

Ein automatisiertes MSⁿ-basiertes Screening-Verfahren für die klinische und forensische Toxikologie

Laura M. Huppertz, Susanne Vogt, Jürgen Kempf

Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Albertstraße 9, 79104 Freiburg

Abstract

Aims: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) combined with library search is an emerging screening technology in clinical and forensic toxicology. This project aimed at developing a robust and easy-to-use solution for the detection and identification of drugs and drugs of abuse in biological specimens using an LC ion trap-MS system.

Methods: Serum samples were prepared according to a liquid-liquid extraction (LLE) protocol. Chromatographic separation was performed using a Dionex Acclaim RLSC C18 100 x 2 mm column and an 11-minute LC gradient with formic acid/acetonitrile. An amaZon speed ion trap MS was used to generate MS² and MS³ spectra according to a scheduled precursor list (SPL) triggered acquisition process. For the identification of drugs, our in-house generated spectral library, containing retention times, MS and MS²/MS³ information of currently 839 compounds, was used. Data evaluation and reporting were carried out by a fully automated spectra library search tool.

Results and Discussion: For the evaluation of this new, automated MSⁿ based screening procedure blank serum samples were spiked with three different sets of drugs (antidepressants, benzodiazepines and hypnotics) at low, medium and high therapeutic or toxic levels. The contents of these samples were blinded, automatically processed and analyzed by 7 independent LC-MSⁿ ion trap systems at 5 different laboratories. The automated data evaluation revealed a high reproducibility of correct identifications and an overall high transferability between different laboratories.

Conclusions: The presented screening procedure offers a fast and robust identification tool for clinical and forensic analysis. The combination of MS²/MS³ spectra and retention time information allows a reliable identification of drugs and metabolites. The high degree of automation is ideally suited for the transfer of this solution to routine laboratories.

1. Einleitung

Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ist eine der aufkommenden Screening-Technologien in der klinischen und forensischen Toxikologie. Diese Verfahren sind spezifischer als die weitverbreiteten immunchemischen Verfahren, universeller einsetzbar als die Detektion mit LC-UV und decken im Vergleich zur GC-MS eine größere und in mancher Hinsicht komplementäre Anzahl an Analyten ab. Die Identifikation erfolgt in der Regel über die Retentionszeit und MS²-Spektren in Kombination mit Spektrenbibliothekssuche oder mittels hochauflösender Massenspektrometrie.

In diesem Projekt wurde ein robustes, automatisiertes Verfahren zum Nachweis von Medikamenten, Drogen und deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten mit Hilfe einer LC-MSⁿ Ionenfalle entwickelt. Die Analyse erfolgt mit einer schnellen LC-Methode kombiniert mit der auto-MSⁿ-Fähigkeit der amaZon speedTM Ionenfalle. Eine automatisierte Routine zur einfachen und benutzerfreundlichen Auswertung von Daten und zur Reporterstellung führen innerhalb kürzester Zeit zu Analyseergebnissen.

2. Material und Methoden

2.1. Toxyper

Für die Probenaufarbeitung wurde eine basische Flüssig-flüssig-Extraktion verwendet [1]. 1 ml Serum wurde mit 50 ng D5-Diazepam als Internem Standard versetzt, der pH-Wert wurde mit 0,5 ml Boratpuffer (pH 9) eingestellt und die Extraktion erfolgte mit 1,5 ml 1-Chlorbutan. Nach 3 min Durchmischen mittels Überkopfschüttler und 5 min Zentrifugation bei 4000 U/min wurde der organische Überstand in ein LC-Vial überführt und unter Stickstoff bei 40°C getrocknet. Der Rückstand wurde in 25 µl Fließmittel A:B (50:50, v/v) konstituiert.

Das verwendete LC-MS-System besteht aus einer Dionex UltiMate 3000 Anlage und einer amaZon speed Ionenfalle (Bruker Daltonik). Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Acclaim® RSLC 120 C18 (2,2 µm 120 A, 2,1x100 mm) Säule von Dionex und einem 11-minütigen Gradienten. Als Fließmittel wurden 0,1 %ige Ameisensäure und Acetonitril, jeweils mit 2 mmol Ammoniumformiat, verwendet.

Massenspektren wurden im ultraScan Mode (32000 Da/s) im Massenbereich von 70 bis 800 Da mit alternierender Polarität (ESI) aufgenommen. Die Auswahl der Precursor-Ionen für die datenabhängige Aufnahme von MS²- und ggf. MS³-Spektren erfolgte über eine hinterlegte Scheduled Precursorliste (SPL).

Für den automatischen Spektrenvergleich wurde eine Spektrenbibliothek mit derzeit 839 Analyten verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über ein DataAnalysis-basiertes Script. Als Cut-off für die positive Identifizierung und Aufnahme in den Ergebnisbericht wurde ein minimaler Score-Wert von 700 definiert.

2.2. Interlaborvergleich

Für den hier durchgeführten Interlaborvergleich wurde humanes Leerserum mit 3 verschiedenen Stocklösungen mit forensisch und toxikologisch relevanten Substanzen dotiert (Tab. 1). Die Auswahl der Substanzen erfolgte anhand von Realfällen, wie sie routinemäßig in unserem Labor vorkommen ohne Beachtung substanzspezifischer Parametern wie Retentionszeit oder Molekularmasse. Die Proben wurden mit der oben beschriebenen Flüssig-flüssig-Extraktion extrahiert. Die Extrakte wurden aliquotiert und der eingedampfte Rückstand zur Analyse an 5 Labore verschickt. Insgesamt standen 7 LC-MS Systeme (3 in klinischen Routinelaboren, 1 in einem forensischen Labor, 3 in F&E-Laboren) für den Vergleich zur Verfügung. Die Datenauswertung und Report-Erstellung wurde automatisch mit dem zur Verfügung gestellten Toxyper System durchgeführt.

Tab. 1. In Probe 1-3 dotierte Substanzen in *subtherapeutischer*, *therapeutischer* und toxischer Konzentration (ng/ml).

Probe 1	Probe 2	Probe 3
Methadon (250)	Trimipramin (100)	Duloxetine (600)
EDDP (50)	Amitriptylin (100)	Nordoxepin (300)
Diazepam (100)	Zolpidem (500)	Mirtazapin (50)
Nordazepam (500)	Midazolam (150)	Metoprolol (200)
Oxazepam (200)	α-OH-Midazolam (50)	
Temazepam (100)	Fentanyl (3)	
	Lidocain (200)	

3. Ergebnisse und Diskussion

Zum Nachweis der Übertragbarkeit und Leistungsfähigkeit des Toxytyper Arbeitsablaufes auf verschiedenen amaZon Ionenfallen wurden die automatisch erstellten Ergebnisberichte der teilnehmenden Labore ausgewertet. In Fällen, in denen eine Substanz nicht identifiziert werden konnte, wurde mit Hilfe der Rohdaten eine mögliche Ursache gesucht.

Probe 1: Alle teilnehmenden Labore konnten die dotierten Analyten korrekt identifizieren.

Probe 2: Die Ergebnisse der automatischen Reports von Probe 2 sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Trimipramin konnte von 2 Laboren nicht identifiziert werden. Eine Überprüfung der jeweiligen Rohdaten zeigte, dass im Labor UK eine massive Matrix-Koelution zu einem gemischten MS²-Spektrum führte und der Score des Spektrenvergleichs dadurch unter den, für eine positive Identifizierung erforderliche cut-off von 700 fiel.

Probe 3: Metoprolol konnte auf den Systemen HUG 1 und HUG 2 nicht identifiziert werden. Grund dafür war die Koelution von Mirtazapin, was zu einem gemischten MS²-Spektrum und einem Score-Wert kleiner 700 führte.

Probe 4 (Nullprobe): In der Nullprobe und den anderen Proben konnten bereits bekannte "Falsch Positive" identifiziert werden. Die meisten davon konnten bei Durchsicht der Reports und der entsprechenden Rohdaten eindeutig als falsch positiv ausgeschlossen werden. Ein gängiger falsch positiver Treffer ist z. B. Benzododecinium, eine Substanz, die u. a. in Hautdesinfektionsmittel enthalten ist.

Tab. 2. Ergebnisse des Interlabor-Vergleichs.

Analyt	Teilnehmer							
	Probe 2	IKC	IRM	HUG 1	HUG 2	UK	BDAL 1	BDAL 2
Amitriptylin	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
α-OH-Midazolam	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fentanyl	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Lidocain	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Midazolam	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Trimipramin	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Zolpidem	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	✓
D5-Diazepam (IS)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Probe 3	IKC	IRM	HUG 1	HUG 2	UK	BDAL 1	BDAL 2	
Duloxetin	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Metoprolol	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	
Mirtazapin	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Nordoxepin	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
D5-Diazepam (IS)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Der Toxytyper Ergebnisbericht (eine pdf-Datei) kann über die Weboberfläche von Compass OpenAccess eingesehen werden, oder per Mail direkt an den verantwortlichen Toxikologen versendet werden. Die dem Report zu Grunde liegenden Messdaten können manuell per DataAnalysis Software eingesehen und bearbeitet werden.

Die Übertragbarkeit der Fragmentierung an verschiedenen amaZon speed Ionenfallen kann durch Vergleiche der MS Spektren dotierter Substanzen in Matrix gezeigt werden. Abbildung 1 zeigt die aus dotiertem Serum aufgenommenen MS²-Spektren von Amitriptylin der 7 Teilnehmer, sowie das dazugehörige Bibliotheksspektrum. Der zur Fragmentierung verwendete SmartFragTM Algorithmus, mit dessen Hilfe ein Großteil der gerätespezifischen und bei Kalibration entstehenden Variationen eliminiert werden kann, führt zu reproduzierbaren und von Gerät zu Gerät übertragbaren Fragmentierungsmustern.

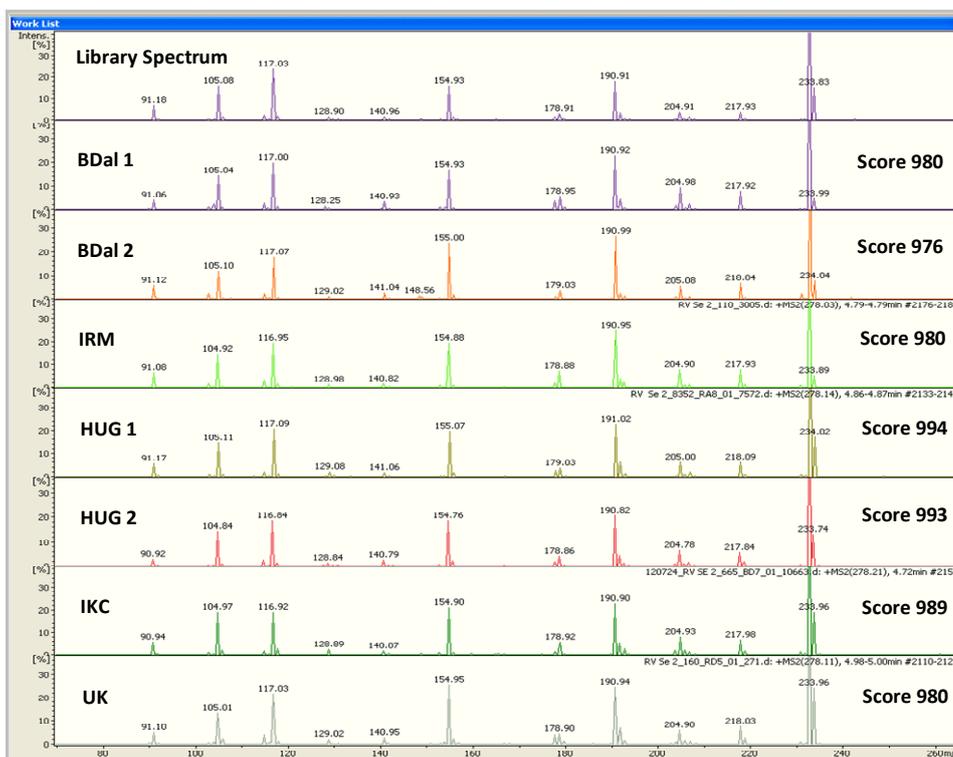


Abb. 1. MS² Spektrum von Amitriptylin aus dotiertem Serum aufgenommen mit 7 verschiedenen amaZon speed Ionenfallen.

4. Schlussfolgerung

Der hier präsentierte Toxytyper Arbeitsablauf ist eine schnelle und robuste Screening-Möglichkeit für die klinische und forensische Toxikologie. Die Kombination von MS²/MS³ Spektren und Retentionszeit erfüllt die gängigen Kriterien zur Identifikation von Analyten mittels chromatographisch-massenspektrometrischer Verfahren. Durch den mit Compass Open-Access ermöglichten hohen Automatisierungsgrad eignet sich die Methode für Routine-Labors mit hohem Probenaufkommen.

Die Daten des Interlaborvergleichs zeigen die Effizienz und Übertragbarkeit der Methode auf 7 unabhängige Analysensysteme in 5 unterschiedlichen Routine- oder Forschungslaboren. Die hohe Rate an korrekt identifizierten Substanzen in den verschiedenen Laboren zeigt die Leistungsfähigkeit dieses Ansatzes. Eine manuelle Durchsicht der automatischen Reports durch geschulte Mitarbeiter ist vor Freigabe der Ergebnisse dennoch unabdingbar. Die geplante Einführung eines optimierten, substanzabhängigen Schwellenwerts könnte zur weiteren Verminderung von falsch positiven Ergebnissen beitragen.

Die Verwendung zusätzlicher Bibliotheken zur Bearbeitung spezieller Fragestellungen, wie z. B. der Nachweis illegaler Drogen, eröffnet weitere Möglichkeiten des Hochdurchsatz-Screenings auf bestimmte Substanzklassen [2].

5. Literatur

- [1] Systematic evaluation of 1-chlorobutane for liquid-liquid extraction of drugs, 43rd International TIAFT Meeting, 2005, 29.08.-02.09.2005 Seoul
- [2] Trapping 'Spice': A comprehensive, automated LC-ion trap-MS screening approach for the detection of currently 38 synthetic cannabinoids in serum (P03), XVIII. GTFCh-Symposium, 18.-20.04.2013 Mosbach Baden (s. a. den Beitrag in diesem Proceedings Band).