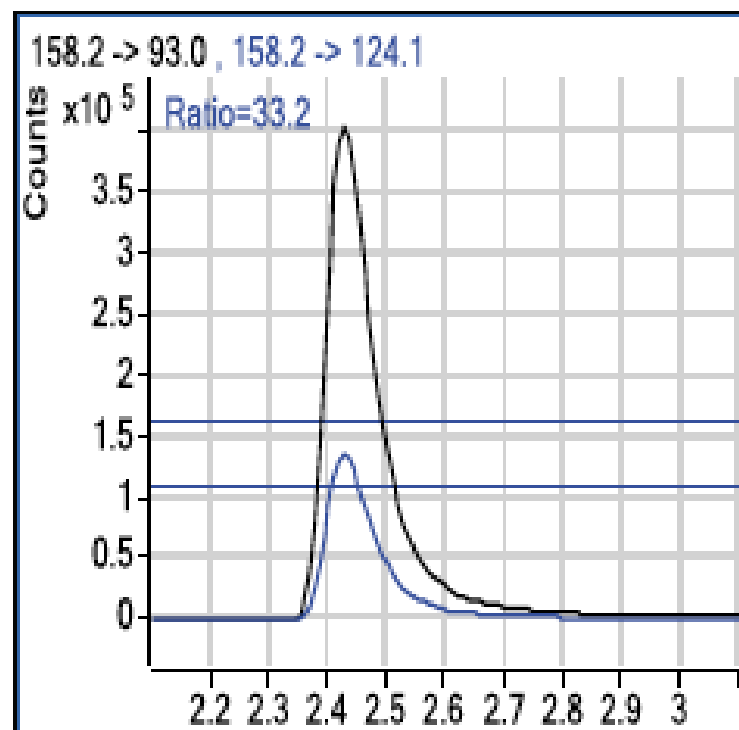
J Anal Toxicol 41: 679-687 (2017)

Динамический Multiple Мониторинг реакции хроматограмма

methamphetamine

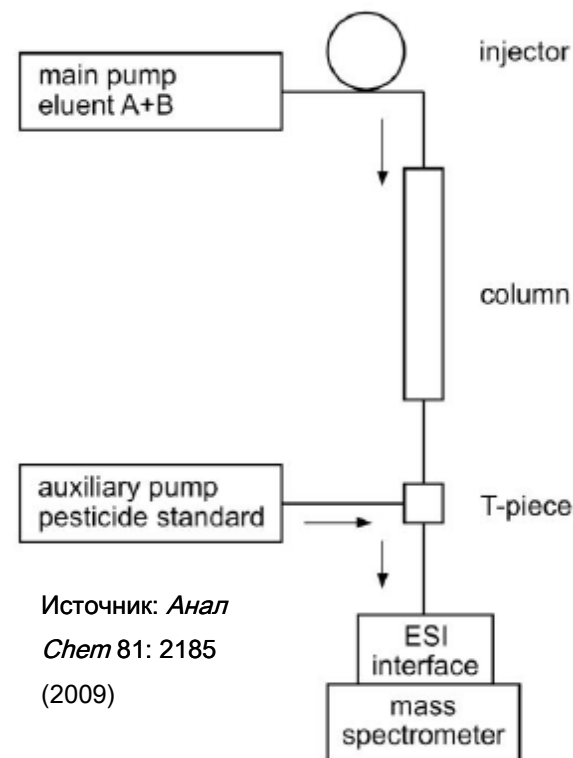


methamphetamine-d₈



Оценка матричного эффекта - Пост-колонок infusion-

- Инфузионная система пост-колонок
 - Инфузионный шприцевой насос подает аналит (подлежащее оценке) стандартное в качестве элюента колоночной ЖХ через смесительный тройник (относительная интенсивность профиль A)
 - Вводят экстракт свободных от наркотиков образцов (5 источников) в LC-MS / MS системы (профиль относительной интенсивности B)
- оценка
 - A > B: подавление ионов; A < B: повышение ионной
 - Матрица эффект (%): $[1 - (A - B) / A] \times 100$
 - Матрица эффект: 61% - 102%
- Дейтерированные внутренние стандарты
 - Матричные эффекты компенсируются



Оценка матричного эффекта - Пост-колонок infusion-



J Anal Toxicol 41: 679-687 (2017)

Точность данных 250 нг / мл в моче ($N = 3$)

<u>Аналит</u>	<u>Имею в виду \pm SD</u>	<u>Точность CV (%)</u>	
амфетамин	248,9 \pm 4,9	99,6	2,0
Метамфетамин	250,8 \pm 8,4	100	3,3
MDA	246,7 \pm 3,0	98,7	1,2
MDMA	244,0 \pm 3,5	97,6	1,4
Морфий	249,2 \pm 11	99,7	4,6
Кодеин	246,4 \pm 5,8	98,5	2,4
6-ацетилморфин	252,5 \pm 15	101	6,0
6-ацетилкодеина	249,7 \pm 11	99,9	4,4
Кетамин	246,4 \pm 3,9	98,6	1,6
Norketamine	243,5 \pm 3,7	97,4	1,5



QuEChERS-Фон

- Qu Ик, E ASY, Ch eap, E ffective, p ugged, и S afe- дисперсионные SPE
- 2001-2002: Разработано Микеланджело Anastassiades в ЕЦПЦ Министерства сельского хозяйства США (группа Lehotay в) (стипендиат из Univ Хоэнхаймских, Штутгарт, Германия.)
- Разработано для извлечения основных остатков / полярных пестицидов в растительных материалах
- Оригинальные и модифицированный (с буферными солями) версия в настоящее время широко используется
- Препараты крови: *судебная медицина* 14: 286 (2012)



QuEChERS-процедуры

- Извлечение (шаг 1)
 - Европейский стандарт: 2 мл ацетонитрила, 1,3 г расфасованные подготовки экстракции (0,8 г MgSO_4 , 0,2 г NaCl , 0,2 г цитрата натрия и 0,1 г динатриевой цитрат)
 - IFM: 1 мл Na_2CO_3 / NaHCO_3 буфер (pH 9,5), 2 мл ацетонитрила, 1,0 г расфасованные подготовки экстракции (0,8 г MgSO_4 , 0,2 г NaCl),
- Очистка (шаг 2)
 - 25 мг первичного вторичного амина-занного диоксида кремни, 25 мг C18EC, 150 мг MgSO_4

QuEChERS-Recovery

<u>лекарственный</u>	<u>d-SPE (EC)</u>	<u>d-SPE (КРП) Toxi-Tubes® A</u>	
амфетамин	54,0 ± 0.6	55,4 ± 2,3	80,9 ± 3.0
бензоилэкгонина	42,2 ± 1,6	32,6 ± 1,9	5,5 ± 0,3
Cocaethylene	71,0 ± 1,5	78,2 ± 2,7	86,0 ± 3,3
Кокаин	70,4 ± 2,3	74,3 ± 2.5	88,9 ± 2,6
Кодеин	52,8 ± 0.7	57,8 ± 3,6	87,8 ± 1.2
Hydrocodone	61,2 ± 1,3	66,3 ± 4,2	88,3 ± 1,6
MDA	59,0 ± 0.9	56,3 ± 2,7	82,6 ± 1.2
MDMA	63,6 ± 0,5	65,0 ± 2,1	86,2 ± 1,3
Метамфетамин	62,3 ± 0.8	64,5 ± 2,7	84,7 ± 3,8
Морфий	42,3 ± 1.2	39,9 ± 1,7	42,7 ± 1,5