



13. Anwendertreffen der DGKL-AG LC-MS/MS in der Labormedizin



Bestimmung von Amphetaminen im Urin auf Basis der MassTox Series A-Analytik: Entwicklung und Validierung einer schnellen LC-MS/MS Methode

Christoph Geffert



Entwicklung einer quantitativen Bestätigungsanalyse mit der LC-MS/MS für 5 Amphetamine im Urin:

- **Schnell, robust**
- **Einfache Aufarbeitung**
- **Prozessoptimierung der Laborroutine: Gewinn an Zeit und Flexibilität:**
Kein weiterer Trennsäulentausch, keine zusätzliche Equilibrierungszeit etc.

→ Weiterentwicklung einer vorhandenen Methode

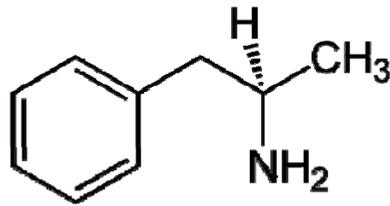
→ Basis: MassTox Series A Diagnostik, Chromsystems GmbH



Struktur der Amphetamine und abgeleiteter Derivate

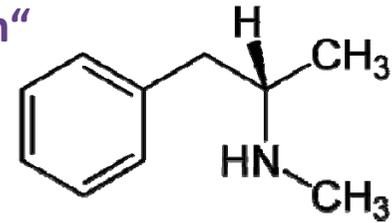


„Speed“



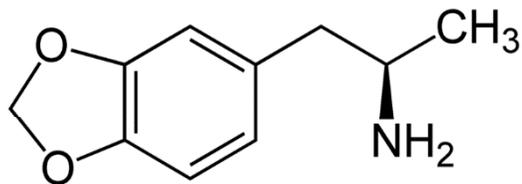
Amphetamin

„Crystal Meth“

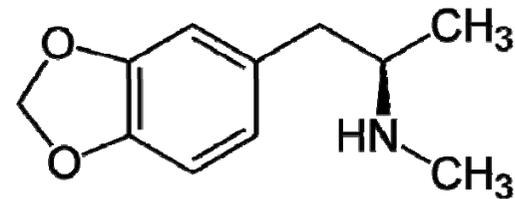


Methamphetamin

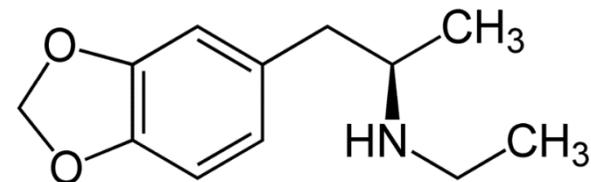
„Ecstasy“



Methylenedioxyamphetamin (MDA)



Methylenedioxyethylamphetamin (MDMA)



Methylenedioxyethylamphetamin (MDEA)

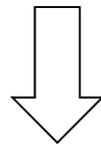
Methode: Probenaufarbeitung



Es wurde die MassTox-Series A Diagnostik inklusive der dazugehörigen analytischen Säule und dem Laufmittelsystem der Chromsystems GmbH, Gräfelfing verwendet (*siehe Arbeitsvorschrift*).

20 µl Probe

**20 µl IS-Mix
(enthält D₅-Derivate)**



**1:20 Verdünnung mit den Puffern 1 und 2 (1:1 v/v)
der MassTox Serie A**

Injektion

(AB Sciex API 5500 Triple Quad™, ESI-Positivmodus)

Methode: Systemeinstellungen



HPLC-Bedingungen, Agilent 1260 Infinity

Zeit (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)	Flussrate	0,6 ml/min
0,00	90	10	Injektionsvolumen	10 µl
3,00	50	50	Säulenofen	25°C
3,16	90	10	Methodenlänge	5 min
5,0	90	10		

Verwendete Massenübergänge*, AB Sciex API 5500 Triple Quad™, ESI-Positivmodus

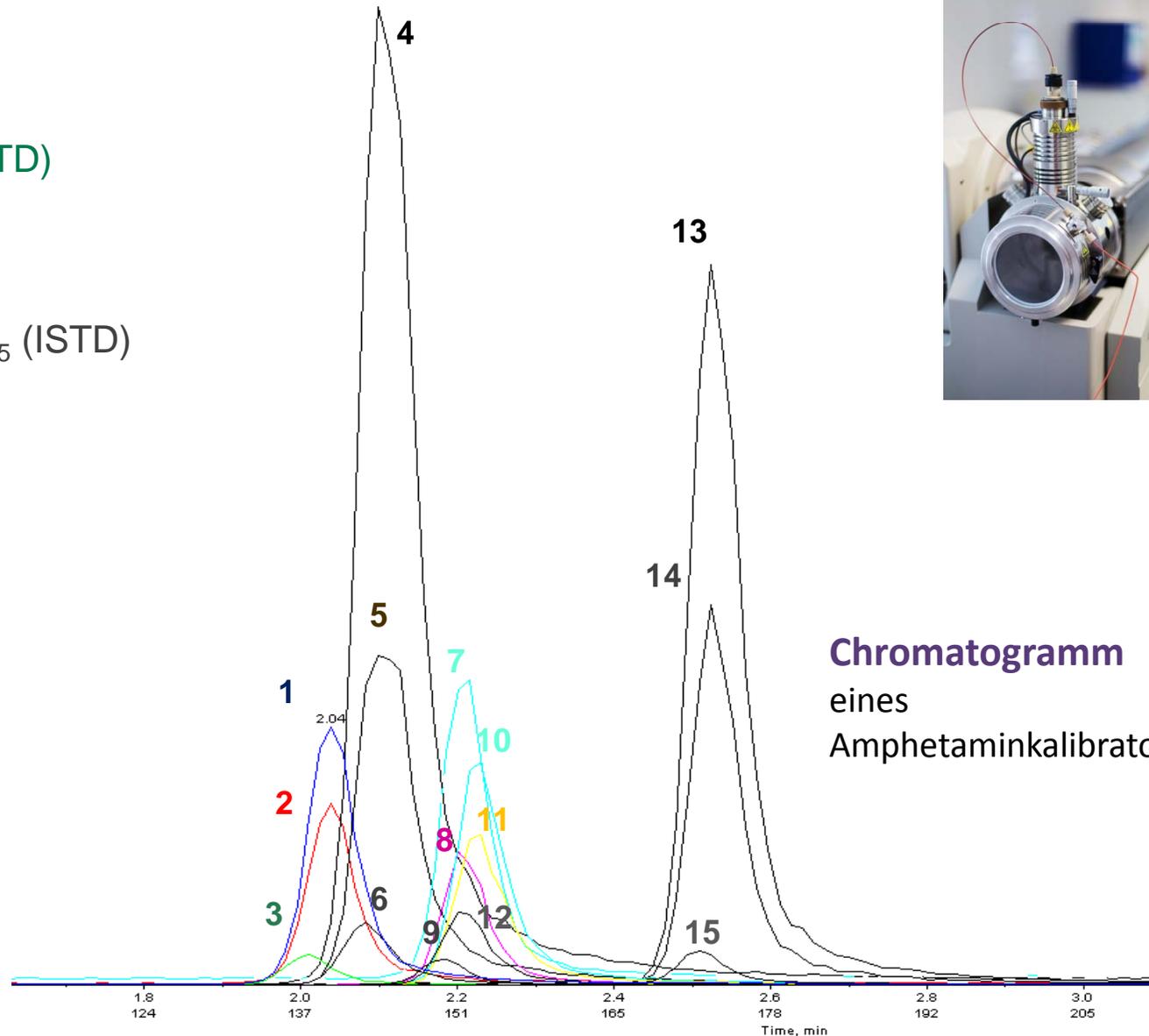
Substanz	MRM 1	MRM 2	IS (D ₅ -Derivat)
Amphetamin	136 → 119	136 → 90.9	141.1 → 93
Methamphetamin	150 → 91	150 → 119	155 → 92
MDA	180.1 → 163	180.1 → 105	185.2 → 168.1
MDEA	208 → 163	208 → 105	213.2 → 77.1
MDMA	194 → 105	194 → 133	199.2 → 165.1



Ergebnisse: Chromatogramm



1. Amphetamin 1
2. Amphetamin 2
3. Amphetamin-D₅ (ISTD)
4. Methamphetamin 1
5. Methamphetamin 2
6. Methamphetamin-D₅ (ISTD)
7. MDA 1
8. MDA 2
9. MDA-D₅ (ISTD)
10. MDMA 1
11. MDMA 2
12. MDMA-D₅ (ISTD)
13. MDEA 1
14. MDEA 2
15. MDEA-D₅ (ISTD)



Chromatogramm
eines
Amphetaminkalibrators



Wiederholgenauigkeiten

in Serie: $V_k < 5\%$

an verschiedenen Tagen: $V_k < 10\%$

Vergleich mit Referenzmethode

Je 15 Amphetamin- und Methamphetamin-Proben wurden mit einer etablierten GC-MS Methode verglichen:

→ Amphetamin: $r^2 = 0,97$

→ Metamphetamin: $r^2 = 0,94$

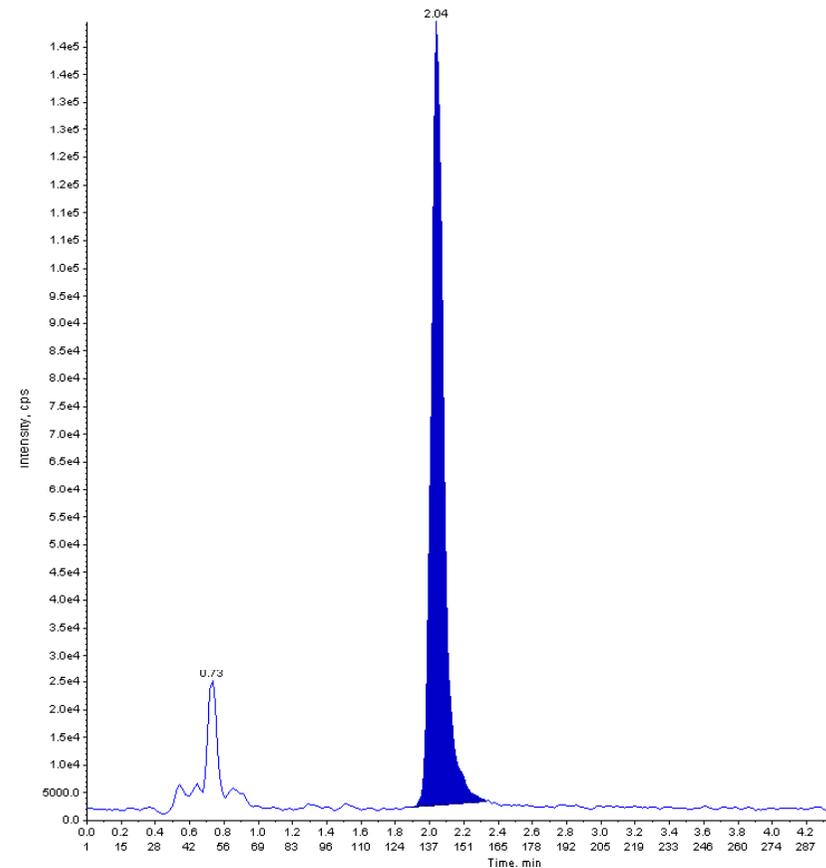
Ergebnisse: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen



LLOD und LLOQ

Ermittlung anhand von Kalibrationsreihen mit aufgestockten Matrixproben.

Substanz	LLOD (µg/l)	LLOQ (µg/l)
Amphetamin	1.5	3.0
Methamphetamin	0.7	1.5
MDA	2.1	3.8
MDEA	0.9	1.8
MDMA	1.1	2.3



Amphetamin
(aufgestockte Matrixprobe)
 $c = 50 \mu\text{g/l}$, 136.0/119.0 Da



Ermittlung des Matrixeffektes

5 Reinsubstanzlösungen sowie 20 aufgestockte Matrixproben wurden mit zwei Konzentrationsleveln der Analyten aufgearbeitet.

Die Angabe des Matrixeffektes erfolgte als Verhältnis der Peakflächen der aufgestockten Matrixproben zu denen der Kontrollproben

Substanz	Matrixeffekt in % (Konzentration in µg/l)	
	MRM 1	MRM 2
Amphetamin	99.4 ± 12.1 (50)	99.7 ± 12.1 (150)
Methamphetamin	101 ± 12.7 (50)	101 ± 9.9 (150)
MDA	100 ± 12.5 (50)	100 ± 11.5 (150)
MDEA	101 ± 15.4 (50)	101 ± 8.1 (150)
MDMA	106 ± 17.5 (50)	106 ± 11.6(150)



Ermittlung im relevanten Bereich

Linearität (Mandel-F-Test) und Varianzhomogenität (Cochran-Test) wurden für jeden Analyten anhand von Kalibrationsreihen (20, 30, 60, 120, 200, 400, 700 und 1000 µg/l) geprüft. Die Proben jedes Konzentrationslevels wurden mehrfach aufgearbeitet (n = 6)

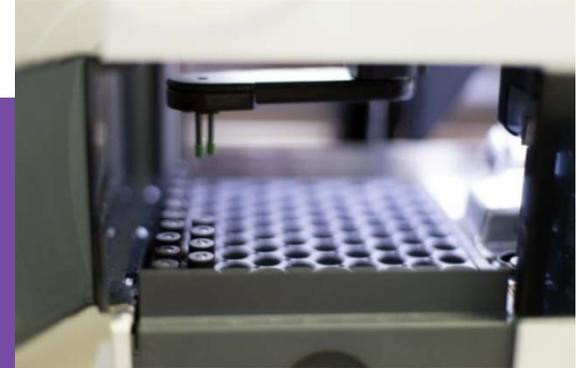
Substanz	Linearität und Varianzhomogenität	
	MRM 1	MRM 2
Amphetamin	20 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
Methamphetamin	30 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
MDA	20 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
MDEA	30 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
MDMA	20 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l

Zusammenfassung und Ausblick

1. Die vorgestellte LC-MS/MS-Methode erweitert die MassTox Series A-Diagnostik der Chromsystems GmbH um die Bestimmung von Amphetaminen im Urin.

2. Die Methode kann aufgrund der erzielten Ergebnisse als Bestätigungsanalyse zum Nachweis von 5 Amphetaminen eingesetzt werden.

3. Eine weitere Ergänzung der Methodik um die Wirkstoffklasse der Benzodiazepine im Urin ist in Vorbereitung.



Ende



Herzlichen Dank für
die Aufmerksamkeit!

