

# ЖХ-МС / МС Подходы к выявлению возникающих NPS

Мадлен Дж Swortwood, доктор философии

*Ассистент кафедры  
криминалистики Sam Houston State  
University*

*Хантсвилле, штат Техас, США*



Sam Houston  
State University

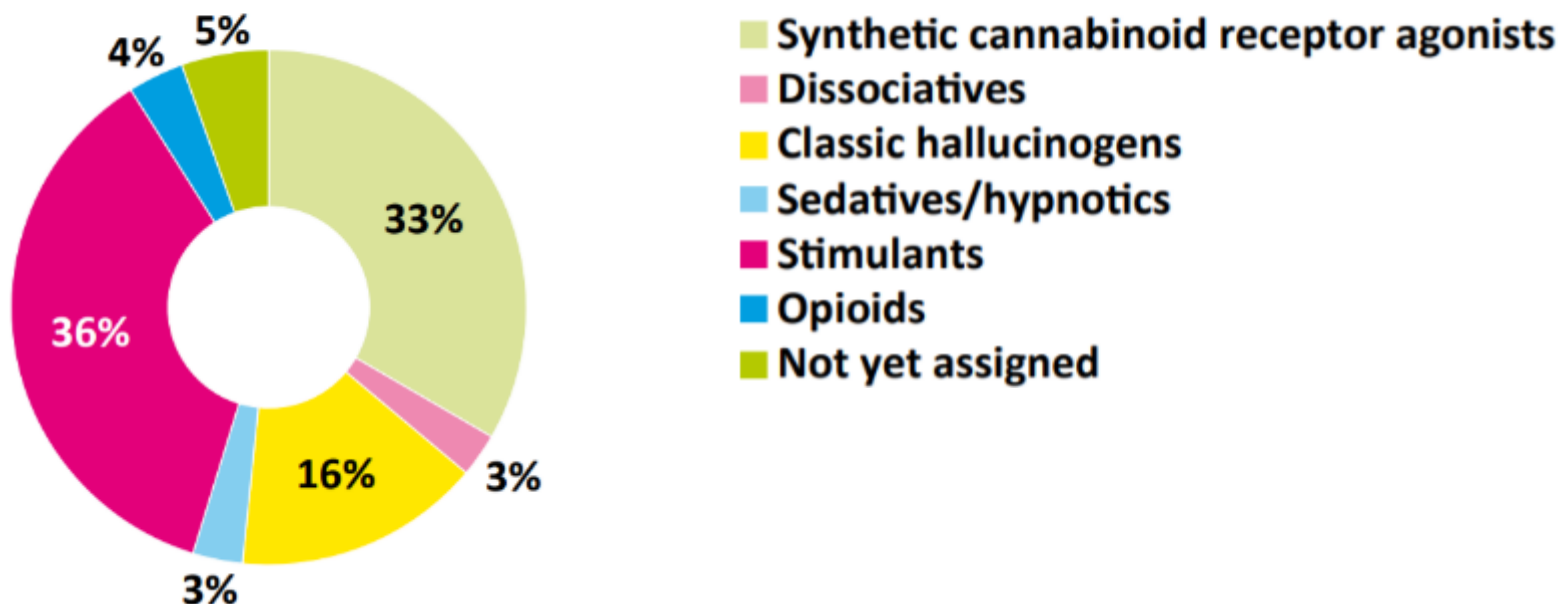
# отказ

*Этот проект был поддержан решением № 2017-R2-CX-0019, награжден Национальным институтом юстиции, Управления юстиции программы, министерство юстиции США. Мнения, выводы, и выводы или рекомендации, выраженные в данной публикации, автора (ов) и не обязательно отражает точку зрения Министерства юстиции.*

# Emerging NPS

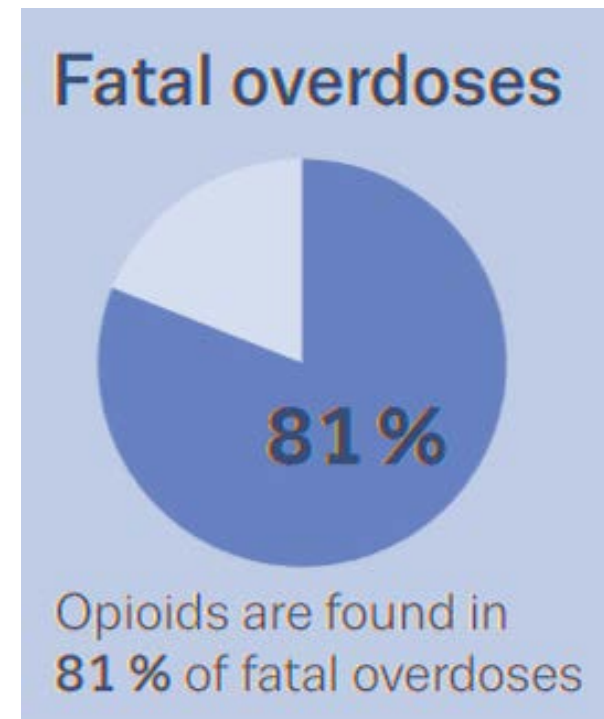
- было изъято более 23 тонн NPS в 2015 году
- От 2009-2016, **+739** различная NPS сообщила
  - Только 60, казалось, «исчезнуть»

**FIG. 10** Proportion of new psychoactive substances, by pharmacological effect, December 2016

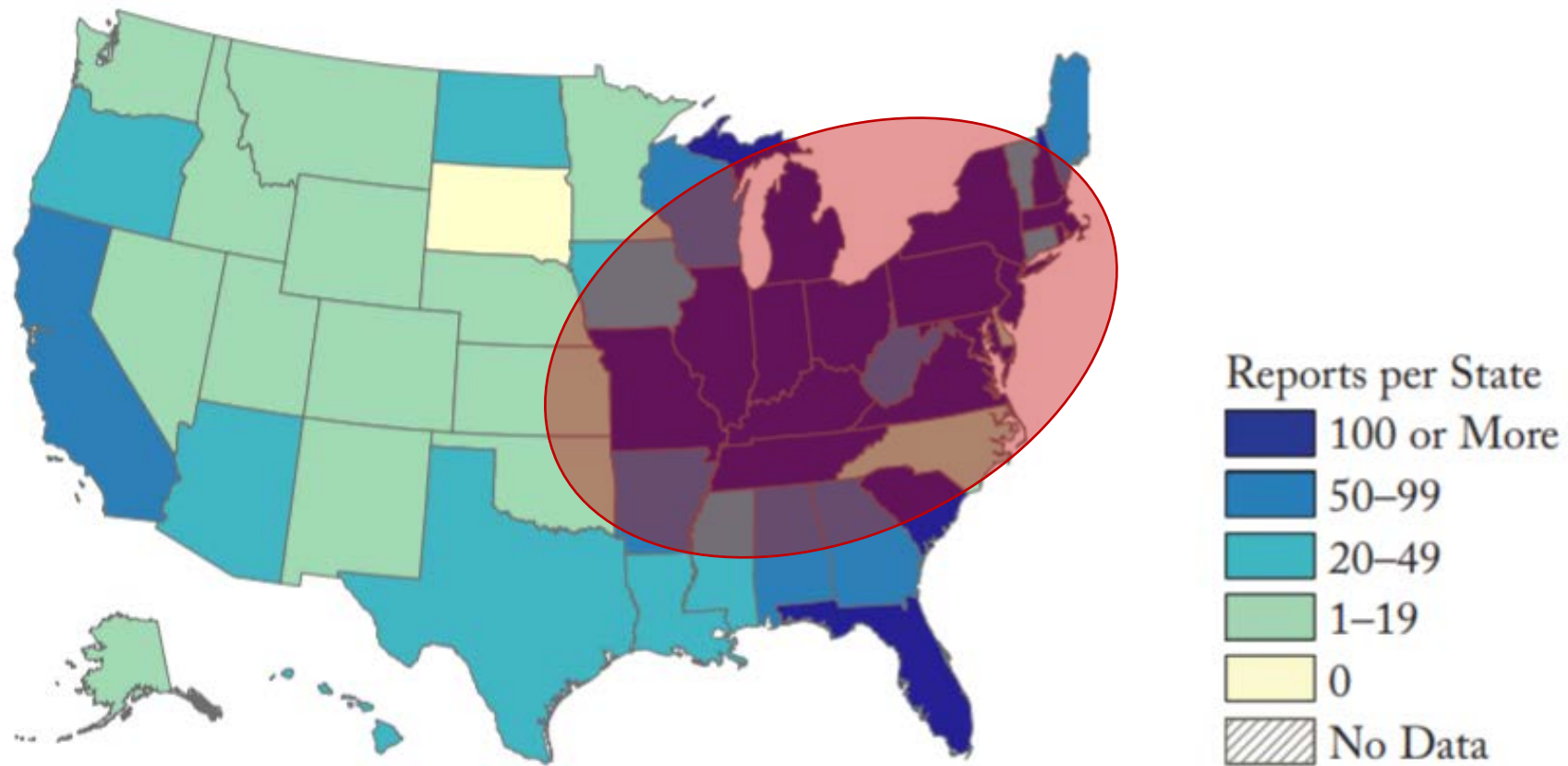


# Новые Опиаты в Европе

- 25 новых опиоиды с 2009 года
  - 18 фентанил-родственные соединения
- Более 60% изъятий опиатов в 2015 году были fentalogs
- 2 л синтетических опиоидов захваченный в 2015 году
- Новые назальные спреи
- Небольшая роль на европейском рынке наркотиков



# Fentanyl в США



# Опиаты в США

## 3 Waves of the Rise in Opioid Overdose Deaths

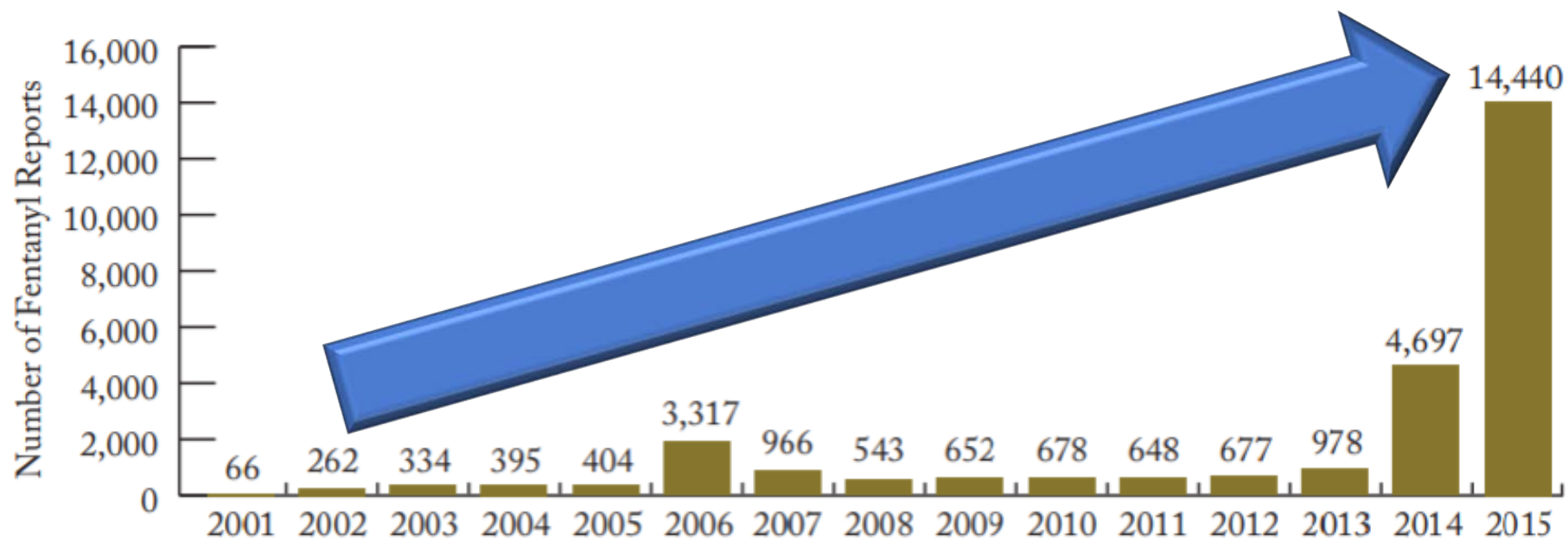


SOURCE: National Vital Statistics System Mortality File.



# Фентанил в США

- Фентанил связанных припадки с 2001 по 2015 год



# Fentanyl в США

- Фентанил связанных изъятий увеличились с 2015 до 2016 года

Table 1 National Annual Estimates of Fentanyl and Fentanyl-Related Substances Reported in NFLIS, 2015–2016<sup>1</sup>

Fentanyl and Fentanyl-Related Substances	2015		2016		Total	
	Number	Percent	Number	Percent	Number	Percent
Fentanyl	14,440	84.59%	34,199	84.99%	48,639	84.87%
Acetyl fentanyl	2,412	14.13%	1,669	4.15%	4,080	7.12%
Furanyl fentanyl	0	0.00%	2,273	5.65%	2,273	3.97%
Carfentanil	0	0.00%	1,251	3.11%	1,251	2.18%
3-Methylfentanyl	1	0.01%	427	1.06%	428	0.75%
Butyryl fentanyl	205	1.20%	93	0.23%	298	0.52%
Fluoroisobutyryl fentanyl	0	0.00%	82	0.20%	82	0.14%
p-Fluoroisobutyryl fentanyl	0	0.00%	76	0.19%	76	0.13%
p-Fluorobutyryl fentanyl	2	0.01%	72	0.18%	74	0.13%
Valeryl fentanyl	0	0.00%	52	0.13%	52	0.09%
Acryl fentanyl	0	0.00%	26	0.06%	26	0.04%
p-Fluorofentanyl	8	0.05%	5	0.01%	13	0.02%
ANPP	0	0.00%	8	0.02%	8	0.01%
o-Fluorofentanyl	0	0.00%	3	0.01%	3	0.01%
Beta-hydroxythiofentanyl	3	0.02%	0	0.00%	3	0.01%
Acetyl-alpha-methylfentanyl	1	0.01%	0	0.00%	1	0.00%
Alpha-methylfentanyl	0	0.00%	1	0.00%	1	0.00%
4-Methoxy-butyryl fentanyl	0	0.00%	*	*	*	*
<b>Total<sup>2</sup></b>	<b>17,071</b>	<b>100.00%</b>	<b>40,236</b>	<b>100.00%</b>	<b>57,308</b>	<b>100.00%</b>



Опиаты достигли национального докризисного уровня ...

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES



**HHS.GOV/OPIOIDS**

HOME PREVENTION TREATMENT RECOVERY ABOUT THE EPIDEMIC

# HELP, RESOURCES AND INFORMATION **NATIONAL OPIOIDS CRISIS**

Want to know more?



Но что об их влиянии на судебно  
токсикологи?

# Цели судебных токсикологов

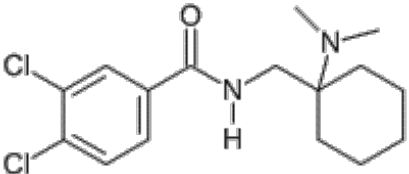
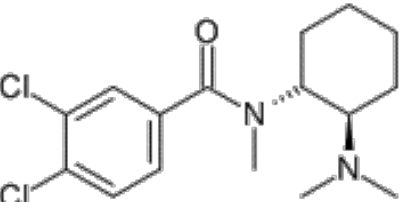
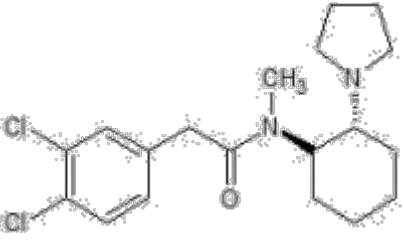
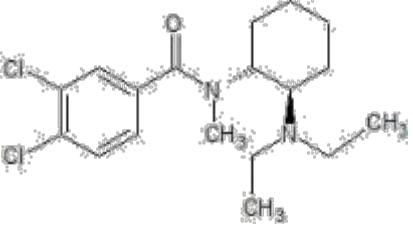
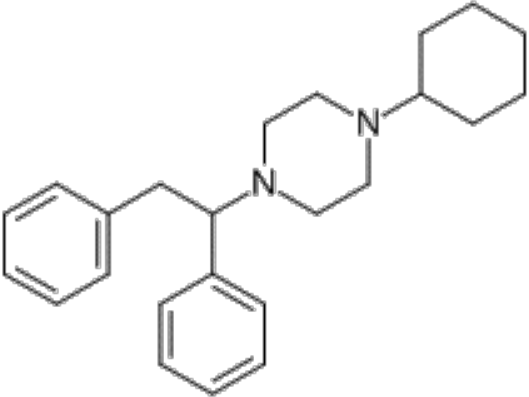
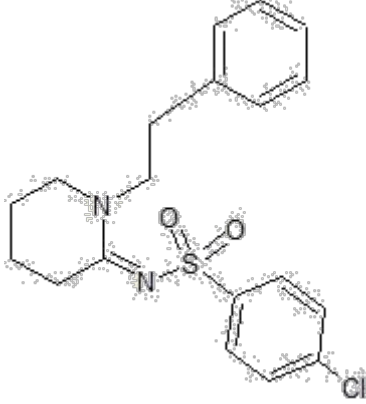
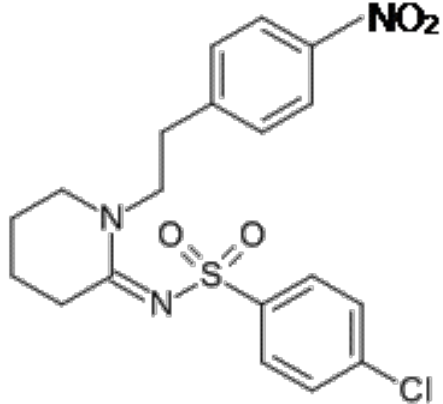
- Держите методы до настоящего времени, не жертвуя при этом:
  - время работы
  - объемы образцов
  - Простота подготовки образца
  - Аналитическая чувствительность
  - Аналитическая сфера

# LC-MS / MS подходы в нашей лаборатории ...

- Новые синтетические опиоиды (НС) по QQQ
  - Соединения U-серии
  - соединения серии W
  - MT-45
  - Метаболиты



# НС по QQQ

AH-7921	U-47700	U-50488	U-49900
			
MT-45	W-15	W-18	
			

# Развитие НСА Метод





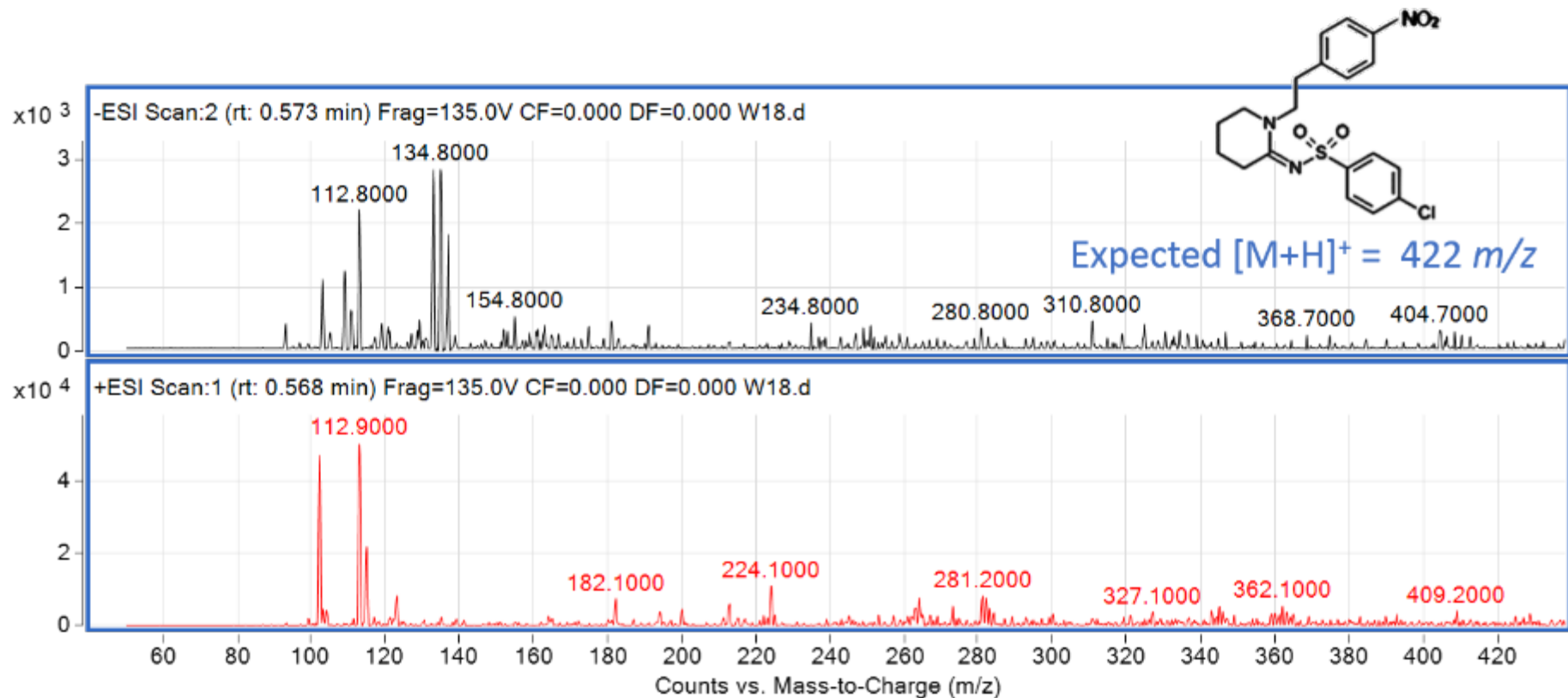
# НСУ Метод разработки: MS

- Типичный рабочий процесс:
  - Получить эталоны
  - Развести в 50:50 подвижной фазы
    - 0,1% муравьиная кислота в  $H_2O$  / Ацетонитрили
  - Вводят без колонки в MS с использованием MS2 Scan
    - Установки источника по умолчанию
    - Позитивное ESI (или оба, если не уверен)
  - Подтверждение иона-предшественника
  - Перейдите к оптимизатору для управления записей
    - Собирают 4-6 переходов и сужать позже!

Но что происходит, когда вы не можете видеть ваши  
эталонный стандарт??



# NSO Optimization: MS



MS

LC

ESI

SPE

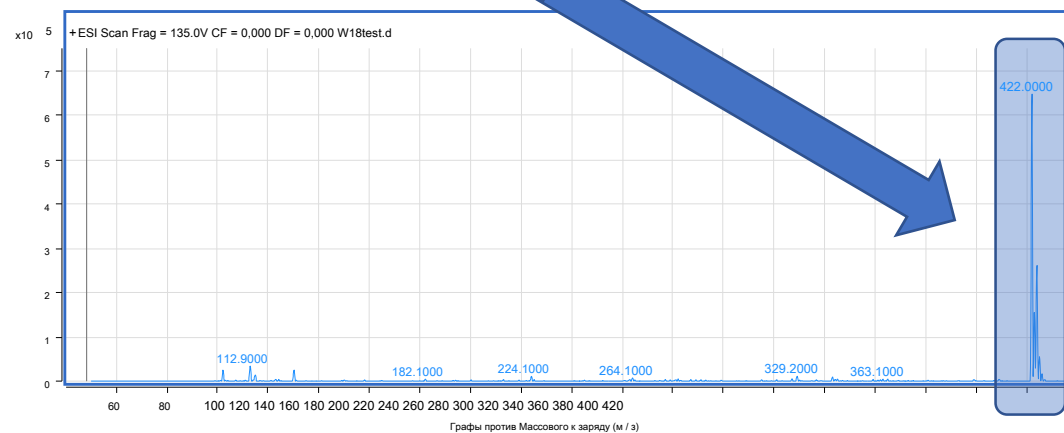
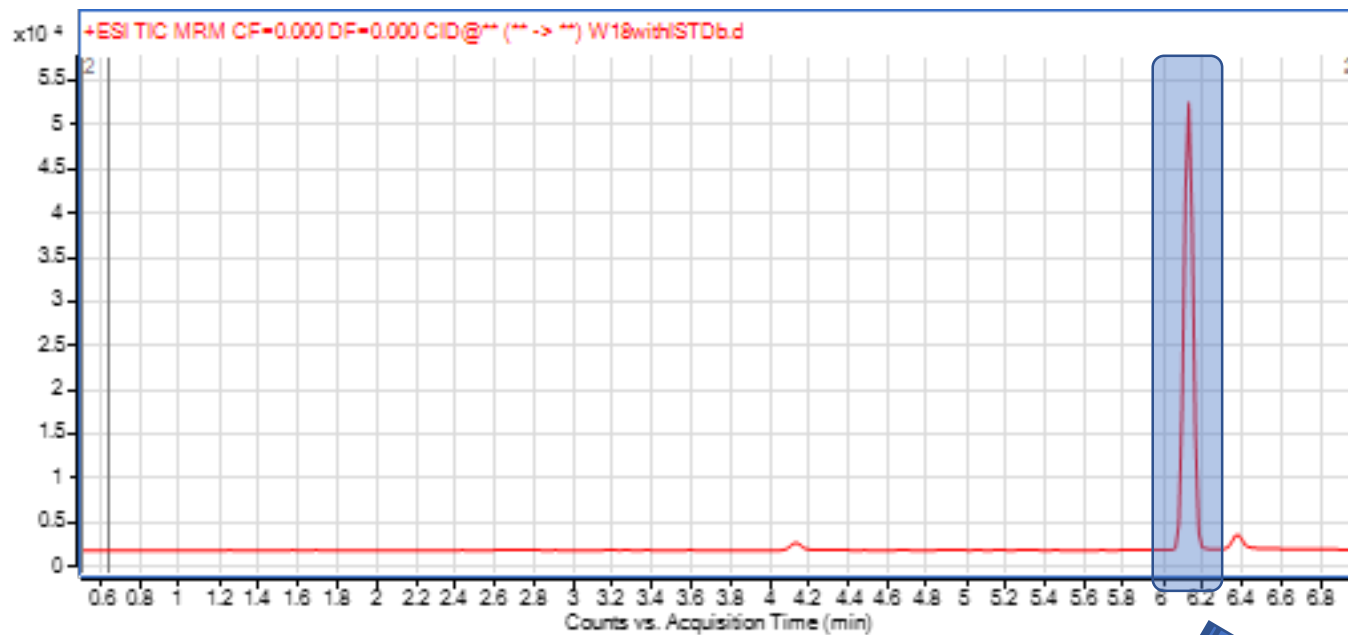
*For Forensic Use*

# МС Оптимизация: MS

- Выбор подвижной фазы
  - Необходимые для ионизации
  - Можно уменьшить или производить аддукты
- Может быть подвержены фрагментации в источник
  - Снижение напряжения Fragmentor



# НС Оптимизация MS



MS

LC

ESI

SPE

Для судебного использования

# НС Оптимизация: MS

Аналит	Предтечи Ion (M / z)	Ион продукта (M / z)	Столкновение Energy (В)	Fragmentor (В)	RRT (мин) Δ (Мин)	Внутренний стандарт
U-47700	329,2	172,9	37	117	2,738 1	U-47700-D <sub>6</sub>
	329,2	144,9	61	117		
АН-7921	329,2	144,9	57	107	2,987 1	U-47700-D <sub>6</sub>
	329,2	46,2	21	107		
U-49900	357,1	172,9	37	120	3,263 1	U-47700-D <sub>6</sub>
	357,1	144,9	65	120		
U-50488	369,1	158,9	49	115	3,665 1	U-47700-D <sub>6</sub>
	369,1	112,1	37	115		
MT-45	349,5	181,0	20	112	4,511 1	MT-45-д <sub>11</sub>
	349,5	77,1	93	112		
W-18	422,1	111,0	50	153	6,392 1	Вт-18-д <sub>4</sub>
	422,1	75,1	50	153		
W-15	377,1	111,0	41	145	6,640 1	Вт-18-д <sub>4</sub>
	377,1	75,1	97	145		
U-47700-D <sub>6</sub>	335,2	172,9	37	112	2,733 1	-
	335,2	144,9	57	112		
MT-45-д <sub>11</sub>	369,5	181,0	20	132	4,491 1	-
	369,5	77,1	93	132		
W-18-д <sub>4</sub>	426,1	115,0	53	143	6,391 1	-
	426,1	78,1	105	143		

Дифференцировать структурные изомеры

Выбор  
приобретения.  
сMRM

ВЫБОР  
ИСТД

Для судебного использования



- Типичный рабочий процесс:
  - Выберите общую подвижную фазу
    - 0,1% муравьиная кислота в воде
    - 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле
  - Начните с колонкой Poroshell
  - Проверяют общий градиент
    - 90:10 до 10:90
  - Внедрить стандарты приобретают все оптимизированные МРМС

Но что происходит, когда вы не можете видеть ваши  
эталонный стандарт??

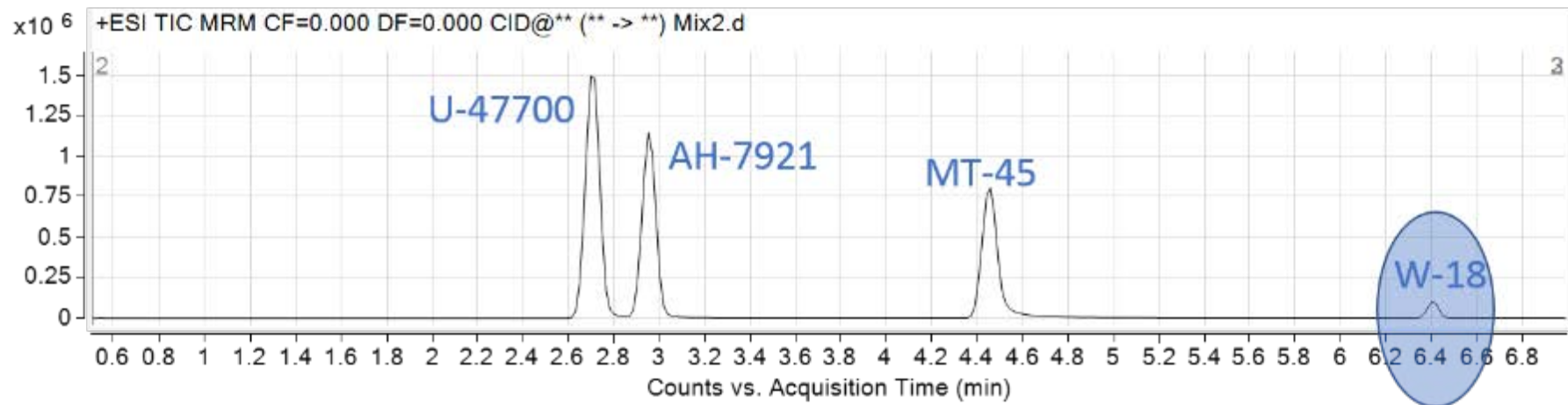


# МС Оптимизация LC

- Выбор подвижной фазы
  - Необходимые для ионизации
  - Можно уменьшить или производить аддукты
  - Можно значительно влиять на форму пика & ответ
- Переход от MRM к динамической MRM после установления хроматографии



# NSO Optimization: LC



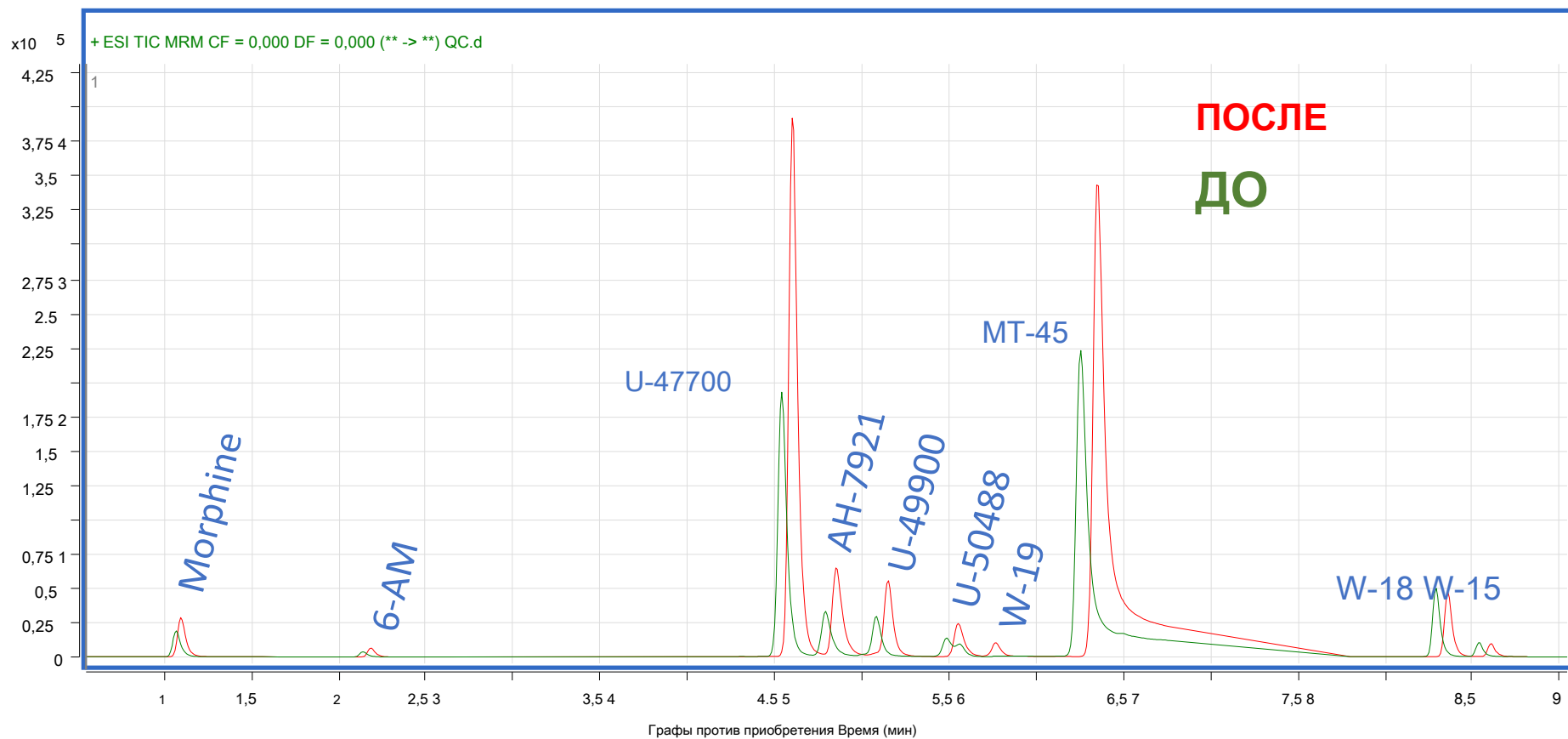
*For Forensic Use*

# НС Оптимизация ESI

- Типичный рабочий процесс:
  - Изучение пиков ответов и оценки LOD
  - С помощью оптимизированной хроматографии, вводят смешанные стандарты и оценивать параметры источника
  - Программное обеспечение Источник Optimizer



# НС Оптимизация ESI



Для судебного использования



# НС Оптимизация ESI



MS

LC

ESI

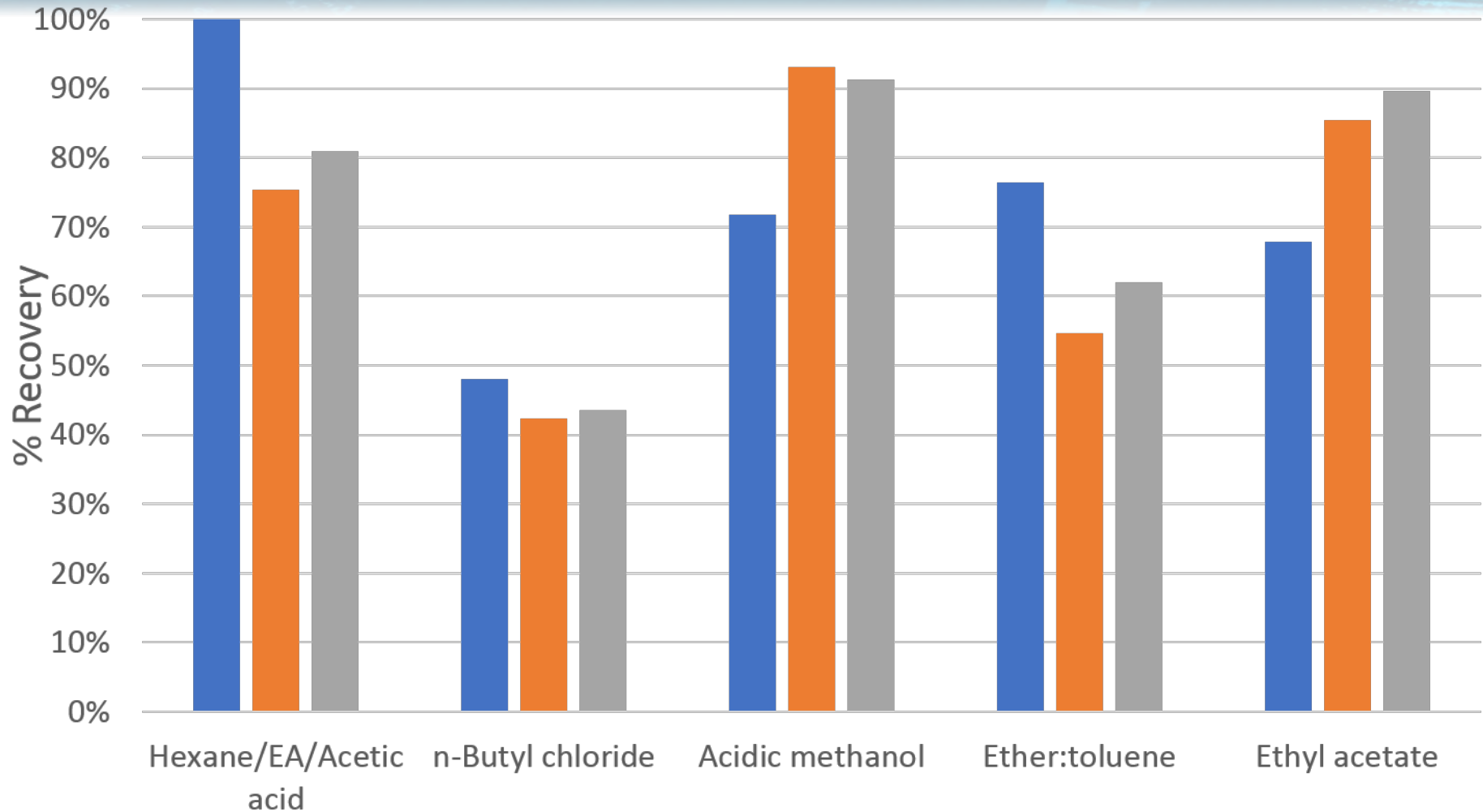
SPE

# НС Оптимизация SPE

- Типичный рабочий процесс:
  - Полимерный, смешанный режим SPE картридж
  - Начнем с основных этапов:
    - Буфер выборки (фосфатный буфер)
    - образец нагрузки
    - Мытье (вода, кислота)
    - сухой
    - Мытье (гексан)
    - Элюировать кислый / нейтральный (этилацетат)
    - Мытье (метанол)
    - Элюировать основные (ДХМЫ: МП с аммиаком)
  - Всегда проверяйте матричные эффекты & Recovery, как вы идете!



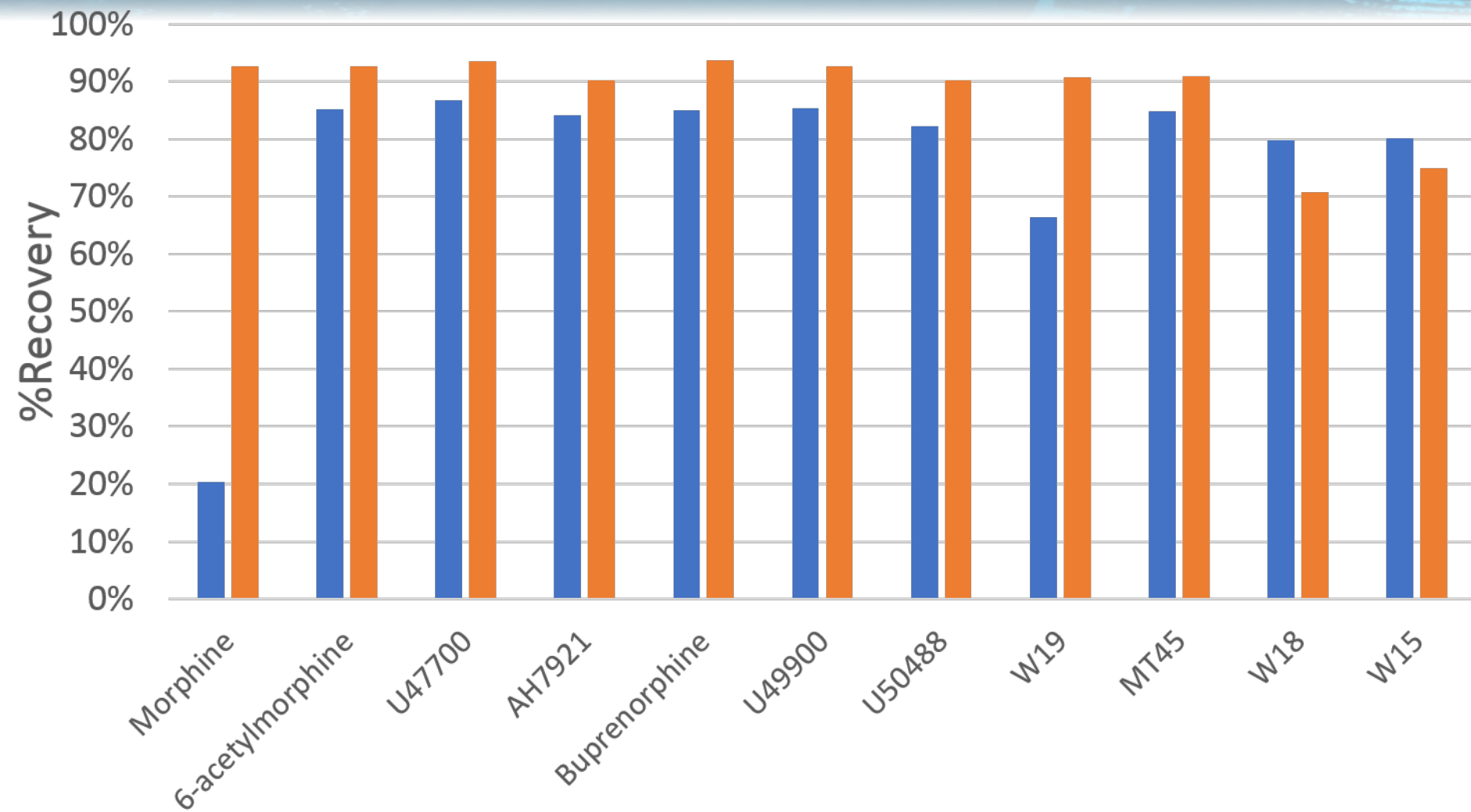
# НС Оптимизация SPE



■ W19 ■ W18 ■ W15

Для судебного использования

# НС Оптимизация SPE



■ 2% Ammonium Hydroxide ■ DCM:IPA:Ammonia

# НС Оптимизация SPE

- Настройка томов
  - объем пробы
  - объем буфера
  - объем Wash
  - объем элюирования
  - объем Воссоздание
- Регулировка растворителя выбор
  - Wash растворители
  - Кислотный / нейтральный элюирующий растворитель
  - Основные элюирующий растворитель
- Изучение сложных концентраций
- Изучение нескольких источников матрицы
- Устранение ненужных переходов после развития
- Отрегулировать параметры LC, если не может устранить помехи



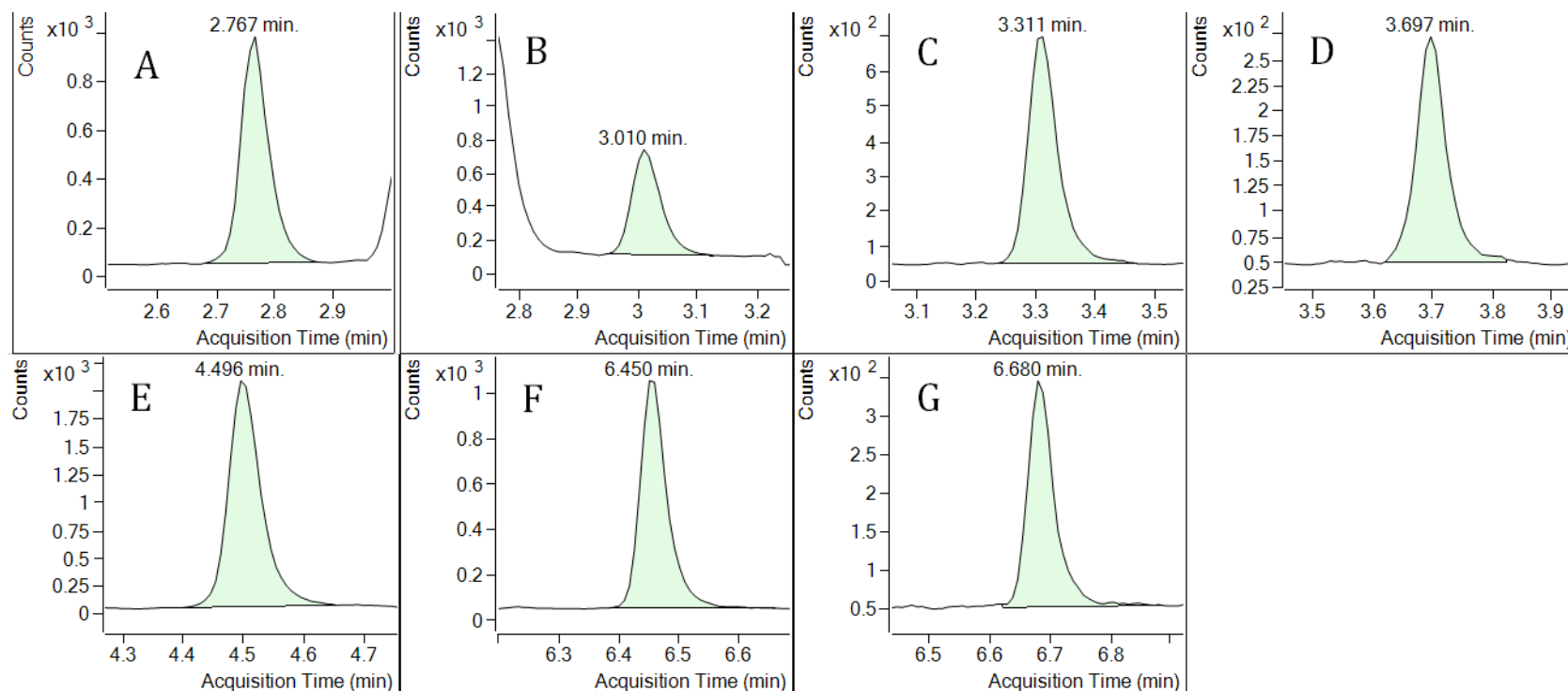


# Окончательный метод НСУ

- 0,5 мл крови
- SPE
  - Элюировать кислой / нейтральной реакции с этилацетатом
  - Элюции основной с 80/20 DCM / IPA с 5% аммиака
- Развести в 1 мл (!)
- Подвижная фаза: 0,05% муравьиная кислота с 5 мМ формиата аммония
- Градиентное элюирование, 0,5 мл / мин, 11 мин время выполнения
- колонка Poroshell (120 EC-C18)

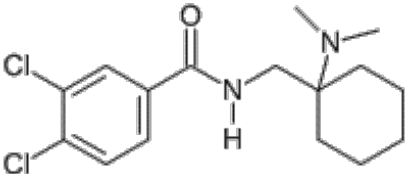
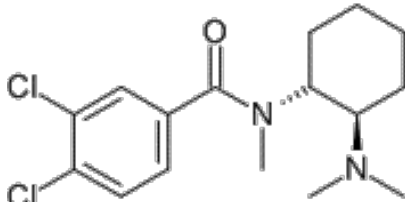
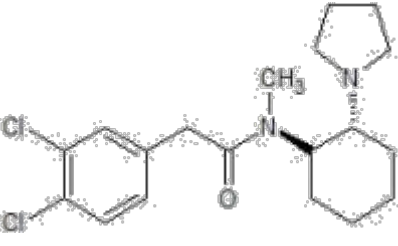
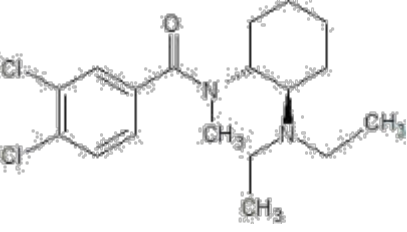
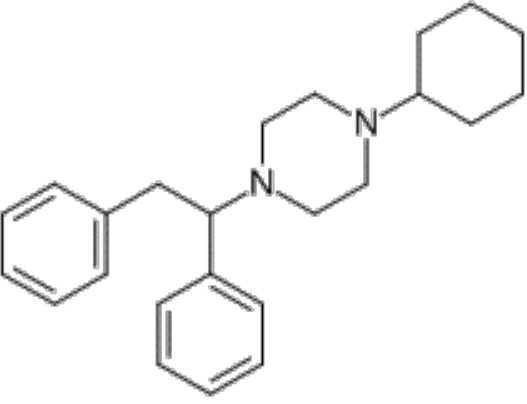
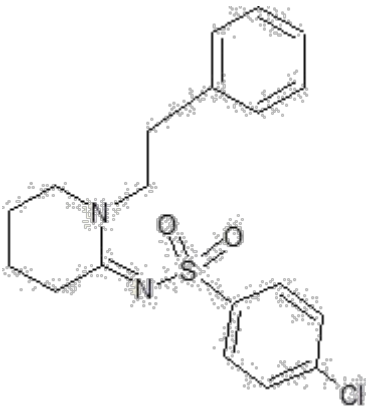
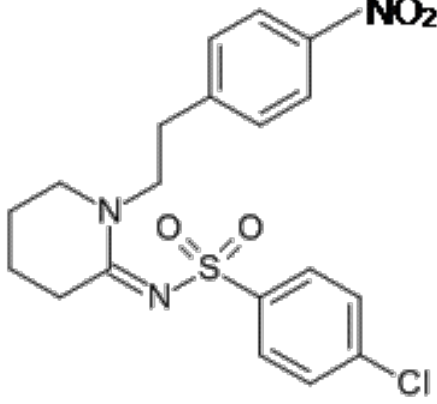
# НСУ Метод ~~за~~ проверки

- Руководство SWGTOX
- LOD: 0,125 нг / мл
- Линейность: 0,25 - 100 нг / мл (1 - 100 для W-18)
- Эффекты матрицы  $\leq \pm 19\%$
- Восстановление 62,3 - 92,0%
- $r^2 > 0,99$  ( $n = 5$ )
- Уклон и точность  $\leq \pm 17\%$
- Стабильный: 22 ° C (24 ч), 4 ° C (72 ч), пробоотборник (4 ° C, 72 ч)



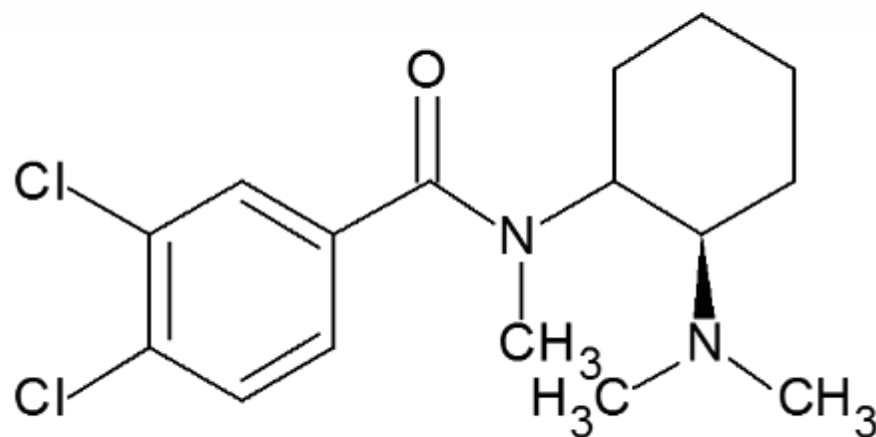
Извлеченные ионные хроматограммы для количественной оценки переходов на их LLOQs для (A) U-47700, (B) AH-7921, (C) U-49900 (D) U-50488 (E) MT-45, (F), W- 18, и (G), W-15

# U-47700

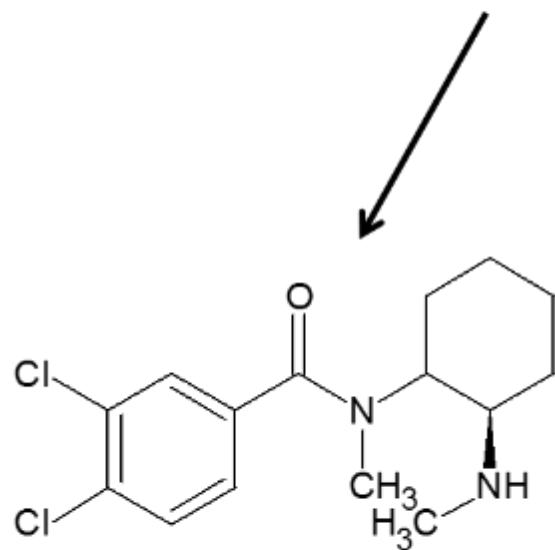
AH-7921	U-47700	U-50488	U-49900
			
MT-45	W-15	W-18	
			

# U-47700 by QQQ

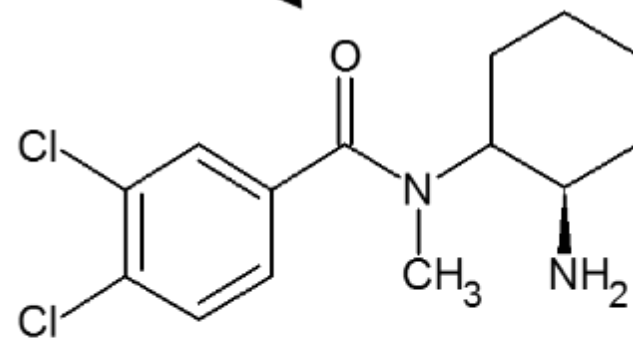
заглавие



U-47700



N-desmethyl-U-47700

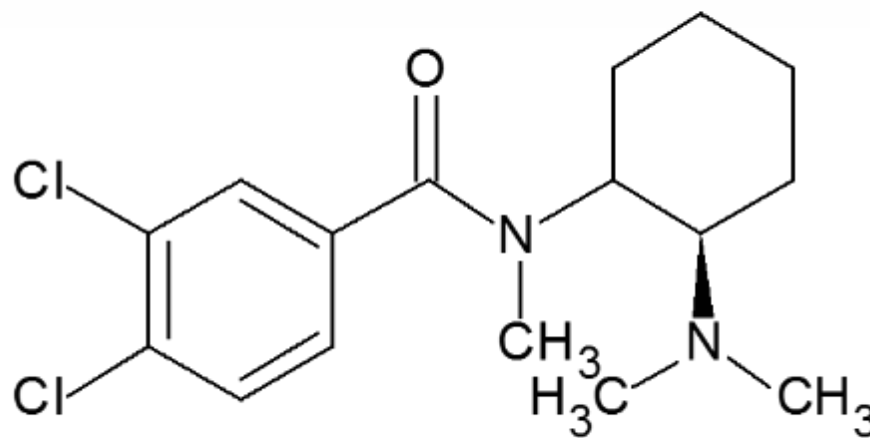


N,N-didesmethyl-U-47700

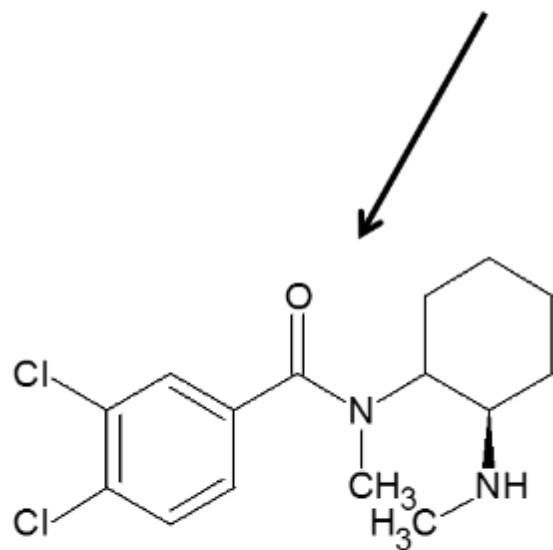
For Forensic Use

# U-47700 by QQQ

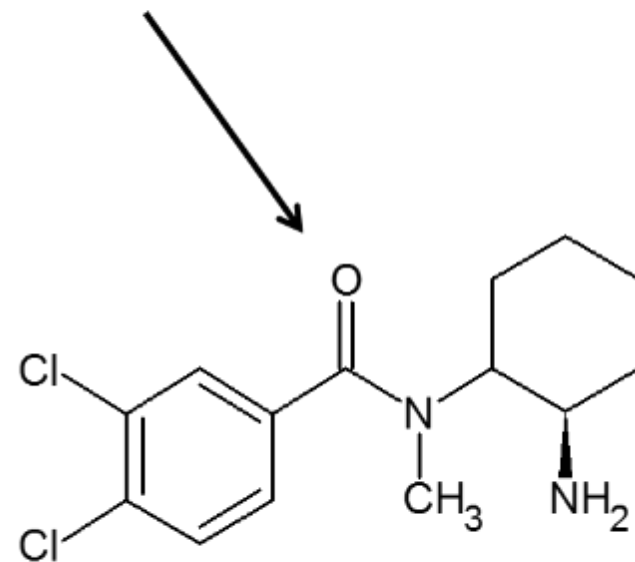
заглавие



U-47700



dm-U4



ddm-U4

*For Forensic Use*

- Начну с установленным способом, ранее одобренным для всех синтетических опиоидов



- Предполагаемая оптимизация:
  - MS: Оптимизация метаболитов и добавить MPMC
  - LC: Сократить время работы
  - SPE: Уменьшение объема образца (за счет применения)



# U-47700 Оптимизация: MS

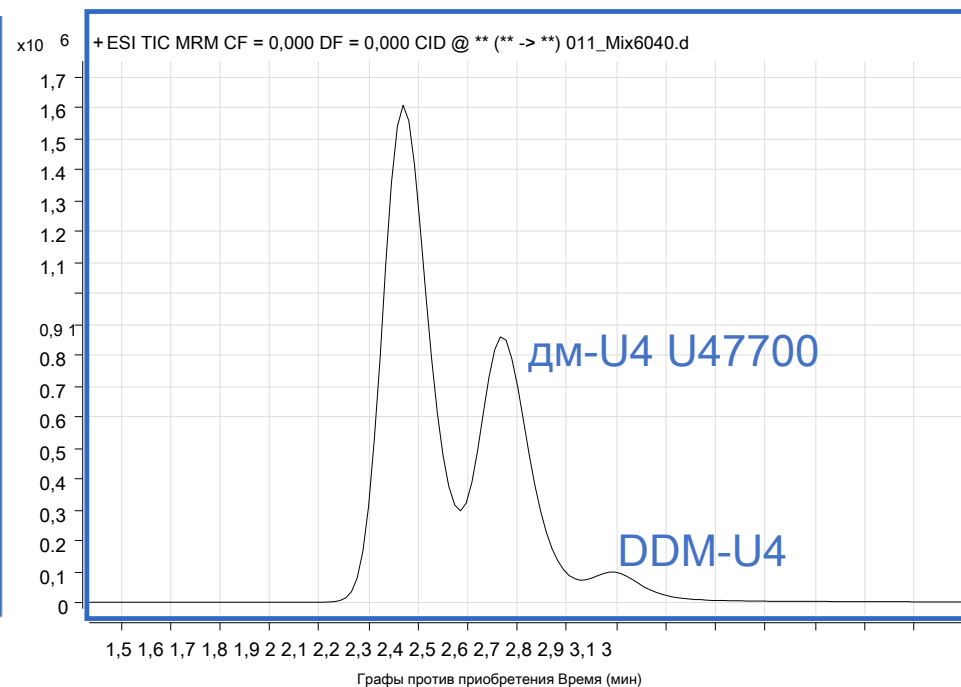
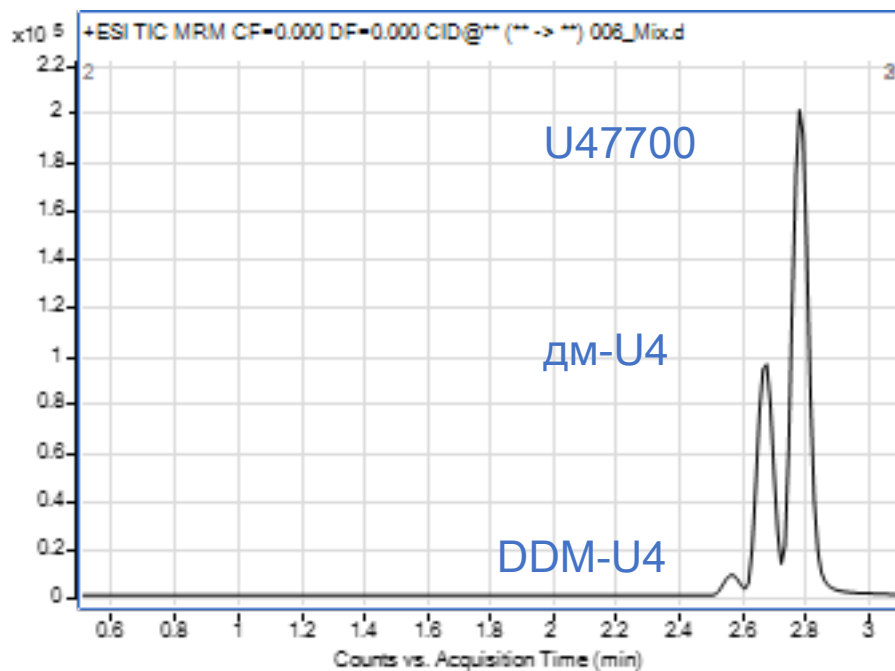
- Оптимизация:
  - MS: Оптимизация метаболитов и добавить MPMC

Аналит	Предтечи Ion (М / з)	Ион продукта (М / з)	Столкновение Energy (В)	Fragmentor (В)	Задержка (мс)	Внутренний стандарт
U-47700	329,2	172,9	32	117	20	U-47700-D <sub>6</sub>
	329,2	144,9	56	117	20	
дм-U4	315,2	172,9	32	107	20	U-47700-D <sub>6</sub>
	315,2	144,9	52	107	20	
DDM-U4	301,1	189,9	20	120	20	U-47700-D <sub>6</sub>
	301,1	144,9	56	120	20	
U-47700-D <sub>6</sub>	335,2	172,9	36	112	20	-
	335,2	144,9	60	112	20	



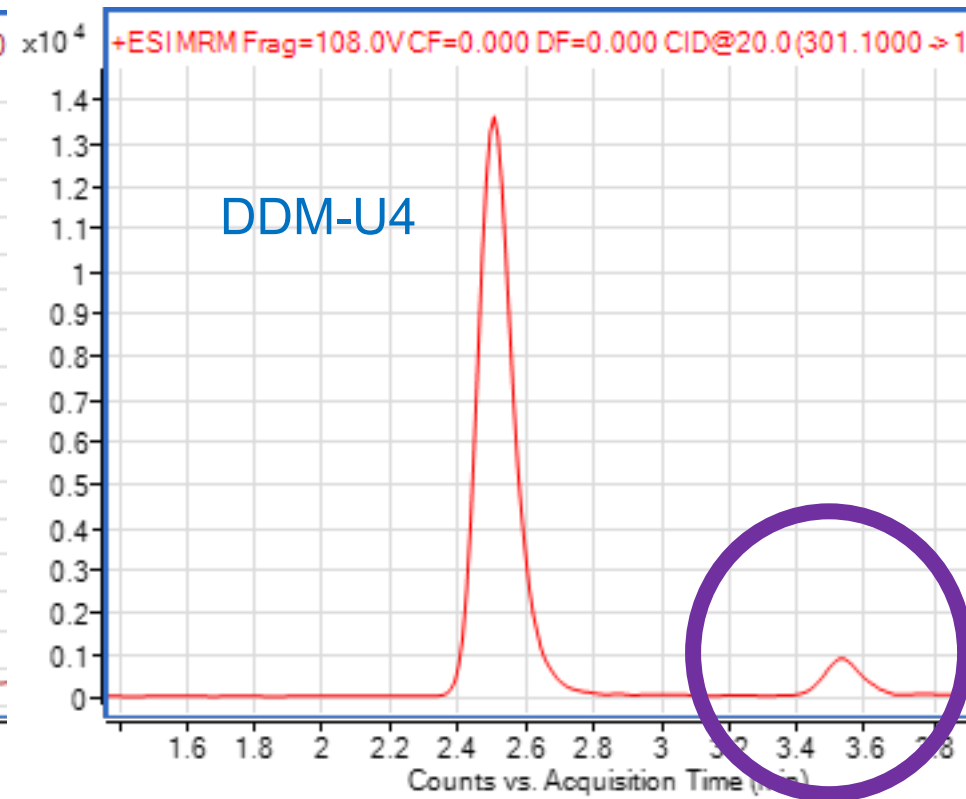
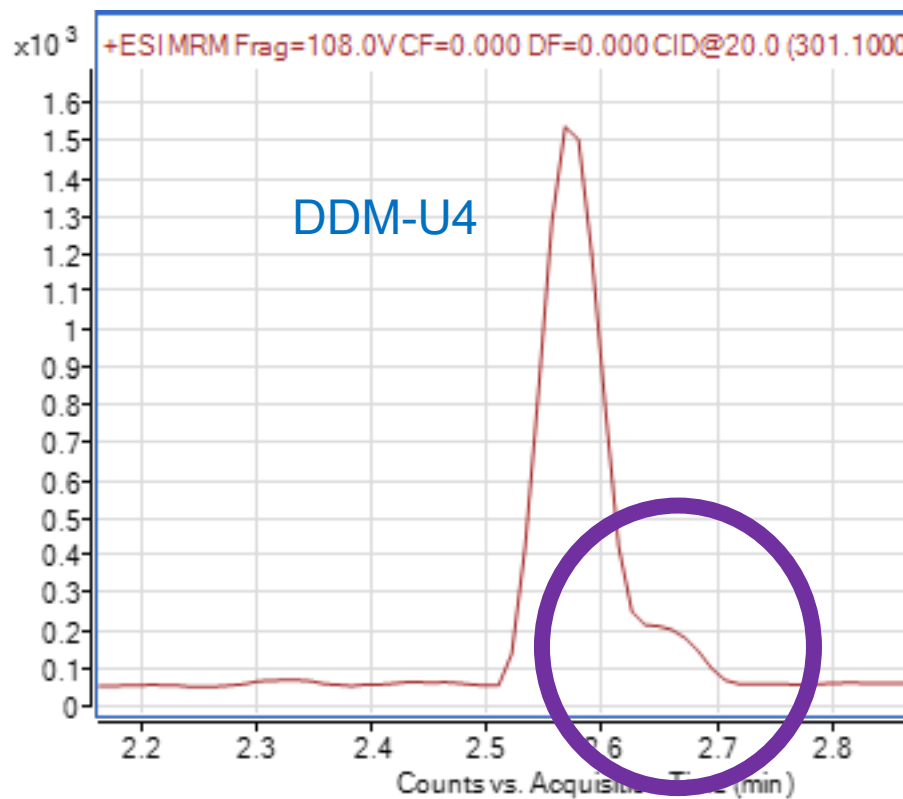
# U-47700 Оптимизация: LC

- Ацетонитрил против Метанол



# U-47700 Оптимизация: LC

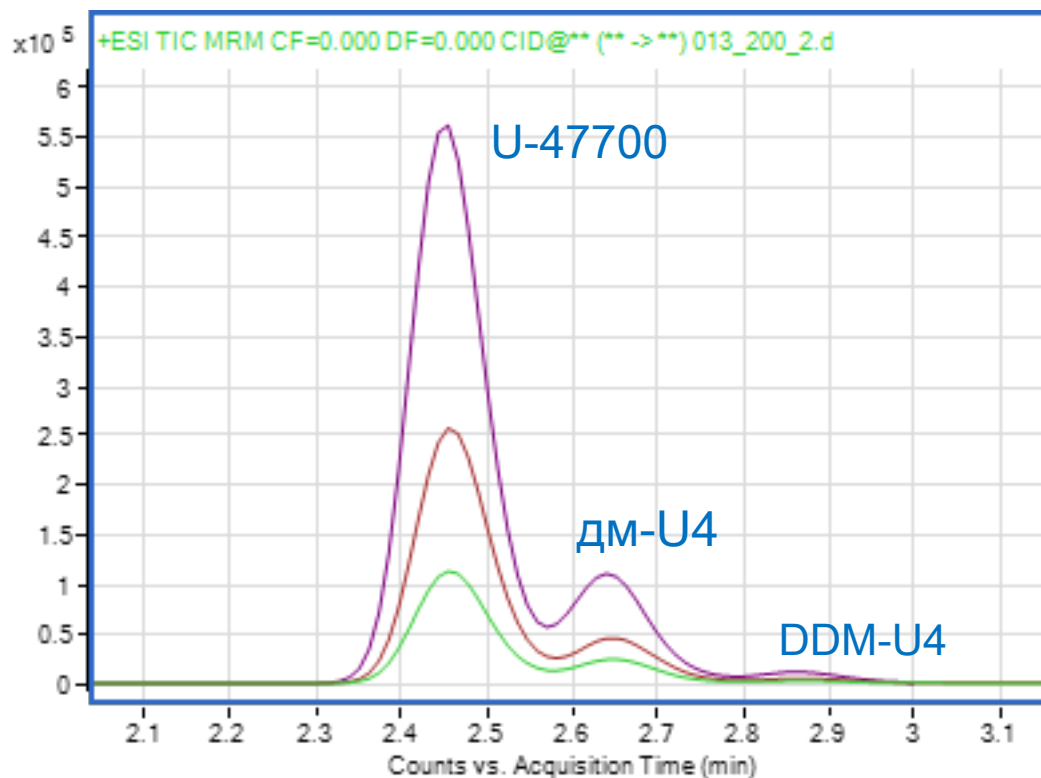
- Ацетонитрил против Метанол



# U-47700 Оптимизация SPE

- SPE: Уменьшение объема образца (за счет применения)
- Чтобы максимизировать аналитическую чувствительность к наименее чувствительному аналиту (DDM-U4), оптимизированный:
  - объем Воссоздание

- 50 мкл
- 100 мкл
- 200 мкл

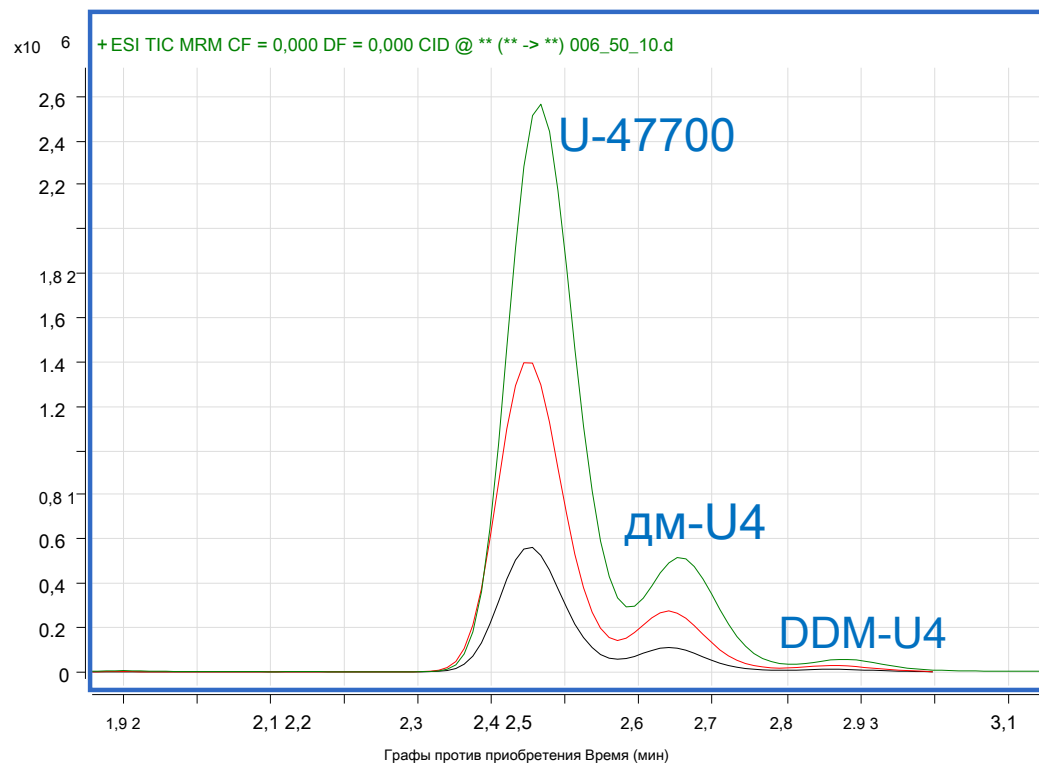


Для судебного использования

# U-47700 Оптимизация SPE

- SPE: Уменьшение объема образца (за счет применения)
- Чтобы максимизировать аналитическую чувствительность к наименее чувствительному аналиту (DDM-U4), оптимизированный:
  - объем впрыска

- 10 мкл
- 5 мкл
- 2 мкл



Для судебного использования

# U-47700 Закрепительный метод

- 0,1 мл плазмы
- SPE
  - Нет кислая / нейтральная элюирование
  - Элюции основной с 80/20 DCM / IPA с 5% аммиака
- Развести в 50 мкл
- Мобильная фаза А: 0,05% муравьиная кислота с 5 мМ формиата аммония
- Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в метаноле
- Изократическое элюирование, 0,4 мл / мин, 6 мин Время работы
- колонка Zorbax (Eclipse Plus C18)

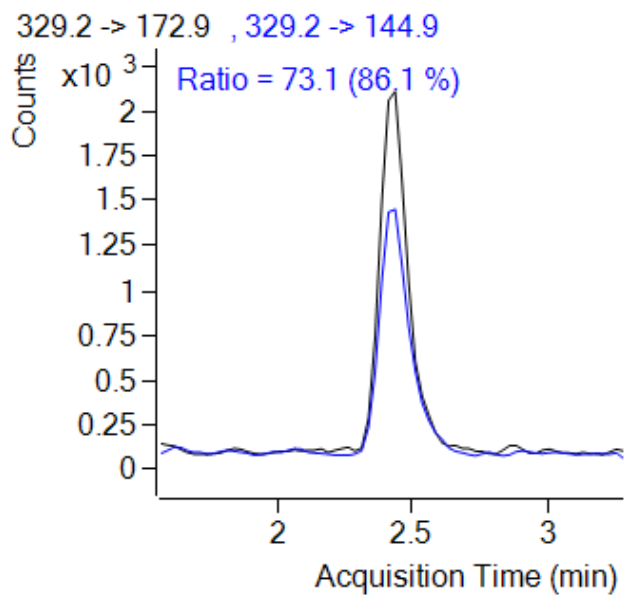
# U-47700 Метод проверки

- Руководство SWGTOX
- LOD: 0,05 нг / мл
- Линейность: 0,1 - 100 нг / мл (0,5 - 100 для DDM-U4)
- Эффекты матрицы  $\leq \pm 5\%$
- Восстановление 79,4 - 88,0%
- $r^2 > 0,99$  ( $n = 5$ )
- Смещение и точность  $\leq \pm 13,6\%$
- Стабильный: 22 ° C (24 ч), 4 ° C (72 ч), 3 замораживания / оттаивания циклов, пробоотборник (4 ° C, 72 ч)

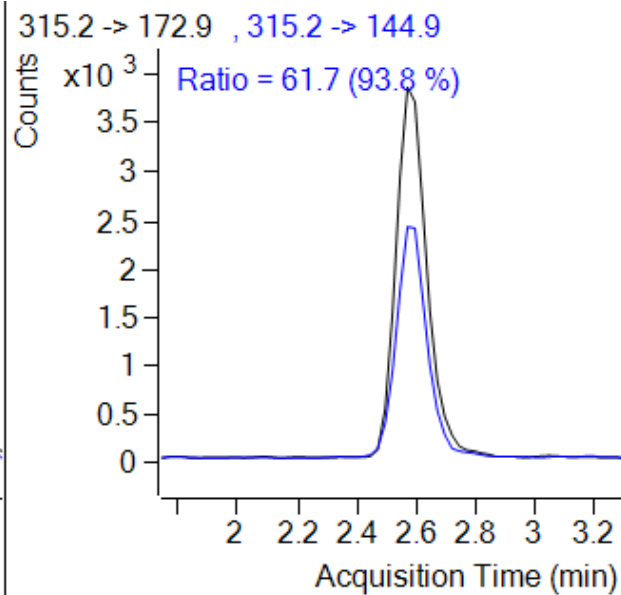


# U-47700 & Метаболиты в LOQ

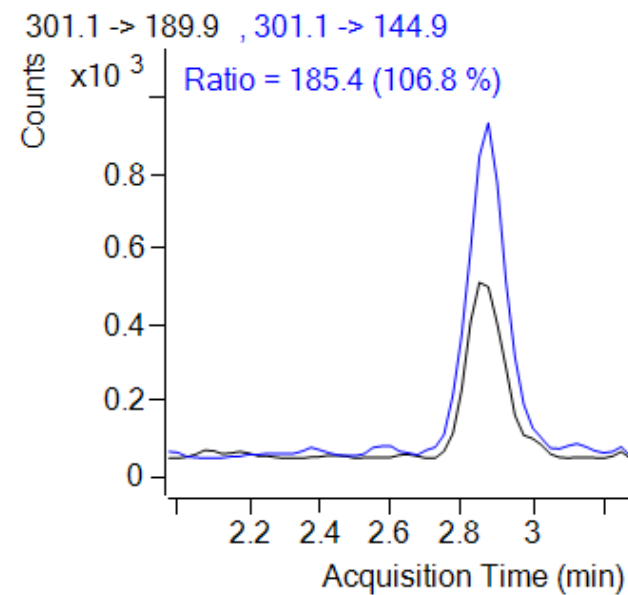
U-47700



дм-U4



DDM-U4



# Возникающий Проблема-MS / MS

- Обратите внимание на структуру и рКа, как это будет влиять на:
  - режим ESI
  - Выбор подвижной фазы
  - производительность Extraction
- Провести время оптимизации хроматографии
  - Рассмотрим различные столбцы, модификаторы, растворители &
- Не скупитесь на развитие добычи
  - Может потребоваться рассмотреть несколько шагов элюирования
  - Оптимизация объемов по мере необходимости
- Всегда рассматривайте аналитическую чувствительность к тому, что вы пытаетесь достичь

# Подтверждения

- Национальный институт юстиции, решение № 2017-R2-CX-0019
- Сэм Хьюстон государственный университет, Научно-образовательный грант
- Agilent Technologies



**Research Group Swortwood 2017-2018**

# Вопросов?

Мадлен Дж Swortwood, доктор философии

[swortwoodm@shsu.edu](mailto:swortwoodm@shsu.edu)



Sam Houston  
State University