

Development, validation and application of a qualitative LC-QTOF-MS screening method for post-mortem urine samples

Helena Fels*, Torsten Dame, Hans Sachs, Frank Musshoff

Forensisch Toxikologisches Centrum (FTC) München, Bayerstraße 53, D-80335 München

*corresponding author: h.fels@ftc-muenchen.de

Aim: This study shows the development, validation and application of a liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) screening method for the detection of pharmaceutical substances and illicit drugs (acidic, basic and neutral organic drugs) in post-mortem urine samples. **Methods:** After adding a mixture of various internal standards, 100 µL of the urine sample was treated with β-glucuronidase and diluted 1:10 with a buffer solution. Ten µL of the prepared sample was directly injected into the chromatographic system. Time-of-flight mass spectrometry was performed using an LC-Triple TOF 5600 system with electrospray ionization operated in both positive and negative mode, respectively. The identification of the compounds was based on accurate mass (< 5 ppm), retention time (± 2%) if available, isotopic pattern fit (± 10%) and library match (> 70%). These four parameters served as identification criteria. **Results and Discussion:** In routine casework, a target library, consisting of 1253 exact monoisotopic masses (“Weinmann” ESI-MS/MS library) as well as additional in-house compounds, was used. A retention time for 320 compounds was available. The limits of detection (LOD), determined for 34 substances, were < 10 ng/mL for 91% of the compounds. The limits of quantitation (LOQ) were < 20 ng/mL for 91% of the analytes. Compared to the results found with the established gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) procedure, the findings with the LC-QTOF-MS screening method showed a good comparability. The procedure is accredited according to ISO 17025. **Conclusion:** LC-QTOF-MS is an attractive technique for the fast and specific identification of drugs and toxic compounds as well as their metabolites in urine samples with the additional advantage of possible retrospective data analysis. Basic validation and identification criteria are discussed.

1. Einleitung

Screening-Verfahren stellen eine Herausforderung für die forensische Toxikologie dar. Es ist zwischen sogenannten Multi-Target-Screeningverfahren und General-Unknown-Untersuchungen zu differenzieren. Bei einem Multi-Target-Screening handelt es sich um ein gerichtetes Screeningverfahren, bei dem gezielt nach ausgewählten toxikologisch relevanten Substanzen gesucht wird. In diesem Zusammenhang hat die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen [1]. Als General-Unknown-Untersuchungen werden hingegen ungerichtete Analysen bezeichnet, bei denen möglichst alle relevanten Substanzen einbezogen werden. Als Goldstandard für ein derartiges Screeningverfahren hat sich die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) etabliert [2,3]. Dennoch ist auch dieses Verfahren durch Extraktions- und Derivatisierungsverfahren bzw. letztendlich durch den Umfang von Referenzbibliotheken begrenzt. Bietet eventuell die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in Kombination mit hochauflösender Massenspektrometrie eine bessere Alternative?

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung, Validierung und Überprüfung der Anwendung einer LC-QTOF-MS-Screeningmethode für postmortale Urinproben. Hierfür wurde ein Methoden-

vergleich zwischen der bisher verwendeten LC-MS/MS-Methode und der neuen LC-QTOF-MS-Methode erarbeitet. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der GC-MS-Auswertungen mit den Nachweisen, die mittels LC-QTOF-MS erbracht wurden, verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Probenvorbereitung: 100 µL Urin werden mit 10 µL Essigsäureacetat-Puffer auf einen pH-Wert von 5.5 eingestellt. Nach Zugabe von 5 µL des Internen Standard-Mixes (MPPH und 22 deuterierte Substanzen) wird die Urinprobe mit 20 µL β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Merck) versetzt, 120 Minuten bei 55 °C hydrolysiert und anschließend 6 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Das Urinhydrolysat wird daraufhin 1:10 mit Pufferlösung (2mM Ammoniumacetat in 95% H₂O und 5% ACN) verdünnt. Jeweils 10 µL der aufgearbeiteten Proben werden direkt für die Chromatographie (Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 150 mm, 5 µm, Agilent) verwendet.

LC-MS: Die Analysen erfolgen an einem LC-MS/MS-System (AB Sciex API 4000) und einem AB Sciex Triple TOF 5600 System nach Elektrospray-Ionisation im positiven und negativen Ionenmodus. *Fließmittel:* 5 mM Ammoniumformiat in H₂O mit 0.1% Ameisensäure (Phase A), 5 mM Ammoniumformiat in Methanol mit 0.01% Ameisensäure (Phase B). *Gradient:* 0-1 min: 10% B; 1-9 min: 10-100% B; 9-12 min: 100% B; Equilibrierung: 3 min. *Flussrate:* 0.85 mL/min.

Validierung: Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wird jeweils 1 mL Leerurin mit 33 verschiedenen Substanzen in Konzentrationen zwischen 5 und 50 ng/mL hergestellt. Da LSD in sehr geringen Mengen (µg-Bereich) konsumiert wird, werden hierfür Konzentrationen zwischen 0.05 und 0.5 ng/mL gewählt. Die analytischen Grenzen werden mit Hilfe der Software Valistat 2.0 nach DIN 32645 ermittelt.

2.2. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Probenvorbereitung: 2 mL Urin werden mit 200 µL Essigsäureacetat-Puffer und 50 µL β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Merck) versetzt, 120 Minuten bei 55 °C hydrolysiert und anschließend 5 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Für die darauffolgende Flüssig-Flüssig-Extraktion wird jeweils 1 mL der Urinhydrolysate in vorgefertigte Extraktionsröhrchen (De-Tox Tube A und B, Dyna-Tek Industries) pipettiert. De-Tox Tube A wird zudem mit 10 µL Trimipramin-D3, De-Tox Tube B mit 10 µL Phenobarbital-D5 versetzt. Nach Zugabe von je 2 mL Wasser werden die Extraktionsröhrchen 30 Minuten im Rotator gemischt und daraufhin 5 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Die organischen Phasen werden abgenommen, in einem Glasröhrchen vereinigt und im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird mit 60 µL Essigsäureanhydrid und 40 µL Pyridin versetzt und 1 Stunde bei 80 °C derivatisiert. Die Derivate werden anschließend im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur eingedampft, mit 100 µL Ethylacetat rekonstituiert und in ein Glasvial überführt.

GC-MS: Die Analysen werden auf einem Agilent HP 6890N-Gaschromatographen mit einem HP 7683 Injektor und einem 5973 inert Massenspektrometer im Splitless-Mode auf einer DB-5ms-Kapillarsäule (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Agilent) durchgeführt. Das Massenspektrometer wird im EI-Modus betrieben. Die Auswertung erfolgt automatisch via AMDIS und halbautomatisch via HP ChemStation im Modus Enhanced Quantitation.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Analytische Grenzen

Die Nachweisgrenzen von 31 Substanzen liegen für die LC-MS/MS- und LC-QTOF-MS-Methode unter 10 ng/mL (Abb. 1). LSD weist für beide Methoden jeweils eine Nachweisgrenze < 0.05 ng/mL auf. Während MDA für die LC-MS/MS-Methode eine Nachweisgrenze von 4.0 ng/mL zeigt, liegt diese für die LC-QTOF-MS-Methode bei 13.7 ng/mL. Diazepam weist mit einer Nachweisgrenze von 40.0 ng/mL (LC-QTOF-MS) die größte Abweichung im Vergleich zu der mit der LC-MS/MS-Methode bestimmten Nachweisgrenze von 4.1 ng/mL auf.

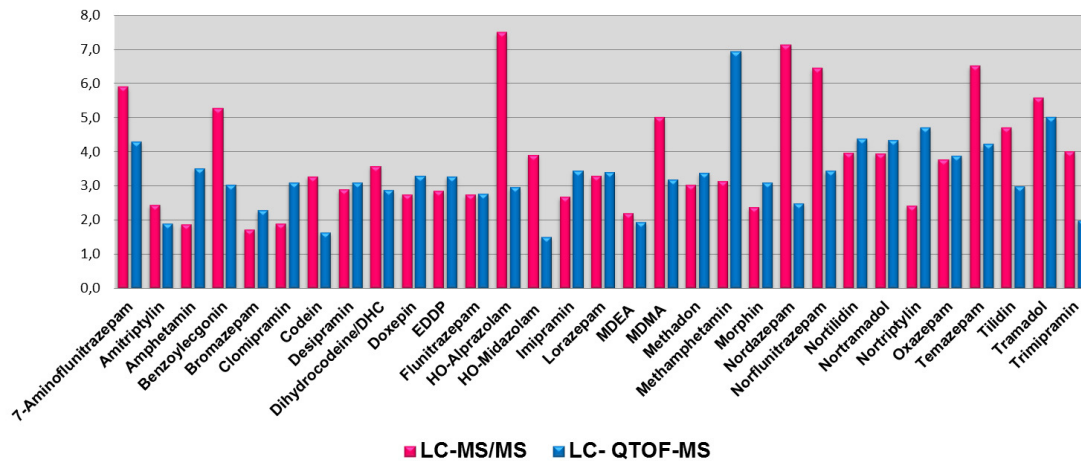


Abb. 1. Nachweisgrenzen der Analyten in ng/mL.

Die Bestimmungsgrenzen, welche mittels LC-MS/MS ermittelt wurden, liegen für 30 der 34 Substanzen unter 20 ng/mL. Hydroxy-Alprazolam, Nordazepam, Norflunitrazepam und Temazepam zeigen für die LC-MS/MS-Methode eine Bestimmungsgrenze knapp über 20 ng/mL. Für die LC-QTOF-MS-Methode liegen die Bestimmungsgrenzen für 31 Analyten ebenfalls unter 20 ng/mL (Abb. 2).

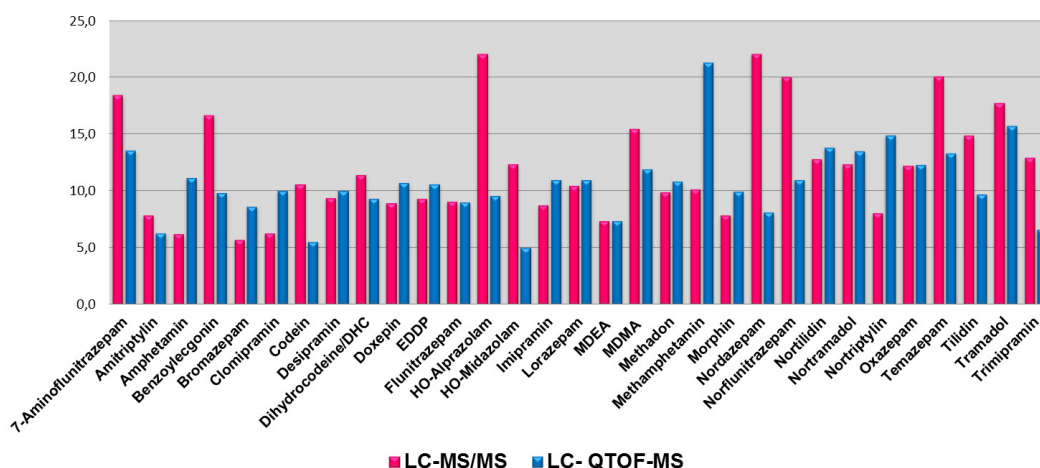


Abb. 2. Bestimmungsgrenzen der Analyten in ng/mL.

Die Ausnahmen bilden Methamphetamine (21.3 ng/mL), MDA (49.3 ng/mL) und Diazepam (40.0 ng/mL). LSD zeigt für die LC-MS/MS-Methode eine Bestimmungsgrenze von 0.13 ng/mL und für die LC-QTOF-MS-Methode eine Bestimmungsgrenze von 0.12 ng/mL.

3.2. Auswertung und Interpretation der Spektren

Die Auswertung der hochauflösenden Massenspektren erfolgt mit Hilfe der PeakView[®] Software. Hierfür werden zunächst im Rahmen einer gerichteten Suchanalyse sogenannte XIC-Listen erstellt, indem der Substanzname und die dazugehörige Summenformel einer Verbindung in die Liste eingetragen werden. Die exakte monoisotopische Masse der Substanz wird automatisch von der Software aus der jeweiligen Summenformel berechnet. Im FTC München stehen für die Auswertung von Urinproben unterschiedliche Auswertemöglichkeiten zur Verfügung (Tab. 1). Bei der Anwendung des „Standard-Screenings“ wird eine selbst erstellte XIC-Liste verwendet, die aus derzeit 360 toxikologisch relevanten Substanzen besteht. Die Retentionszeiten der Substanzen wurden durch Messen von Referenzstandards ermittelt und anschließend in die XIC-Liste eingetragen. Die aktuelle Substanzliste kann unter www.ftc-muenchen.de abgefragt werden. Noch umfassender ist das sogenannte „Erweiterte Screening“, das sich aus den Substanzen der „Weinmann“ ESI-MS/MS-Datenbank mit insgesamt 1253 Verbindungen [4] zusammensetzt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, ein Non-Targeted Peak Finding durchzuführen. In diesem Fall handelt es sich um eine ungerichtete Analyse, bei der das gesamte Chromatogramm nach auffälligen Peaks durchsucht wird.

Tab. 1. Übersicht der unterschiedlichen Auswertemöglichkeiten.

Auswertemöglichkeit	Standard-Screening	Erweitertes Screening	General Unknown Screening
Anzahl der untersuchten Substanzen	360 Substanzen mit RT	Substanzen aus „Weinmann“ ESI-MS/MS-Datenbank, 1253 Substanzen, ohne RT	Non-Targeted Peak Finding
Zeitaufwand (je Probe)	7 min	15 min	mehrere Stunden

Die Software weist vier Identifizierungsmerkmale auf: Massengenauigkeit, relative Abweichung der Retentionszeit, relative Abweichung des Isotopenverhältnisses, sowie Übereinstimmung mit einem Datenbankeintrag durch Zuordnung der generierten Fragmentionen. Allen Identifizierungsmerkmalen werden Toleranzbereiche zugeordnet. Diese werden durch Ampelsymbole veranschaulicht, die je nach voreingestellten Parametern grün, gelb oder rot erscheinen. Die Toleranzbereiche werden in den sogenannten „Confidence Settings“ der PeakView[®] Software festgelegt. Abbildung 3 zeigt die Einstellungen, die nach Optimierungsversuchen im FTC München gewählt wurden.

	Mass Error Mass Error (ppm)	Retention Time % Error	Isotope Isotope Ratio % Difference	Library Hit Library Score
✓	< 5.0	< 2.0	< 10.0	> 70.0
▲	< 7.0	< 3.0	< 20.0	> 30.0
●	>= 7.0	>= 3.0	>= 20.0	<= 30.0

Abb. 3. Confidence Settings der PeakView[®] Software.

Beträgt die Massenabweichung weniger als ± 5 ppm zeigt die PeakView[®] Software ein grünes Ampelsymbol. Ist sie größer als 5 ppm aber kleiner als 7 ppm, wird ein gelbes und bei größer als 7 ppm ein rotes Symbol gezeigt.

Für die Interpretation der Spektren wurden folgende Identifikationskriterien festgelegt: Sind alle Identifizierungsmerkmale im engsten Toleranzbereich erfüllt, gilt die entsprechende Substanz als identifiziert. Treffen drei der vier Merkmale zu, ist dies ein starker Hinweis auf die Anwesenheit eines Analyten in der Probe. Werden dagegen nur zwei Identifizierungsmerkmale im engsten Toleranzbereich erfüllt, ergibt sich daraus lediglich ein schwacher Hinweis auf die Substanz. Diese Einteilung bietet jedoch einen gewissen Interpretationsspielraum. Wird für eine Substanz beispielsweise eine Massenabweichung >5 ppm bestimmt, so ist dies häufig schon als Ausschlusskriterium zu betrachten, selbst wenn für die übrigen Identifizierungsmerkmale die engsten Toleranzbereiche erfüllt sind, da die exakte Masse ein notwendiges Kriterium bei der Identifizierung einer Substanz ist. Genauso verhält es sich bei der Übereinstimmung mit einem Datenbankeintrag. Ist diese kleiner als 70%, kann die Anwesenheit des Analyten in den meisten Fällen bereits ausgeschlossen werden, da die Zuordnung von Fragmentionen entscheidend für den Nachweis einer Substanz ist.

3.3. Vergleich GC-MS und LC-QTOF-MS

Die Ergebnisse der GC-MS-Auswertungen zahlreicher postmortaler Urinproben wurden mit den Nachweisen aus der LC-QTOF-MS-Methode verglichen. Dabei ergaben sich hervorragende Übereinstimmungen zwischen beiden Verfahren. Die Substanzen aus dem „Erweiterten Screening“ konnten mittels LC-QTOF-MS nahezu in derselben Art und Weise wie über die GC-MS-Methode erfasst werden. Bei wenigen Substanzen zeigte jedoch die GC-MS bei der Detektion von gewissen Analyten (z.B. Propofol und Atracurium) Vorteile gegenüber der LC-QTOF-MS-Methode, so dass auf den Einsatz der GC-MS nicht verzichtet werden sollte. Zudem können Substanzen, die aufgrund eines fehlenden Eintrags in der XIC-Liste nur mittels GC-MS bestimmt wurden, im Nachhinein in die Listen mitaufgenommen werden, was zu einem ständigen Ausbau der LC-QTOF-MS-Screeningmethoden führt.

4. Zusammenfassung

Durch den Methodenvergleich konnte gezeigt werden, dass die entwickelte und in Teilen validierte LC-QTOF-MS-Methode für ein qualitatives Screening von Urinproben geeignet ist. Wird ein Multi-Target-Screening durchgeführt, können die verwendeten XIC-Listen lediglich durch das Eintragen der Summenformel einer Substanz schnell und einfach erweitert werden. Ein weiterer großer Vorteil der TOF-Analytik ist die Möglichkeit einer retrospektiven Datenanalyse. Da bei Time-of-Flight-Massenspektrometern alle erzeugten Ionen registriert und in den Rohdaten gespeichert werden, ist eine gezielte Suchanalytik, z.B. nach Designerdrogen, im Nachhinein möglich. Dieser Vorteil wird auch für die tägliche Routine genutzt, um gezielt auf Spice und Badesalze mittels LC-QTOF-MS zu untersuchen. Die Substanzlisten befinden sich auf der Homepage des FTC München (www.ftc-muenchen.de). Darüber hinaus bietet die LC-QTOF-MS-Screeningmethode gegenüber dem GC-MS-Verfahren den Vorteil, dass hydrophile, thermolabile und nicht-flüchtige Substanzen ohne vorherige Derivatisierung analysiert werden können.

Je nach Software werden jedoch bei der durchgeführten Analyse nicht alle möglichen coeluierenden Substanzen fragmentiert. Eine innovative Lösung stellt in diesem Fall der SWATH (sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra)-Algorithmus dar. Dabei werden alle Analyten, die einen bestimmten, größeren Q1-Massenbereich passieren, fragmentiert. Somit werden von allen Substanzen Fragmentspektren generiert und eine vollständige Auswertung aller Analyten ist auch ohne informationsabhängige Datenaufnahme (IDA) prinzipiell möglich [5].

5. Danksagung

Mein Dank gilt Katharina Oberle, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeit, welche im FTC München angefertigt wurde, die oben beschriebene LC-QTOF-MS-Methode entwickelt und validiert hat.

6. Literatur

- [1] Maurer HH. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2007;388:1315-25.
- [2] Maurer HH. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1310-24.
- [3] Maurer HH, Pflieger K, Weber AA. *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites*. Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
- [4] Dresen S, Gergov M, Politi L, Halter C, Weinmann W. ESI-MS/MS library of 1,253 compounds for application in forensic and clinical toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2009;395:2521-2526.
- [5] Roemmelt AT, Steuer AE, Poetzsch M, Kraemer T. Liquid chromatography, in combination with a quadrupole time-of-flight instrument (LC QTOF), with sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra (SWATH) acquisition: systematic studies on its use for screenings in clinical and forensic toxicology and comparison with information-dependent acquisition (IDA). *Anal Chem* 2014; 86:11742-11749.