

Analýza nelegálních drog a léčiv ve vlasech s použitím trojitého kvadrupolu Xevo TQ-S Micro

Rob Lee
Principal Scientist
Robert_lee@waters.com

Jan Bohuslavek, PhD
Waters



Proč používat vlasy k testování drog a léčiv?

- Neinvazivní, jednoduchý sběr vzorků
 - Na odběr vzorků není třeba vyškolený personál
 - Jednoduchý transport a uložení vzorků
 - Dlouhý časový úsek – současný stav až plná historie vzorku (týdny až roky, dle délky vlasů)

~Růst přibližně 1 cm za měsíc



Mechanismus inkorporace látek do vlasů

Látky a metabolity
z potu

Cévy (z krve)

Externí/
Z prostředí

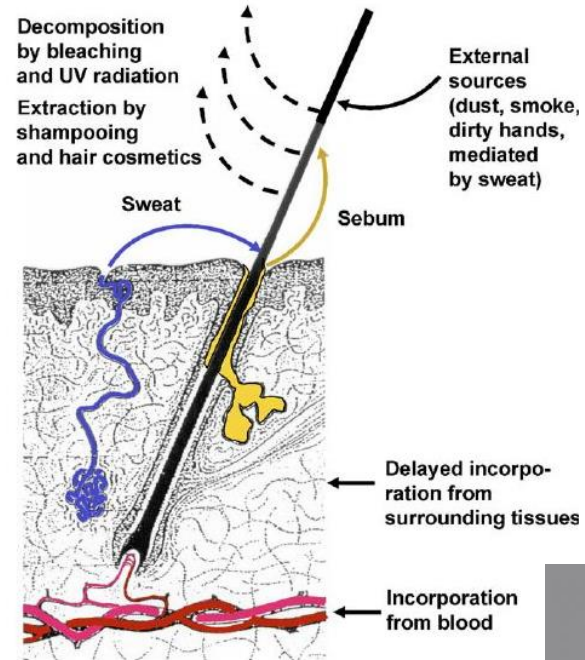


Figure taken from
Pragst et al., Clin Chim Acta 370 (2007)

Society of Hair Testing - doporučení

Forensic Science International xxx (2011) xxx-xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensiint

Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair[☆]

Gail A.A. Cooper^{a,*}, Robert Kronstrand^{b,c}, Pascal Kintz^d

^aForensic Medicine and Science, University of Glasgow, G12 8QQ, Glasgow, Scotland
^bDepartment of Forensic Genetics and Forensic Toxicology, National Board of Forensic Medicine, SE-58758 Linköping, Sweden
^cDepartment of Medical and Health Sciences, Faculty of Health Sciences, Linköping University, SE-58185 Linköping, Sweden
^dX-Perfise Consulting, 84 route de Saverne, 67205 Oberhausbergen, France

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 24 January 2011
 Accepted 24 January 2011
 Available online xxx

Keywords:
 Hair testing
 Guidelines

ABSTRACT

The Society of Hair Testing (SoHT) Guidelines for Drug Testing in Hair provide labor recommended best practice guidelines whether they are currently offering drug testing in hair or plan to offer a hair testing service in the future. The guidelines include reference to recommend collection and storage procedures, through sample preparation, pre-treatment and analysis of cut-offs.

Crown Copyright © 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Table 1

Recommended cut-offs for substances and metabolites in hair to identify use.

Screening		Confirmation	
Group	Cut-off (ng/mg)	Target analyte	Cut-off (ng/mg)
Amphetamines	0.2	Amphetamine	0.2
		Methamphetamine	0.2
		MDA	0.2
		MDMA	0.2
Cannabinoids	0.1	THC	0.05
		THC-COOH	0.0002
Cocaine	0.5	Cocaine	0.5
		BZE, EME, CE, NC	0.05
Opiates	0.2	Morphine	0.2
		Codeine	0.2
		6-acetylmorphine	0.2
Methadone	0.2	Methadone	0.2
		EDDP	0.2
Buprenorphine	0.01	Buprenorphine	0.01
		Norbuprenorphine	0.01

Testování vlasů je prováděno podle doporučení Society of Hair Testing (SoHT) nebo the European Workplace Drug Testing Society (EWDTS)

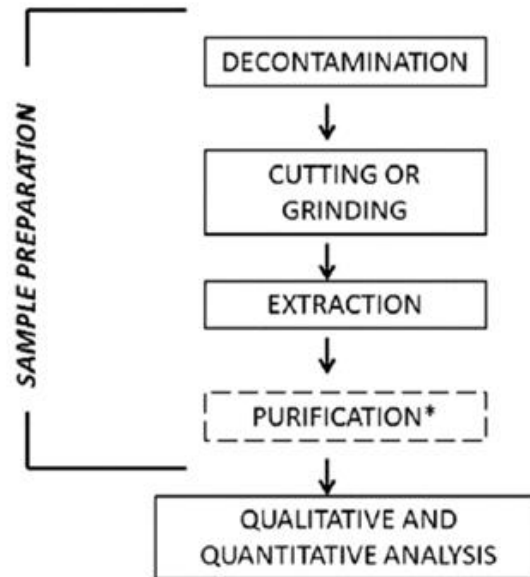


Co brát v potaz při vývoji metody

- Kolik vzorku?
 - 10 až 20 mg minimum pro zajištění opakovatelnosti
- Jaká metoda extrakce?
 - Metanol
 - Zahrnuje inkubaci přes noc
 - Komerčně dostupný extrakční pufr
 - Inkubace pouze 60 minut
 - Vlastní mix
- Dostatečně citlivé přístroje
- Naše možnosti
 - ACQUITY I-Class (FTN)
 - Xevo TQ-S-Micro



Typický průběh práce



Průběh práce – metoda Waters

- 10 až 20 mg inkubováno 60 minut s 500 μ L extračního pufru M3 při 100 stupních Celsia
 - Extrakční pufr M3 je k dostání od firmy Comedical, Trento, Italy.
<http://www.comedical.biz/>
- 100 μ L z inkubovaného objemu použito pro analýzu
 - OASIS PRiME MCX - SPE
 - 1 metoda extrakce
 - 2 metody LC-MS/MS
 - 25 μ L použito pro analýzu 29 “základních drog”
 - Opiáty, Amfetaminy, Kokain, Ketamin, Metadon, Buprenorphin, Benzodiazepiny
 - 25 μ L použito pro analýzu THC, Cannabidiolu a Cannabinolu
 - Celkový čas pro analýzu – 10 minut



Průběh práce – metoda Waters

- Pokud je vzorek pozitivní na THC
 - Zbytek inkubovaného objemu může být analyzován na karboxy-THC.

[TECHNOLOGY BRIEF]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™

Using UPLC-MS/MS for the Determination of Carboxy-THC (cTHC) in Hair for Forensic Toxicology

Massimo Gottardi¹, Francisco Ferron², Rob Lee², Andrea Gardumi¹, Simone Donzelli² and Michelle Wood³
¹Comedical, Trento, Italy; ²Waters Corporation, Milano, Italy; ³Waters Corporation, Wilmslow, UK



A robust and sensitive UPLC-MS/MS method for the determination of cTHC in hair.



Protokol SPE

- 100μL z inkubovaného objemu
- Zředit kyselinou fosforečnou
- Napipetovat na platíčka OASIS PRiME MCX 30mg
- Promýt 2% kyselinou mravenčí, potom 50% metanolem
- Eluovat směsí metanolu a acetonitrilu s přidáním amoniaku
- 25μL na LC-MS/MS analýzu “základních drog”
 - 5.25 min
- 25μL na LC-MS/MS analýzu THC
 - 4.75 min method
- Obě analýzy používají stejnou kolonu a stejné mobilní fáze

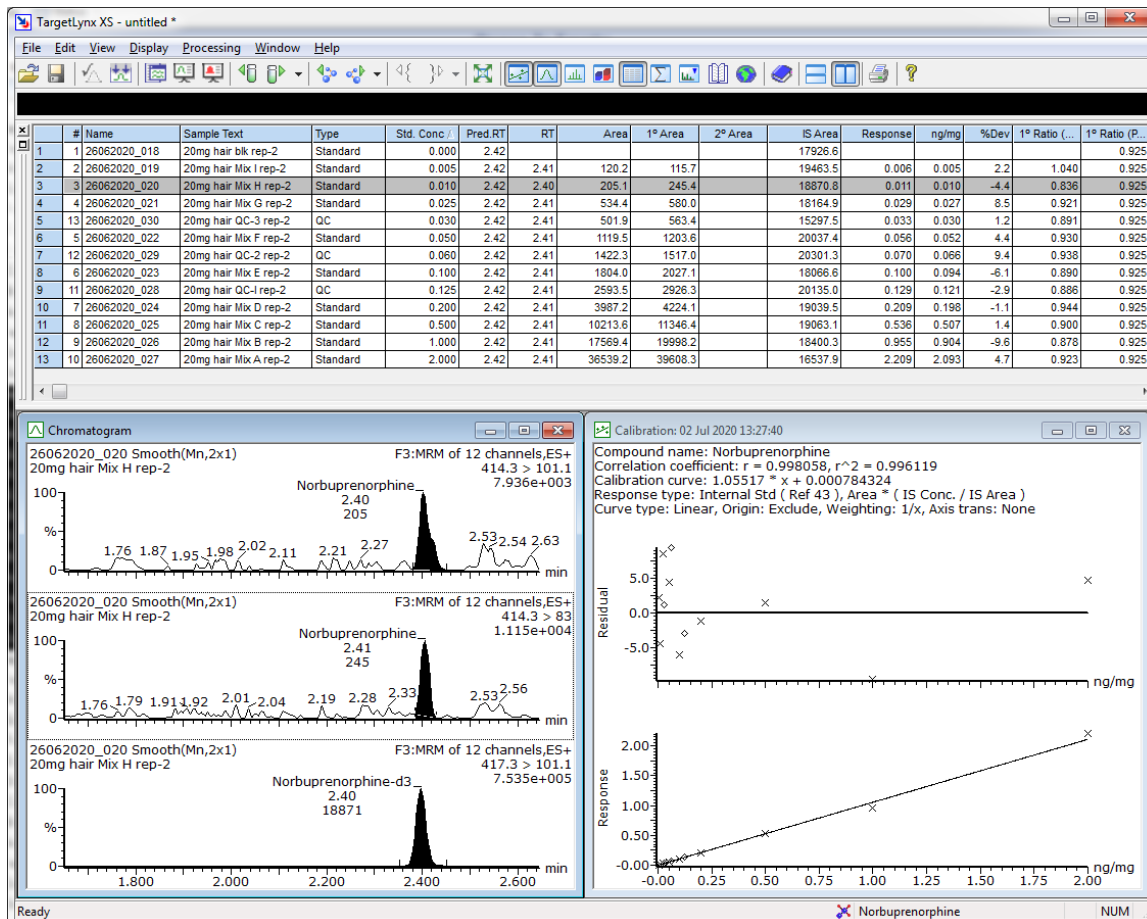


Protokol SPE na Karboxy-THC

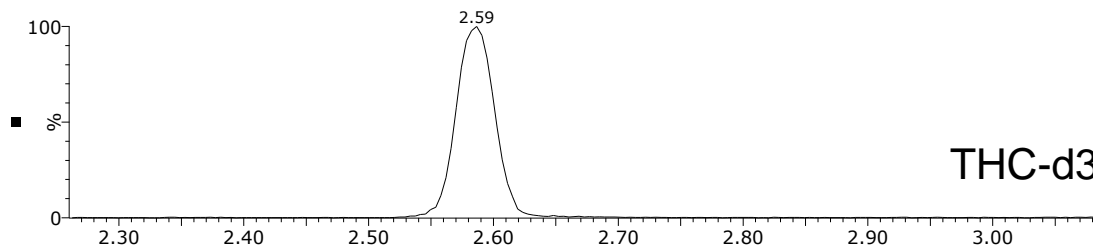
- 400μL inkubačního roztoku
- Napipetovat do SPE kolonky OASIS PRiME HLB 30mg
- Promýt 50% Acetonitrilem, poté hexanem
- Eluovat roztokem metanolu a acetonitrilu
- Eluent vysušit
- Rekonstituovat na LC-MS/MS analýzu
 - 5.25 min
 - Kolona a mobilní fáze odlišné od předchozích metod



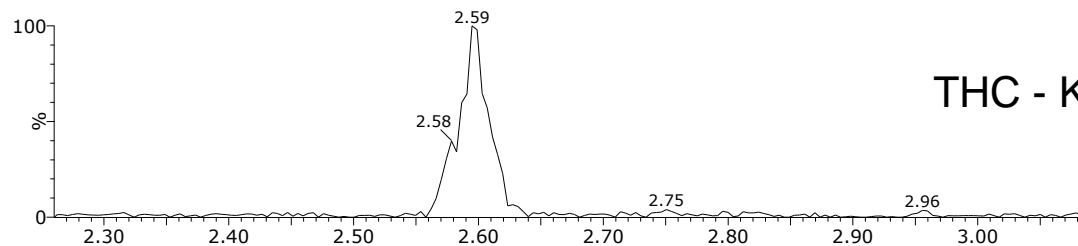
Kalibrační křivka vlasů spikovaných norbuprenorphinem



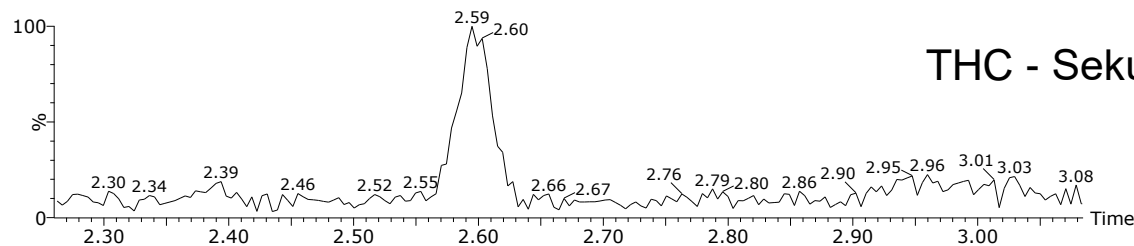
THC při limitu stanoveném SoHT (0.05ng/mg)



THC-d3 ISTD



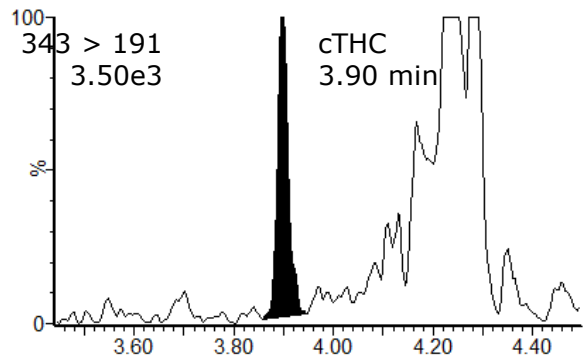
THC - Kvantifikační iont



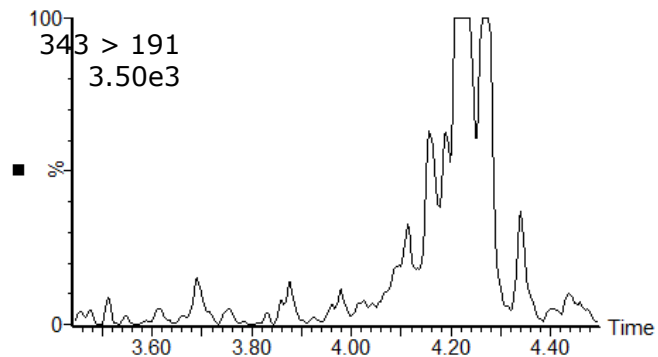
THC - Sekundární iont



Karboxy-THC při limitu SoHT (0.2pg/mg)



Spikované vlasy



Kontrolní vlasy (blank) – 20 mg



Závěr

- Jedna extrakce pro všechny látky na seznamu SoHT i EWDTs
- Krátká doba inkubace– 60 minut
- Karboxy-THC metoda pro potvrzení vzorků pozitivních na THC
- Všechny látky detekovatelné v koncentracích nižších než limity SoHT a EWDTs
- Možnost přidání panelů dalších látek (LC-MS-MS)
- V inkubačním roztoku je možné měřit i ethyl-glukuronid



Poděkování

- Francisco Ferron (Waters, Italy)
- Massimo Gottardi and Andrea Gardumi (Comedical, Italy)





Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™