

Extensive automation of the SPE-GC/MS analysis of opiates, cocaine, their metabolites and methadone from serum and other matrices

Oliver Temme¹, Oliver Lerch², Gernot Brauers¹, Thomas Daldrup¹

¹Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität, Forensisch-toxikologische Abteilung, Moorenstraße 5, D-40225 Düsseldorf

²Gerstel GmbH & Co KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, D-45473 Mülheim an der Ruhr

Abstract

Aim: The application of an extensively automated method for the analysis of cocaine, benzoylecgonine, methadone, morphine, codeine, dihydrocodeine and monoacetylmorphine basing on a validated semi automated routine method was verified.

Methods: The “online” preparation of precipitated blood, serum, urine and different tissues was performed on a x-y-z robot including the solid phase extraction with modified standard cartridges (Bond Elut Certify), evaporation of the eluate, derivatization (silylation) and injection into a GC/MS. Over 150 serum samples and more than 50 samples of other matrices were analyzed and compared to the analyses performed with a validated classic semi automated standalone SPE with manual evaporation and derivatization.

Results and Discussion: The analytical results of both methods are equivalent even near the limits of quantification. To proof the correlation between the two methods corresponding concentrations were compared. Coefficients of linear regressions (coefficient of slope, coefficient of determination “R²”) were: 0.96, 0.9947 (cocaine); 0.99, 0.9800 (benzoylecgonin); 0.99, 0.9942 (morphine); 1.00, 0.9934 (codeine); 1.08, 0.9725 (methadone) and 0.99, 0.9957 (monoacetylmorphine).

For dihydrocodeine (and also for 7-amino-flunitrazepam which is not mentioned above) there are too few positive results to determine these values. For both substances accordance was proven by some control samples. The complete extraction procedure for one sample takes nearly one hour at the present state but blank injections can be interleaved so that more than 24 samples can be analyzed per day.

Conclusion: The automated method is suitable for routine analyses in forensic toxicology.

1. Einleitung

Die Bestimmung von Drogen in Körperflüssigkeiten und Geweben erfordert in der Regel eine Probenvorbereitung zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung. Obwohl die Zahl der LC-MS/MS-Methoden rapide steigt, ist die Untersuchung mittels GC-MS / (MS) immer noch die Standard-Routineanalyse in vielen forensischen Laboren. In dieser Arbeit wird ein vollständig automatisiertes SPE-GC/MS Verfahren mit einer validierten, teilweise automatisierten SPE-Methode (RapidTrace, Biotage) verglichen. Hierzu wurde durch Anbringen verschiedener Module an einen x-y-z-Roboter (MultiPurposeSampler, GERSTEL) ermöglicht, die Arbeitsschritte Probenverdünnung, SPE, Eindampfen, Derivatisierung und Probeninjektion zu automatisieren. Es wurden 168 Serumproben und 51 Proben anderer Matrices (13 Urinproben, 2 Vollblutproben, 7 Herzblutproben, 2 Proben aus lyophilisiertem Nierengewebe, 16 Proben aus Hirngewebe und 11 Proben aus lyophilisiertem Hirngewebe) mit beiden Methoden parallel analysiert, um die Gleichwertigkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

2. Material und Methoden

Nach Zugabe eines Mixes der deuterierten Analoga der Analyten (Cocain, Benzoylcegonin, 6-Monoacetylmorphin, Morphin, Codein, Dihydrocodein, Methadon, 7-Amino-flunitrazepam) zu den flüssigen Proben (Urin, Blut, Serum) folgt eine Proteinfällung durch tropfenweise Zugabe von 0,6 ml des Probenmaterials zu einem Gemisch aus 1 ml Acetonitril und 0,1 ml Isopropanol. Nach Mischen und Zentrifugieren wird ein Aliquot von 0,75 ml des Überstandes für die direkte Analyse mit dem validierten Verfahren verwendet und ein weiteres Aliquot von 0,75 ml für die spätere Analyse mit dem vollautomatisierten Verfahren gelagert (-20 °C).

Die Gewebe (Hirn und Niere, nativ und lyophilisiert) werden mittels Ultra-Turrax homogenisiert, ein Aliquot von ca. 0,6 g wird abgenommen und wie die Flüssigproben weiterverarbeitet, wobei allerdings das Acetonitril/Isopropanol-Gemisch zu dem Gewebe gegeben wird.

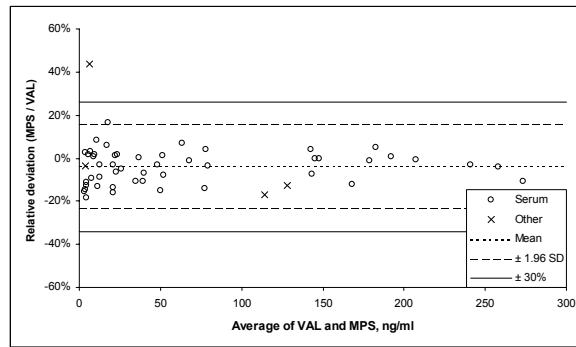
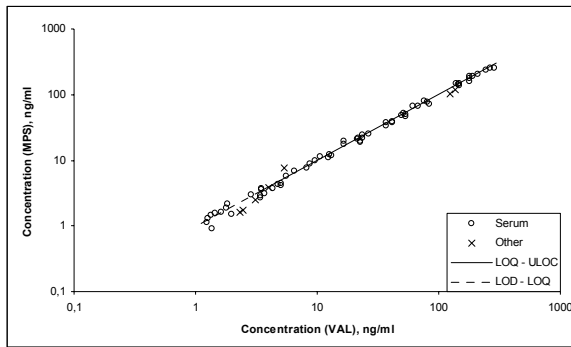
Tab. 1. Festphasenextraktionen.

Material / Arbeitsschritt	Teilautomatisierte Methode	Vollautomatisierte Methode
	RapidTrace (Biotage)	MultiPurposeSampler (GERSTEL)
SPE Kartusche	Bond Elut Certify 130 mg, 3 ml (Agilent Technologies)	
Konditionierung	2 ml Methanol, 2 ml Phosphatpuffer (pH 7,9)	
Probenaufgabe	0,75 ml Probe + 4,25 ml Phosphatpuffer (pH 7,9)	Verdünnung der Probe in der Spritze (Faktor wie links)
Waschen	2 ml Wasser, 2 ml Essigsäure (0,15 M), 2 ml Methanol	
Trocknen	Kartusche mit Stickstoff trocknen	
Elution	2 ml Dichlormethan/Isopropanol/25 % Ammoniak 40/10/1	1,9 ml Dichlormethan/Isopropanol/25% Ammoniak 40/10/1
Eindampfen	Manuell 60°C unter Stickstoff	mVAP (GERSTEL), 70°C, 300 rpm, 8 kPa
Derivatisierung	200 µl Isooctan/MSTFA 19/1, 30 min, 90 °C	200 µl Isooctan/Pyridin/MSTFA 14/5/1, 5 min, 90 °C
Injektion	2 µl heißer Split/Splitlos Injektor (Agilent Technologies)	1,5 µl KaltAufgabeSystem (GERSTEL)

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind Abbildung 1 zu entnehmen. Abkürzungen: LOD: Nachweis-, LOQ: Bestimmungs-, ULOC: Obergrenze der Kalibration; VAL: Teilautomatisierte, validierte Methode; MPS: Vollautomatisierte Methode; Mean: Bias (systematischer Fehler); SD: Standardabweichung; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter bei flüssigem Probenmaterial bzw. Nanogramm pro Gramm bei Gewebeproben; Other: Andere Probenmaterialien als Serum – Urin, Blut (Vollblut / Herzblut), Nierengewebe oder Hirngewebe (Gewebe nativ oder lyophilisiert). In den Line-Plots (linke Diagramme) wurde zur Orientierung eine Gerade mit der Steigung „1“ eingezeichnet. Im unteren Teil (gestrichelte Linie) ist der Bereich zwischen

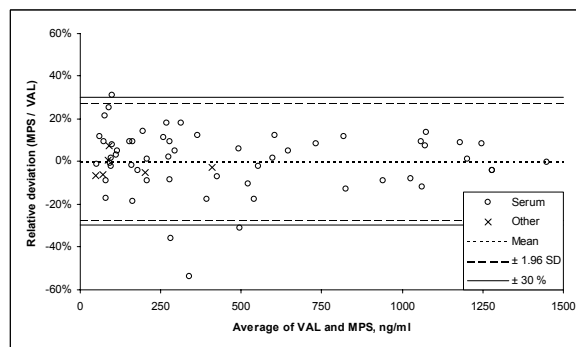
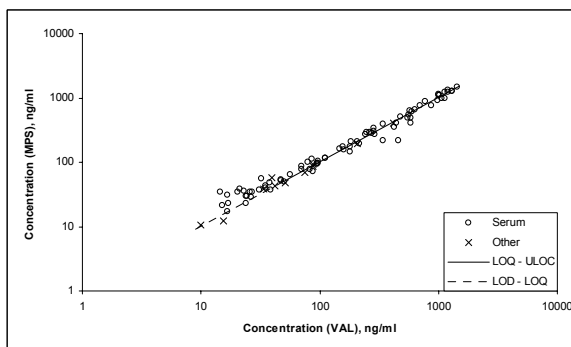
Nachweis- und Bestimmungsgrenze, im oberen Teil (durchgezogene Linie) der Bereich zwischen Bestimmungsgrenze und Obergrenze der Kalibration dargestellt.



Line-Plot (Steigung 0,96; R 0,9947)

Cocain

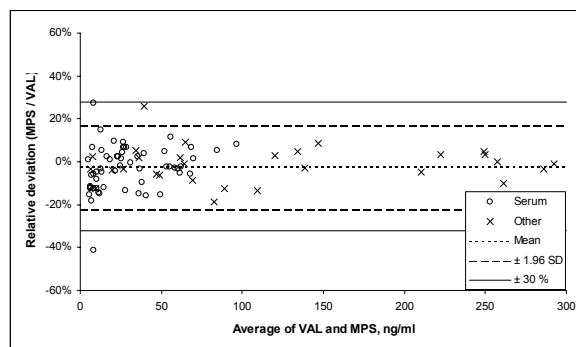
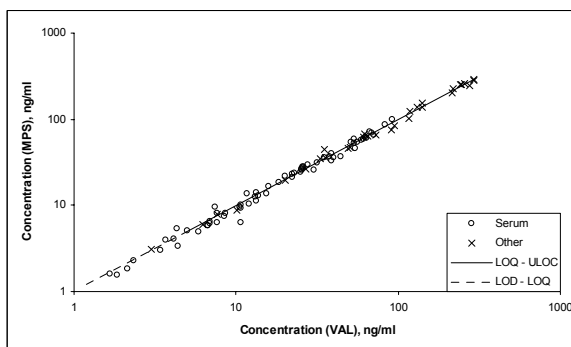
Bland-Altman-Plot (Bias -3,6 %; Präz. ±19,8 %)



Line-Plot (Steigung 0,99; R 0,9800)

Benzoyllecgonin

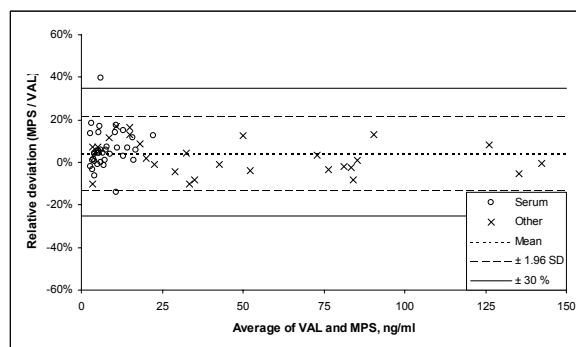
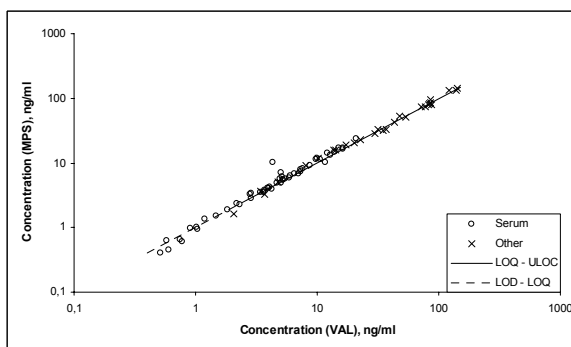
Bland-Altman-Plot (Bias +0,2 %; Präz. ±27,5 %)



Line-Plot (Steigung 0,99; R 0,9942)

Morphin

Bland-Altman-Plot (Bias -2,3 %; Präz. ±19,4 %)



Line-Plot (Steigung 1,00; R 0,9934)

Codein

Bland-Altman-Plot (Bias +4,5 %; Präz. ±17,2 %)

Abb. 1. Übereinstimmung der Messdaten in beiden Systemen (Legende zu den Abbildungen auf der nächsten Seite).

In den Bland-Altman-Plots (rechte Diagramme) wurde das $\pm 30\%$ Intervall (durchgezogene Linien) und das 95% β -Toleranzintervall (gestrichelte Linien) um den systematischen Fehler herum zur Orientierung eingezeichnet. Die Kenngrößen der linearen Regression wurden im Bereich LOD – ULOC, von Bias und Präzision im Bereich LOQ – ULOC ermittelt.

Die Diagramme für 6-Monoacetylmorphin und Methadon sind hier nicht dargestellt. Da nur wenige Proben positiv auf Dihydrocodein und 7-Aminoflunitrazepam waren, wurde ein Vergleich dieser Ergebnisse nicht durchgeführt. Die neben den authentischen Proben aufgearbeiteten Kontrollproben zeigen jedoch auch für diese Analyten eine ausreichende Richtigkeit und Präzision. Die Ergebnisse beider Methoden sind innerhalb eines Toleranzbereichs von $\pm 30\%$ gleichwertig.

4. Schlussfolgerung

Die neue Methode hat sich bewährt. Vorteilhaft ist, dass durch die Automatisierung von Extraktion, Derivatisierung und GC/MS-Analyse die Effektivität eines forensisch-toxikologischen Labors gesteigert werden kann.