

A quantificação do futuro com LC-MS/MS: triagem e quantificação rápidas de drogas de abuso em urina para toxicologia forense

Autores

Kevin McHale, Kerry Hassell,
Thermo Fisher Scientific,
Somerset, NJ

Claudia Martins,
Thermo Fisher Scientific,
San Jose, CA

Debadeep Bhattacharyya,
Thermo Fisher Scientific,
Boston, MA

Palavras-chave

Drogas de abuso, quantificação sensível, MS de triplo quadrupolo, UHPLC, separação de isômeros, separação de analitos

Objetivo

Desenvolver e implementar um fluxo de trabalho robusto, confiável, reproduzível e sensível para a análise e a quantificação de diversas drogas de abuso em urina usando cromatografia líquida-espectrometria de massas em tandem

Benefícios da aplicação

- Linearidade, resolução cromatográfica e sensibilidade para 53 drogas de abuso em urina
- Fluxo de trabalho fácil de implementar que aborda todos os objetivos de alta produtividade/volume de processamento com a tecnologia LC-MS/MS

Introdução

Um dos maiores desafios para os laboratórios de análise que monitoram drogas de abuso em matrizes biológicas é analisar centenas de amostras todos os dias e, ao mesmo tempo, responder ao importante desafio de detectar todas as tentativas que são feitas para contornar as leis de substâncias controladas, assim como identificar e quantificar novos compostos que estão surgindo no mercado. Além disso, as demandas típicas de redução de custo/amostra, desenvolvimento de métodos robustos, confiáveis e sensíveis para todos os tipos de moléculas e obtenção da sensibilidade e robustez desejadas continuam a representar desafios adicionais para todos os laboratórios analíticos envolvidos no desenvolvimento de métodos de quantificação. Os métodos analíticos focados na triagem e análise não direcionada de drogas de abuso são normalmente abordados com a espectrometria de massas de alta resolução e exatidão (HRAM).^{1,2}

Nos últimos anos, várias tecnologias de quantificação foram desenvolvidas e usadas para quantificar drogas de abuso em matrizes biológicas (tais como urina, plasma, fluidos orais etc.).³ Entre um conjunto de tecnologias disponíveis, a cromatografia líquida (LC) associada à espectrometria de massas (MS) ganhou uma grande popularidade devido à sua maior seletividade, especificidade, robustez e sensibilidade.^{4,5} Neste relatório, investigamos a viabilidade de medições de alto volume de processamento de 53 drogas de abuso e metabólitos em toxicologia forense por meio da redução das demoradas etapas de preparação de amostras e do uso de análises de UHPLC-MS/MS de dois minutos por amostra.

Experimental

Preparação de amostras

Todos os padrões foram obtidos da Cerilliant (Round Rock, TX) e foram usados assim que recebidos. A urina em branco foi obtida de um voluntário masculino saudável. Após centrifugar a urina a 10.000 rpm durante 10 min, o sobrenadante de urina foi misturado com drogas de abuso e metabólitos em concentrações equivalentes a 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5 e 10 vezes as concentrações de corte. As amostras de urina preparadas foram diluídas com um volume igual de uma solução mãe de padrões marcados isotopicamente em metanol a 20% antes das análises de LC-MS/MS.

Cromatografia líquida

Foi injetada uma amostra de 2 µL em uma coluna Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ aQ de 2,1 × 50 mm, 1,9 µm termostaticada a 40 °C. A separação dos compostos foi realizada com o sistema de UHPLC Thermo Scientific™ Vanquish™ Horizon usando um gradiente binário de fase reversa, conforme mostrado na Tabela 1. As fases móveis foram (A) água e (B) acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A taxa de fluxo de LC foi mantida a 1,0 mL/min sem divisão pós-coluna. O efluente de LC era desviado para os resíduos até depois do vazio da coluna para evitar que os sais incrustassem a fonte de íons.

Tabela 1. Informação do gradiente de LC para uma taxa de fluxo de 1 mL/min

Tempo (min)	%B
0,0	0
0,4	22,5
1,0	80
1,29	80
1,3	0
1,4	0
2,1	0

Espectrometria de massas

Para esta análise, foi usado um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo Thermo Scientific™ TSQ Quantis™⁶. Todos os compostos deste estudo foram analisados no modo de íons positivos. Foi monitorado um total de 210 transições de SRM usando um tempo de ciclo de 0,15 s, com a maioria das janelas de tempo de SRM definidas para uma amplitude de 0,1 min (6 s).

Software

A aquisição, o processamento e a revisão dos dados foram efetuados usando o software Thermo Scientific™ TraceFinder™ 4.1.

Resultados e discussão

Conforme mostrado na Tabela 2, foram analisados e quantificados mais de 75 drogas de abuso e os seus metabólitos com um método de LC-MS/MS com um tempo de aquisição inferior a 1,4 min. A lista abrangente de drogas de abuso exclui os glicuronídeos e também inclui alguns antidepressivos comumente usados. Embora o método garanta uma alta produtividade e responda ao desafio crítico de atingir os objetivos de volume de processamento da maioria dos laboratórios analíticos dedicados à análise e à quantificação de drogas de abuso em matrizes biológicas, os dados obtidos podem ser complexos, principalmente do ponto de vista da análise e revisão. Existem várias sobreposições entre os tempos de eluição de diferentes análises, o que torna a separação entre isômeros e também a separação entre analitos um desafio. Contudo, a seletividade e a velocidade adicionais oferecidas pelo instrumento TSQ Quantis permitiram abordar tais desafios neste estudo.

Tabela 2 (parte 1). Lista de drogas de abuso identificadas e quantificadas no modo de electrospray positivo

Composto	Retenção Tempo (min)	Janela RT (min)	Precursor (m/z)	Produto (m/z)	Colisão Energia (V)	Lente RF (V)
Nicotina_D4	0,275	0,3	167,15	134,09	22	101
Nicotina*	0,275	0,3	163,12	130,07	22	101
Nicotina*	0,275	0,3	163,12	132,08	16	101
Cotinina_D3	0,325	0,3	180,12	80,05	24	128
Cotinina*	0,325	0,3	177,1	80,05	24	128
Cotinina*	0,325	0,3	177,1	98,06	21	128
Morfina_D6	0,473	0,12	292,18	165,07	39	214
Oximorfona*	0,497	0,12	302,14	198,09	46	177
Oximorfona*	0,497	0,12	302,14	227,1	29	177
Oximorfona_D3	0,497	0,12	305,16	230,11	29	177
Hidromorfona_D6	0,526	0,1	292,18	185,06	31	218
Mor_HMor_NorCod_NorHC*	0,575	0,32	286,14	128,06	57	186
Mor_HMor_NorCod_NorHC*	0,575	0,32	286,14	152,06	59	186
Mor_HMor_NorCod_NorHC*	0,575	0,32	286,14	157,07	42	186
Mor_HMor_NorCod_NorHC*	0,575	0,32	286,14	165,07	40	186
Mor_HMor_NorCod_NorHC*	0,575	0,32	286,14	185,06	31	186
Mor_HMor_NorCod_NorHC*	0,575	0,32	286,14	199,08	29	186
Naloxona_D5	0,601	0,1	333,18	212,07	38	179
Pregabalina*	0,603	0,1	160,13	55,05	22	83
Pregabalina*	0,603	0,1	160,13	97,1	16	83
Gabapentina*	0,604	0,1	172,13	95,09	23	96
Gabapentina*	0,604	0,1	172,13	137,1	16	96
Gabapentina_D10	0,604	0,1	182,19	147,16	16	96
Codeína*	0,61	0,1	300,16	152,06	61	219
Codeína*	0,61	0,1	300,16	165,07	41	219
Codeína_D3	0,61	0,1	303,18	165,07	41	219
DiHCod_NorOC*	0,62	0,14	302,14	128,06	61	152
DiHCod_NorOC*	0,62	0,14	302,14	187,08	25	152
DiHCod_NorOC*	0,62	0,14	302,14	199,08	33	152
DiHCod_NorOC*	0,62	0,14	302,14	227,1	29	152
D3-Metilona	0,627	0,1	211,12	163,1	18	93
Metilona*	0,627	0,1	208,1	132,04	27	93
Metilona*	0,627	0,1	208,1	160,08	18	93
Naloxona_6-MAM*	0,627	0,16	328,15	165,07	38	179
Naloxona_6-MAM*	0,627	0,16	328,15	211,08	26	179
Naloxona_6-MAM*	0,627	0,16	328,15	212,07	38	179
Naloxona_6-MAM*	0,627	0,16	328,15	253,11	27	179
Anfetamina*	0,631	0,1	136,11	91,05	18	53
Anfetamina*	0,631	0,1	136,11	119,09	10	53
Anfetamina_D5	0,631	0,1	141,14	93,07	18	53
Oxicodona_D3	0,651	0,1	319,17	244,13	29	167
Oxicodona*	0,651	0,1	316,15	241,11	29	167
Oxicodona*	0,651	0,1	316,15	256,11	26	167

*Isômeros com a mesma m/z

Tabela 2 (parte 2). Lista de drogas de abuso identificadas e quantificadas no modo de electrospray positivo

Composto	Retenção Tempo (min)	Janela RT (min)	Precursor (m/z)	Produto (m/z)	Colisão Energia (V)	Lente RF (V)
6-MAM_D3	0,655	0,1	331,17	211,08	26	184
MDA*	0,655	0,1	180,1	133,06	18	62
MDA*	0,655	0,1	180,1	135,04	19	62
MDA_D5	0,655	0,1	185,13	140,07	19	62
O-desmetiltramadol*	0,662	0,1	250,18	42,05	65	95
O-desmetiltramadol*	0,662	0,1	250,18	58,05	17	95
O-desmetiltramadol_13C	0,662	0,1	251,19	58,05	17	95
O-desmetiltramadol_D6	0,662	0,1	256,22	64,1	17	90
Hidrocodona_D3	0,667	0,1	303,19	202,1	30	227
Hidrocodona*	0,667	0,1	300,16	128,06	59	227
Hidrocodona*	0,667	0,1	300,16	199,08	30	227
Metanfetamina_D5	0,673	0,1	155,16	92,06	20	55
MDMA*	0,682	0,1	194,12	105,07	25	82
MDMA*	0,682	0,1	194,12	163,08	13	82
MDMA_D5	0,682	0,1	199,15	107,08	25	82
7-hidroxiquetiapina*	0,687	0,1	400,17	208,03	44	217
7-hidroxiquetiapina*	0,687	0,1	400,17	269,07	22	217
MetanfetaminaAMP_Fentermina*	0,695	0,14	150,13	65,04	39	55
MetanfetaminaAMP_Fentermina*	0,695	0,14	150,13	91,05	20	55
MetanfetaminaAMP_Fentermina*	0,695	0,14	150,13	105,07	19	55
MetanfetaminaAMP_Fentermina*	0,695	0,14	150,13	119,09	12	55
Fentermina_D5	0,701	0,1	155,16	96,08	20	55
7-aminoclonazepam*	0,713	0,08	286,07	222,1	25	165
7-aminoclonazepam*	0,713	0,08	286,07	250,1	20	165
7-aminoclonazepam_D4	0,713	0,08	290,1	226,13	25	165
Benzoilecgonina*	0,72	0,1	290,14	105,03	31	152
Benzoilecgonina*	0,72	0,1	290,14	168,1	20	152
Benzoilecgonina_D3	0,72	0,1	293,16	171,12	20	152
MDEA*	0,731	0,1	208,13	77,05	42	84
MDEA*	0,731	0,1	208,13	135,04	24	84
MDEA_D5	0,731	0,1	213,16	135,04	24	84
Metilfenidato_D9	0,737	0,1	243,2	93,13	20	95
Norfentanil*	0,75	0,1	233,16	56,05	26	124
Norfentanil*	0,75	0,1	233,16	84,08	18	124
Norfentanil_D5	0,75	0,1	238,2	84,08	18	124
D3-Dextrorfano	0,776	0,1	261,21	157,07	36	148
Dextrorfano*	0,776	0,1	258,19	157,07	36	148
Dextrorfano*	0,776	0,1	258,19	199,11	25	148
Zopiclona*	0,777	0,1	389,11	217,03	33	114
Zopiclona*	0,777	0,1	389,11	245,02	17	114
Zopiclona_D4	0,777	0,1	393,14	245,02	17	114

*Isômeros com a mesma m/z

Tabela 2 (parte 3). Lista de drogas de abuso identificadas e quantificadas no modo de electrospray positivo

Composto	Retenção Tempo (min)	Janela RT (min)	Precursor (m/z)	Produto (m/z)	Colisão Energia (V)	Lente RF (V)
Tramadol*	0,797	0,1	264,2	42,05	65	80
Tramadol*	0,797	0,1	264,2	58,05	16	80
Tramadol_13C	0,797	0,1	265,21	58,05	16	80
Tramadol-13C-D3	0,797	0,1	268,23	58,05	16	80
Metilfenidato_Normeperidina*	0,8	0,2	234,15	56,05	46	95
Metilfenidato_Normeperidina*	0,8	0,2	234,15	84,08	20	95
Metilfenidato_Normeperidina*	0,8	0,2	234,15	91,05	45	95
Metilfenidato_Normeperidina*	0,8	0,2	234,15	160,11	14	95
Tapentadol*	0,808	0,1	222,19	107,05	24	117
Tapentadol*	0,808	0,1	222,19	121,07	20	117
Tapentadol_D3	0,808	0,1	225,2	107,05	24	117
Meprobamato*	0,831	0,08	219,13	97,1	19	56
Meprobamato*	0,831	0,08	219,13	158,12	10	56
Meprobamato_D7	0,831	0,08	226,18	165,16	10	56
Alfa-PVP*	0,834	0,1	232,17	91,05	22	145
Alfa-PVP*	0,834	0,1	232,17	126,13	24	145
D8-alfa-PVP	0,834	0,1	240,2	91,05	22	145
Normeperidina_D4	0,839	0,1	238,17	164,14	14	95
Cocaína*	0,842	0,1	304,15	82,07	32	151
Cocaína*	0,842	0,1	304,15	182,12	20	151
D8-MDPV	0,85	0,12	284,2	134,17	27	130
MDPV*	0,85	0,12	276,16	126,13	27	130
MDPV*	0,85	0,12	276,16	135,05	25	130
9-hidroxi-risperidona*	0,851	0,12	427,214	207,113	27	195
9-hidroxi-risperidona*	0,851	0,12	427,214	110,06	42	195
Meperidina*	0,855	0,1	248,16	174,13	20	129
Meperidina*	0,855	0,1	248,16	220,13	23	129
Meperidina_D4	0,855	0,1	252,19	224,16	23	129
Zolpidem*	0,855	0,1	308,18	235,12	34	219
Zolpidem*	0,855	0,1	308,18	263,12	26	219
Zolpidem_D7	0,855	0,1	315,22	242,16	34	219
Norbuprenorfina*	0,862	0,1	414,26	165,07	65	225
Norbuprenorfina*	0,862	0,1	414,26	187,08	38	225
Norbuprenorfina_D3	0,862	0,1	417,28	187,08	38	225
Cocaetileno*	0,91	0,1	318,17	82,07	32	157
Cocaetileno*	0,91	0,1	318,17	196,13	21	157
Cocaetileno_D3	0,91	0,1	321,19	199,15	21	157
PCP*	0,941	0,12	244,21	86,1	10	65
PCP*	0,941	0,12	244,21	91,05	27	65
PCP_D5	0,941	0,12	249,24	86,1	10	65
Zaleplon*	0,945	0,1	306,135	236,093	25	160
Zaleplon*	0,945	0,1	306,135	264,124	20	160

*Isômeros com a mesma m/z

Tabela 2 (parte 4). Lista de drogas de abuso identificadas e quantificadas no modo de electrospray positivo

Composto	Retenção Tempo (min)	Janela RT (min)	Precursor (m/z)	Produto (m/z)	Colisão Energia (V)	Lente RF (V)
alfa_OH-Alprazolam*	0,955	0,1	325,09	216,08	39	244
alfa_OH-Alprazolam*	0,955	0,1	325,09	297,07	26	244
alfa_OH-Alprazolam_D5	0,955	0,1	330,12	302,1	26	244
Fentanil*	0,958	0,12	337,23	105,07	38	182
Fentanil*	0,958	0,12	337,23	188,14	23	182
Fentanil_D5	0,958	0,12	342,26	188,14	23	182
Oxazepam*	0,975	0,08	287,06	104,05	36	187
Oxazepam*	0,975	0,08	287,06	241,05	24	187
Oxazepam_D5	0,975	0,08	292,09	246,08	24	187
Desalquilflurazepam*	0,977	0,08	289,05	140,03	31	218
Desalquilflurazepam*	0,977	0,08	289,05	226,09	29	218
Citalopram*	0,977	0,12	325,17	109,05	26	162
Citalopram*	0,977	0,12	325,17	262,1	19	162
Citalopram-D6	0,977	0,12	331,22	109,05	26	162
D3-Doxepina	0,978	0,12	283,19	107,05	22	136
Doxepina*	0,978	0,12	280,17	107,05	22	136
Doxepina*	0,978	0,12	280,17	235,11	16	136
Buprenorfina*	0,982	0,1	468,31	396,21	40	234
Buprenorfina*	0,982	0,1	468,31	414,26	34	234
Buprenorfina_D4	0,982	0,1	472,34	400,22	40	234
CarisoprodoI*	0,988	0,08	261,18	97,1	18	73
CarisoprodoI*	0,988	0,08	261,18	176,13	9	73
CarisoprodoI_D7	0,988	0,08	268,22	183,17	9	73
Lorazepam*	0,989	0,08	321,02	229,05	32	185
Lorazepam*	0,989	0,08	321,02	275,01	22	185
Lorazepam_37Cl	0,989	0,08	323,02	277	22	185
Mitraginina*	1,002	0,12	399,23	174,1	29	185
Mitraginina*	1,002	0,12	399,23	226,14	22	185
Alprazolam*	1,01	0,08	309,09	205,08	42	225
Alprazolam*	1,01	0,08	309,09	281,07	27	225
Alprazolam_D5	1,01	0,08	314,12	286,1	27	225
Nordiazepam*	1,011	0,08	271,06	140,03	28	148
Nordiazepam*	1,011	0,08	271,06	208,1	28	148
Nordiazepam_D5	1,011	0,08	276,09	140,03	28	148
D3-Desipramina	1,028	0,12	270,2	75,1	15	121
Desipramina*	1,028	0,12	267,19	72,08	15	121
Desipramina*	1,028	0,12	267,19	193,09	37	121
EDDP*	1,029	0,15	278,19	234,13	30	160
EDDP*	1,029	0,15	278,19	249,15	21	160
EDDP_D3	1,029	0,15	281,21	234,13	30	160
D3-Imipramina	1,032	0,12	284,22	89,11	17	136
Imipramina*	1,032	0,12	281,2	58,07	34	136
Imipramina*	1,032	0,12	281,2	86,1	17	136

*Isômeros com a mesma m/z

Tabela 2 (parte 5). Lista de drogas de abuso identificadas e quantificadas no modo de electrospray positivo

Composto	Retenção Tempo (min)	Janela RT (min)	Precursor (m/z)	Produto (m/z)	Colisão Energia (V)	Lente RF (V)
Temazepam*	1,037	0,08	301,07	177,02	39	174
Temazepam*	1,037	0,08	301,07	255,07	23	174
Temazepam_D5	1,037	0,08	306,11	260,1	23	174
Aripiprazol*	1,045	0,12	448,155	285,092	26	243
Aripiprazol*	1,045	0,12	448,155	176,071	31	243
Duloxetina*	1,045	0,12	298,13	44,05	12	80
Duloxetina*	1,045	0,12	298,13	154,07	7	80
Duloxetina-D3	1,045	0,12	301,15	47,07	12	80
Ciclobenzaprina*	1,05	0,15	276,17	58,07	21	133
Ciclobenzaprina*	1,05	0,15	276,17	215,09	40	133
D3-Ciclobenzaprina	1,05	0,15	279,19	215,09	40	133
Norpropoxifeno*	1,055	0,12	326,21	44,05	12	84
Norpropoxifeno*	1,055	0,12	326,21	252,17	8	84
Norpropoxifeno_D5	1,055	0,12	331,24	252,17	8	84
D3-Nortriptilina	1,069	0,12	267,2	233,13	15	128
Nortriptilina*	1,069	0,12	264,17	91,05	23	128
Nortriptilina*	1,069	0,12	264,17	233,13	15	128
Amitriptilina*	1,071	0,12	278,19	91,05	26	161
Amitriptilina*	1,071	0,12	278,19	233,13	18	161
D3-Amitriptilina	1,071	0,12	281,21	233,13	18	161
Propoxifeno*	1,077	0,12	340,23	58,07	15	96
Propoxifeno*	1,077	0,12	340,23	266,19	9	96
Propoxifeno_D5	1,077	0,12	345,26	266,19	9	96
Metadona*	1,085	0,14	310,22	105,03	32	105
Metadona*	1,085	0,14	310,22	265,16	15	105
Metadona_D3	1,085	0,14	313,24	268,18	15	105
Diazepam*	1,093	0,08	285,08	154,04	28	218
Diazepam*	1,093	0,08	285,08	193,09	32	218
Diazepam_D5	1,093	0,08	290,11	198,12	32	218
JWH-073 N-(4-hidroxiutil)*	1,144	0,08	344,165	155,049	23	168
JWH-073 N-(4-hidroxiutil)*	1,144	0,08	344,165	127,054	43	168
JWH-018 N-(5-hidroxiutil)*	1,151	0,08	358,18	155,049	22	180
JWH-018 N-(5-hidroxiutil)*	1,151	0,08	358,18	127,054	46	180
JWH-018 N-(5-hidroxiutil)_D5	1,151	0,08	363,21	155,049	22	180
JWH-122 N-(5-hidroxiutil)*	1,192	0,08	372,2	115,054	58	185
JWH-122 N-(5-hidroxiutil)*	1,192	0,08	372,2	169,065	22	185
UR-144 N-(5-hidroxiutil)*	1,209	0,08	328,25	97,1	26	150
UR-144 N-(5-hidroxiutil)*	1,209	0,08	328,25	125,096	17	150
THC-COOH_D3_Pos	1,265	0,08	348,22	302,2	20	154
THC-COOH_pos*	1,265	0,08	345,21	193,12	26	154
THC-COOH_pos*	1,265	0,08	345,21	299,2	20	154

*Isômeros com a mesma m/z

Separação de isômeros

O desenvolvimento de métodos de LC-MS/MS com tempos de execução curtos para assegurar uma alta produtividade requer uma bomba UHPLC eficiente, uma coluna de LC robusta e um MS de triplo quadrupolo que possa funcionar a velocidades de análise muito elevadas com uma reprodutibilidade notável. A 1 mL/min com uma coluna de partículas de 1,9 µm, as amplitudes de pico de LC observadas eram, no geral, cerca de ~1,3 s na base (Figura 1). A taxa de fluxo de LC não tem divisão em relação à fonte HESI TSQ Quantis.

Os isômeros de opiáceos têm a mesma m/z do precursor e muitos geram os mesmos íons de produto. Logo, é necessário separar cromatograficamente estes compostos. Quatro isômeros de opiáceos que têm um peso molecular de 286 são separados facilmente por UHPLC a 1 mL/min, e o instrumento TSQ Quantis tem velocidade de aquisição suficiente para quantificar de forma exata esses compostos (Figura 2). Foram necessários vários SRMs para alguns analitos, principalmente para aqueles com isômeros, para assegurar uma separação ideal dentro do tempo de execução necessário.

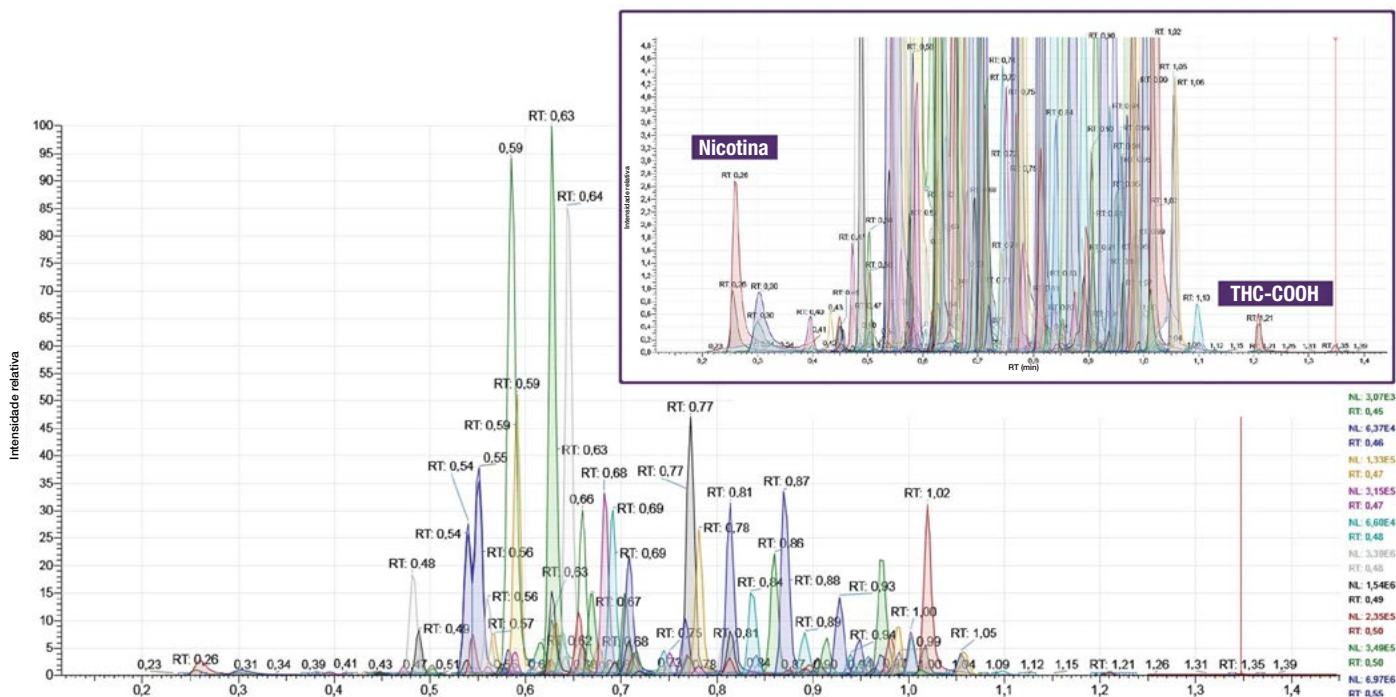


Figura 1. Cromatogramas de SRM de 53 drogas de abuso em menos de 1,4 minutos (THC-COOH elui a 1,21 min, gráfico interno)

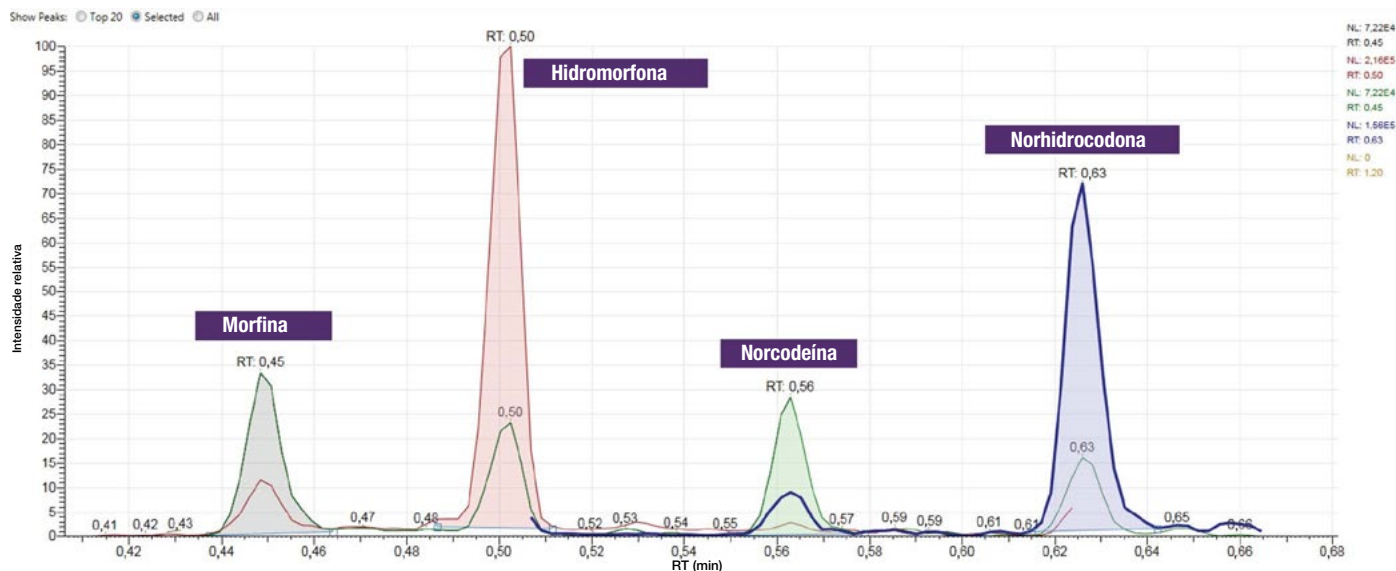


Figura 2. Isômeros de opiáceos a m/z 286 se separam bem em menos de 12 s (pico de LC habitual = 1,3 s de amplitude)

Separação de analitos

A otimização de parâmetros de MS foi crucial para garantir dados de quantificação de alta qualidade para cada analito na amostra dentro do curto tempo de execução. Definir o tempo de ciclo de SRM para 0,15 s permitiu 8–10 pontos de aquisição sob cada pico de LC, conforme pode ser visto na eluição de 6-Monoacetilmorfina (6-MAM) (Figura 3). Com base em relatórios publicados anteriormente,⁷ nove pontos medidos sob um pico Gaussiano integrado com 0,1% de abundância relativa irão gerar erros de medição de menos de 3%. O tempo de aquisição e a eficiência de detecção do instrumento TSQ Quantis são cruciais em tais situações, especialmente para picos de LC estreitos (conforme indicado no caso de 6-MAM [Figura 3]).

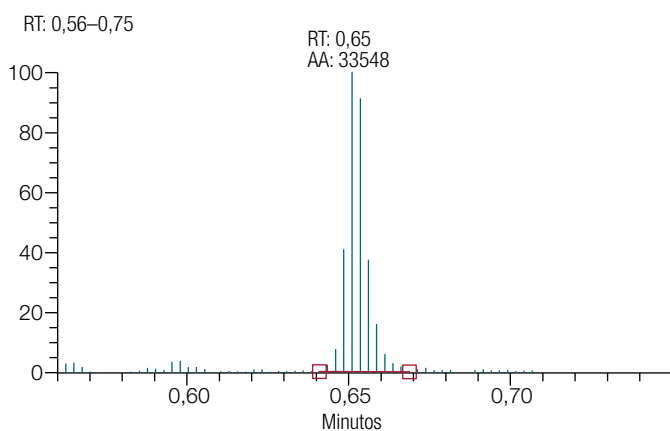


Figura 3. Pontos de aquisição de SRM sob pico de LC – 6-MAM a 10 ng/mL

Conforme a Figura 4 destaca, a eluição de 6-MAM e de buprenorfina ocorre quando existem mais transições de SRM, logo, com os menores ciclos de trabalho e tempos de espera. Com um método de UHPLC rápido, os analitos, como 6-MAM e buprenorfina, eluem com muitos outros compostos. O número crescente de transições de SRM com tempos de espera de SRM baixos permite uma maior produtividade. O tempo de aquisição e a eficiência de detecção do TSQ Quantis MS são cruciais em tais situações, especialmente para picos de LC estreitos (conforme indicado no caso de 6-MAM [Figura 3]).

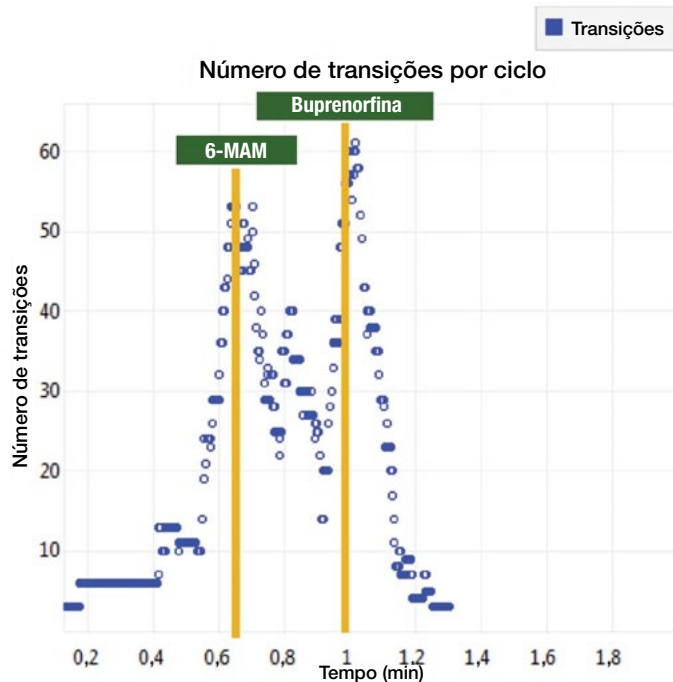


Figura 4. Tempos de retenção de 6-MAM e buprenorfina habilitada pelo número crescente de transições de SRM oferecidas pelo instrumento TSQ Quantis com curtos tempos de espera

Com um método de UHPLC rápido, 6-MAM e buprenorfina eluem com muitos outros compostos, o que requer a flexibilidade de um dwell time curto. A Figura 5 indica que nos tempos de eluição para 6-MAM e buprenorfina os tempos de espera mínimos encontravam-se em 1,62 e 0,82 ms, respectivamente. Além disso, os tempos de retenção de LC foram notavelmente consistentes com pouquíssima variação (menos de 0,005 min = 0,3 s) ao longo do intervalo de injeções realizadas, destacando o desempenho do sistema de UHPLC Vanquish Horizon. Esta consistência do tempo de retenção possibilitou estreitas janelas de tempo de SRM de 0,1 min (6 s) para a maioria dos compostos a fim de maximizar a eficiência de detecção sem comprometer as medições de pico de LC.

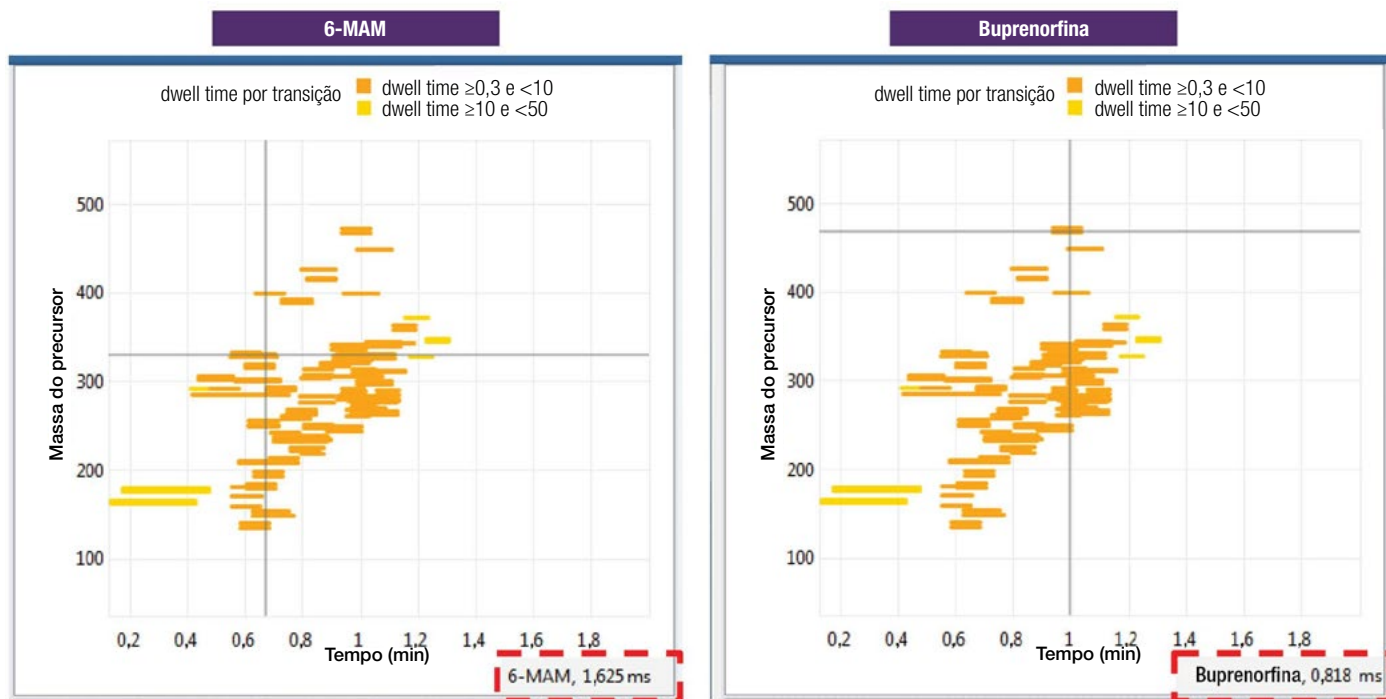


Figura 5. Mapa da massa do precursor ao longo do tempo (minutos) mostrando eluição de 6-MAM (esquerda) e buprenorfina (direita) de 1,62 e 0,82 ms, respectivamente

Sensibilidade

Um dos maiores objetivos para efetuar análise de quantificação com triplos quadrupolos é atingir uma sensibilidade elevada. Embora o instrumento TSQ Quantis seja um MS de triplo quadrupolo de gama média, e apesar da complexidade da matriz (urina, neste estudo) e das complicações da sobreposição de analitos no curto tempo de execução do método, as demandas de sensibilidade de todos os analitos foram abordadas com notável facilidade. Por exemplo, vários perfis de injeção de buprenorfina (Figura 6) e 6-MAM (Figura 7) são mostrados abaixo. Os dados de robustez sobre cinco injeções foram obtidos com diluição 1:2 da amostra de urina com injeções de 2 μ L.

Para a quantificação com base em LC-MS/MS, a buprenorfina pode representar alguns desafios como um opioide sintético devido à sua fraca eficiência de fragmentação. Mesmo com este método rápido

de UHPLC e o fato de a buprenorfina eluir com muitos outros compostos, o instrumento TSQ Quantis oferece velocidade, sensibilidade e seletividade suficientes para quantificar buprenorfina a 5 ng/mL em urina diluída 1:2 com %CV de ~17% (Figura 6). Estes dados foram obtidos com 60 transições de SRM simultâneas com 0,15 s de tempo de ciclo de SRM (Figura 4).

O 6-MAM é o metabólito principal da heroína, tornando-o um marcador de heroína. De forma semelhante à buprenorfina, o 6-MAM elui com muitos outros analitos e, conseqüentemente, precisa de um curto dwell time (Figuras 4 e 5). A alta velocidade, a sensibilidade e a seletividade oferecidas pelo instrumento TSQ Quantis permitem uma quantificação robusta, reproduzível e sensível do 6-MAM a 10 ng/mL em urina diluída 1:2 (Figura 7). O valor de %CV correspondeu a 8,5% com 50 transições de SRM simultâneas com 0,15 s de tempo de ciclo de SRM.

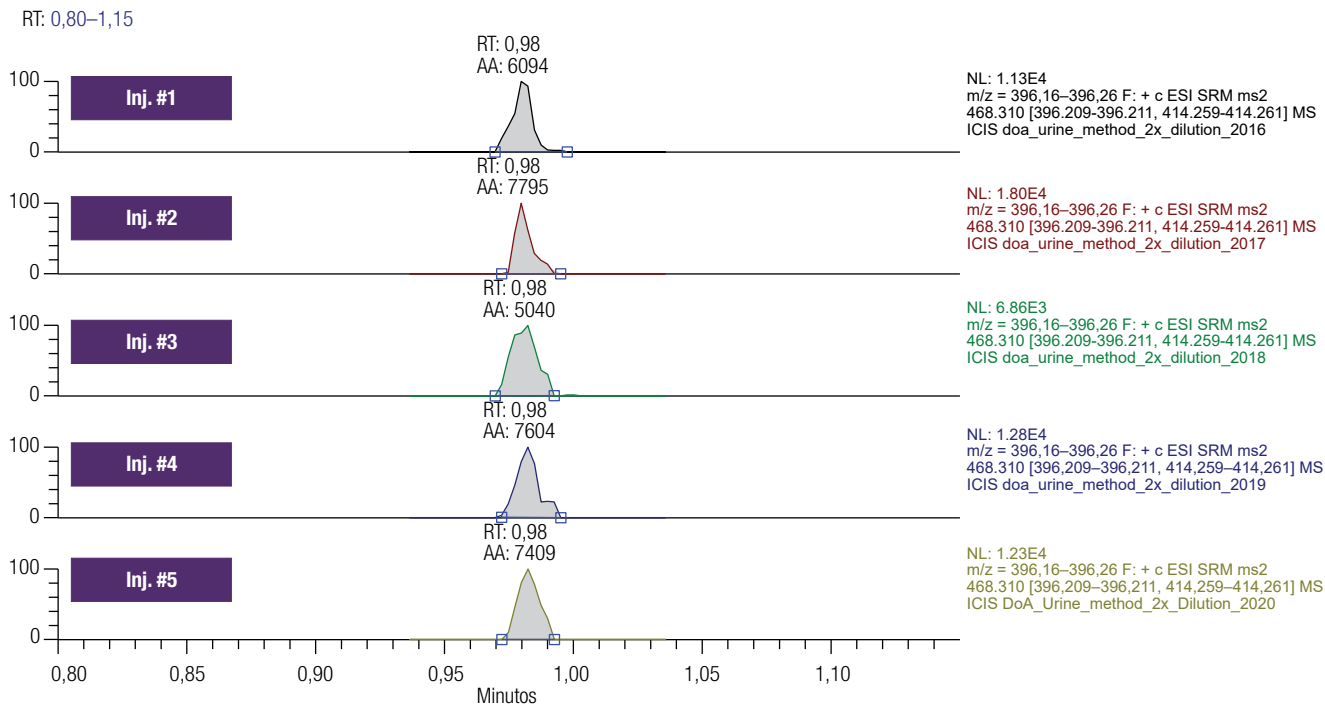


Figura 6. Reprodutibilidade da buprenorfina a 5 ng/mL com dwell time de 0,82 ms

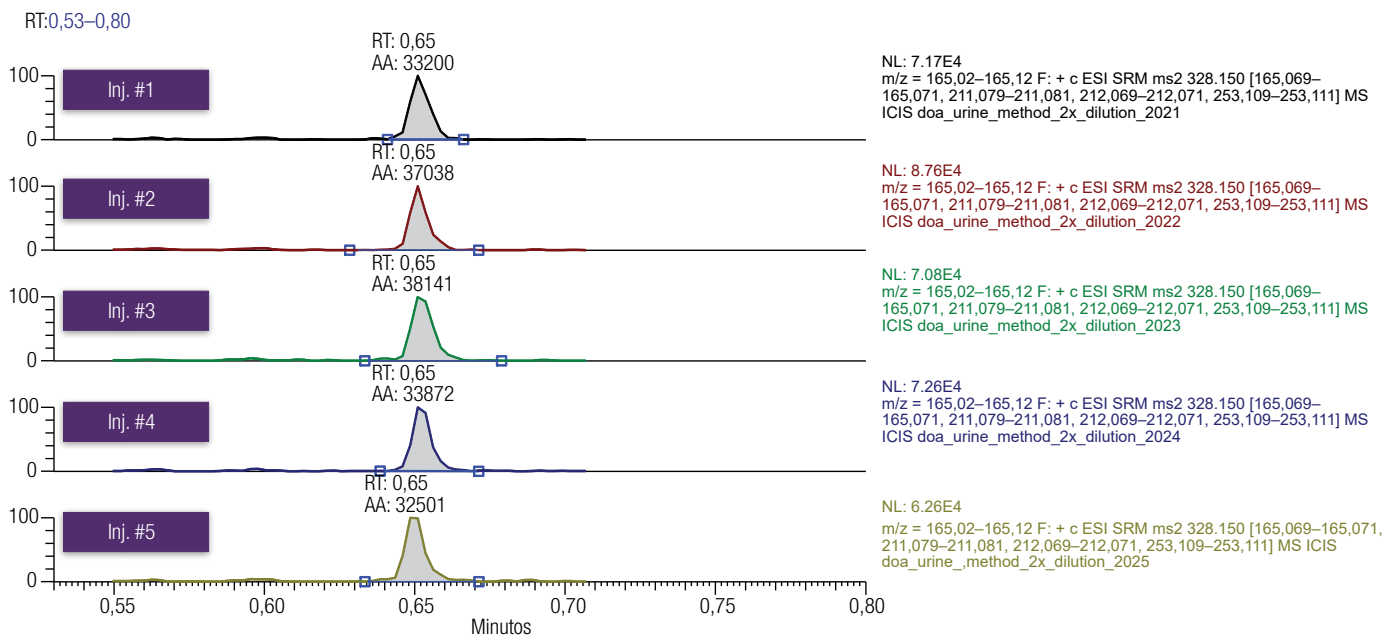


Figura 7. Reprodutibilidade de 6-MAM a 10 ng/mL com dwell time de 1,63 ms

Conclusão

A análise e a quantificação de drogas de abuso em matrizes biológicas podem representar vários desafios, principalmente com as crescentes exigências do aumento do rendimento e da alta sensibilidade. A LC-MS/MS com cromatografia líquida e espectrometria de massa triplo quadrupolo oferece várias vantagens na realização de uma quantificação de drogas de abuso robusta, reproduzível, rápida e sensível sobre diversas matrizes biológicas, especialmente a urina. Neste estudo, demonstramos o desempenho cromatográfico altamente reproduzível do sistema de UHPLC Vanquish Horizon com a excelente velocidade e sensibilidade do espectrômetro de massa TSQ Quantis para realizar uma quantificação de confiança de várias drogas de abuso e metabólitos em urina diluída para amostras de toxicologia forense em ~2 minutos por amostra.

O desenvolvimento diligente de métodos de LC permitiu a separação da linha de base da maioria dos compostos isoméricos e isobáricos medidos por UHPLC-MS/MS em menos de 1,4 minutos. A maioria dos compostos alvo tinham LLOQs nos níveis de corte designados ou abaixo dos mesmos em urina diluída. Os sinais de sobreposição de analitos e isômeros fazem parte das complexidades normalmente observadas para métodos com curtos

tempos de execução. Neste método, a excelente resolução cromatográfica oferecida pelo sistema de UHPLC Vanquish Horizon, e a velocidade e a sensibilidade aumentadas oferecidas pelo espectrômetro de massa triplo quadrupolo TSQ Quantis permitem uma separação ideal e uma eficiência quantitativa para cada isômero alvo (conforme mostrado para isômeros de opiáceos) e também para cada um dos analitos alvo (conforme discutido para 6-MAM e buprenorfina).

Referências

1. Li, X., et al. Rapid screening of drugs of abuse in human urine by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1302, 8.
2. Heuett, N. V., et al. Analysis of drugs of abuse by online SPE-LC high resolution mass spectrometry: Communal assessment of consumption. *Science of The Total Environment* **2015**, 511, 12.
3. DeNardi, C. D., et al. Quantification of drugs of abuse in oral fluid using online TurboFlow™ sample extraction. *MSACL*. Salzberg, Austria, MSACL, **2017**.
4. McHale, K. J. and K. Hassell. Increasing Sample Throughput for Detecting Drugs of Abuse and Metabolites in Urine by UHPLC-MS/MS for Forensic Toxicology. *ASMS*. San Antonio, Thermo Fisher Scientific, **2016**.
5. Van Natta, K. L. and M. Kozak. Evaluation of a method for Forensic Quantitative Screening of over 120 drugs of abuse on a triple quadrupole mass spectrometer. Thermo Scientific Poster Note 64378 <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/posters/PN-64378-LC-MS-TSQ-Endura-Forensic-120-Drugs-MSACL2015-PN64378-EN.pdf> **2017**.
6. <http://www.thermofisher.com/Altis-Quantis> "Confident Quantitation." 2017.
7. Chesler, S. N. and S. P. Cram. Effect of Peak Sensing and Random Noise on the Precision and Accuracy of Statistical Moment Analyses from Digital Chromatographic Data. *Anal. Chem.* 1971, 43, 12.

Apenas para uso forense.

Saiba mais em thermofisher.com