

İDRARDA TOKSİK MADDE ANALİZİ: TARAMA ve DOĞRULAMA



T.C. Sağlık Bakanlığı

Doç. Dr. Hüseyin KAYADİBİ, MD, MSc

Tıbbi Biyokimya Uzmanı

Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi

S.B. Hitit Üniversitesi Çorum Eğitim ve Araştırma Hastanesi

07 Aralık 2016, Ankara

SUNUM PLANI

- Toksik madde nedir?
- İdrarın özellikleri nelerdir?
- Tarama testleri nelerdir?
- Doğrulama testi nedir?
- Doğrulamada kullanılan analitik yöntemler nelerdir?
 - Düşük çözünürlüklü MS'ler
 - Yüksek çözünürlüklü MS'ler
- Bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları nelerdir?

TOKSİK MADDE NEDİR?

Hücrelere ve yaşayan dokulara kimyasal, biyokimyasal ya da radyoaktif nitelikte zarar veren her türlü maddedir.



TOKSİK MADDELER

- Metaller
- Tarım ilaçları
- Radyoaktif maddeler
- Bitkisel ve hayvansal toksinler
- Endüstriyel kimyasal maddeler
- **Kötüye kullanılan ilaç ve maddeler**



KÖTÜYE KULLANILAN İLAÇ ve MADDELER

- **Alkol ve Metabolitleri**; Etanol, Metanol, Etil Glukoronid, Etil Sülfat
- **Uçucu Maddeler**; Hekzan, Aseton, Toluen
- **Halüsinojen, Uyuşturucu, Uyutucu, Uyarıcı Maddeler ve Metabolitleri**; Kannabinoidler, Katinonlar, Opiatlar ve Metabolitleri, Benzodiazepinler, Kokain ve Metabolitleri, Esrar ve Metabolitleri, Barbütiratlar, Trisiklik Antidepresanlar, Amfetaminler
-

KLAVUZ



CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

April 2007

C52-A2

Toxicology and Drug Testing in the Clinical
Laboratory; Approved Guideline—Second
Edition

KLAVUZ



CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

March 2010

C43-A2

Gas Chromatography/Mass Spectrometry
Confirmation of Drugs; Approved
Guideline—Second Edition

NEDEN İDRAR?



- Otomatize analizlere uygundur.
- Kan örneklerine göre en önemli avantajları, kullanılan maddenin ve metabolitlerinin yüksek konsantrasyonda bulunmasıdır.
- Yapısında serbest serum proteinleri, lipidler ve diğer büyük moleküler ağırlıklı bileşiklerin bulunmaması toksikolojik ön analizleri ve numune hazırlığını kolaylaştırır.
- Saptama penceresi orta uzunluktadır.
- İdrar analizleri üzerine oldukça fazla deneyim vardır.

İDRARDA TESPİT ZAMANLARI

Madde	Cut-off Değeri	İdrarda Kalış Süresi	
		Minimum	Maksimum
Amfetamin	1000 ng/mL	2-7 saat	2-4 gün
Barbitürat	300 ng/mL	2-4 saat	<u>7-21 gün</u>
Benzodiazepin	300 ng/mL	2-7 saat	1-4 gün
Kokain	300 ng/mL	1-4 saat	2-4 gün
Marijuana (THC)	50 ng/mL	2 saat	<u>15-30 gün</u>
MDMA	500 ng/mL	2-7 saat	1-3 gün
Metamfetamin	1000 ng/mL	2-7 saat	2-4 gün
Opiat	<u>2000 ng/mL</u>	2 saat	2-3 gün
Metadon	300 ng/mL	3-8 saat	1-3 gün
TCA	1000 ng/mL	8-12 saat	2-7 gün

KARŞILAŞTIRMA

Tarama Yöntemleri

- Ucuz
- Hızlı
- Semi-kantitatif
- Yüksek hassasiyet
- Düşük özgüllük

Doğrulama Yöntemleri

- Pahalı
- Yavaş
- Kantitatif
- Yüksek hassasiyet
- Yüksek özgüllük (düşük yanlış pozitiflik)

TARAMA YÖNTEMLERİ

1. Hasta Başı Analizler

2. İmmunoasseyler

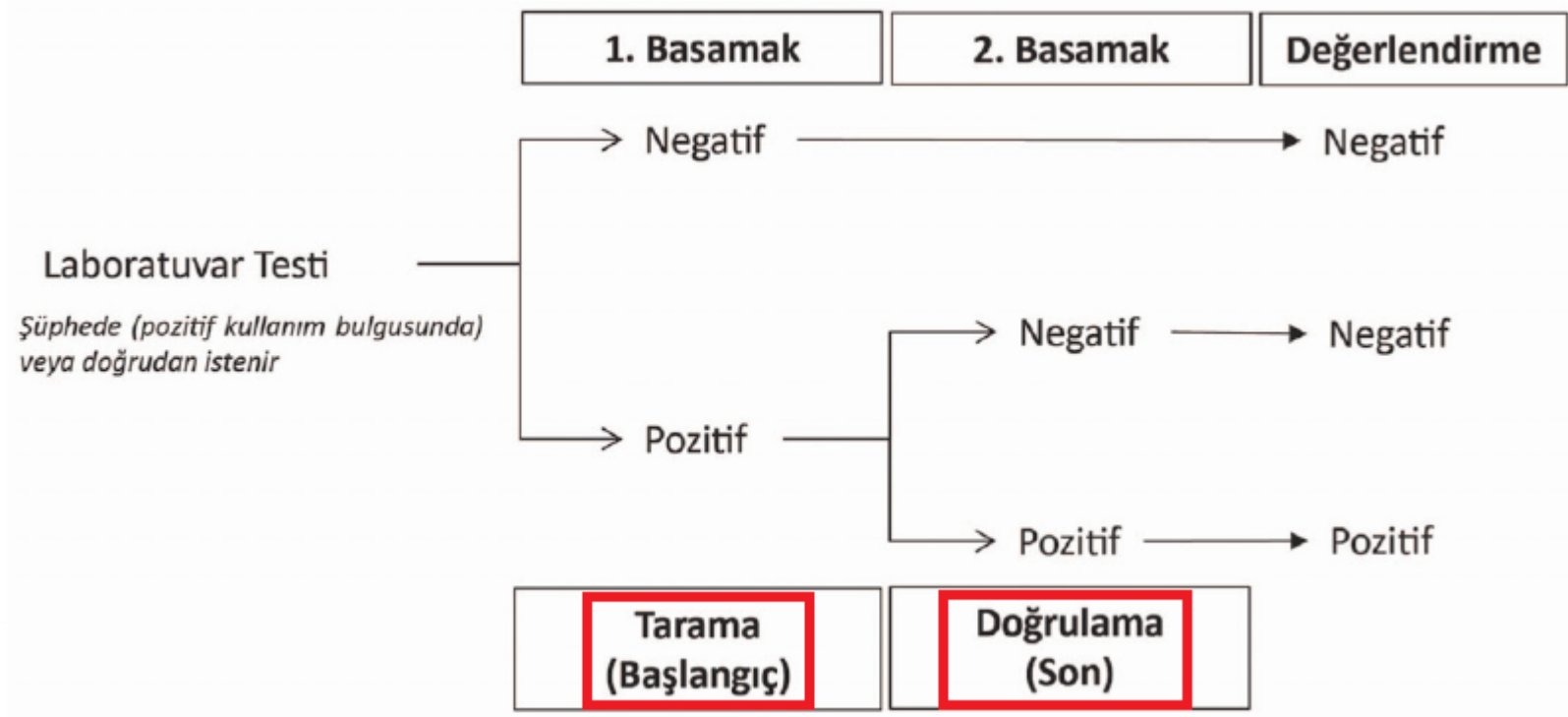
RIA, ELISA, Enzyme Multiplied IA, Fluorescent Polarization IA, Kinetic Interaction of Microparticles in Solution, Cloned Enzyme Donor IA

3. Kromatografik Teknikler

TLC, GC, GC/TOF, HPLC, UPLC, LC/QTOF

TARAMA YÖNTEMLERİ

- Negatif örnekleri pozitif olabilecek örneklerden ayırmak için kullanılır.



DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

- Tarama testinden **farklı** ve **daha spesifik** bir fizikokimyasal prensibe dayalı yöntem olmalıdır.
- Mümkün olan **en doğru** ve **en spesifik** testler kullanılmalıdır.
- Tarama testleri ile aynı ya da **daha yüksek hassasiyete** sahip olmalıdır.
- Mümkünse **ekonomik** olmalıdır.
- Bir çok laboratuvarda standardizasyonu sağlayabilecek kadar **basit** olmalıdır.
- Sonuçlar kanuni olarak **savunulabilir** olmalıdır.

DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

- Doğrulama yöntemi olarak altın standart yöntem **Kütle Spektrometresidir**.
- Ölçüm prensibinde biraz farklılık olsa bile farklı bir immunoassay yöntemi kullanılarak diğer immunoassay sonucunun doğrulanması **kabul edilemez**. Çünkü; her iki immunoassay ölçümünde de çapraz reaksiyonlar görülebilir.
- Eğer kimyasal türevlendirme ile **alı konma zamanları** değiştirilir ise hem tarama hem de doğrulama için aynı sistemin kullanılması kabul edilebilir.

DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

1. Düşük Çözünürlüklü MS'ler

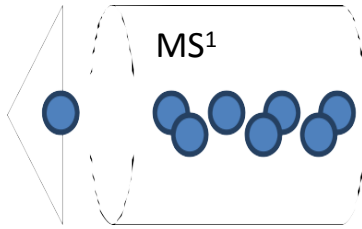
- Q, QQQ, İon Trap
- Hedeflenmiş analizler

2. Yüksek Çözünürlüklü MS'ler

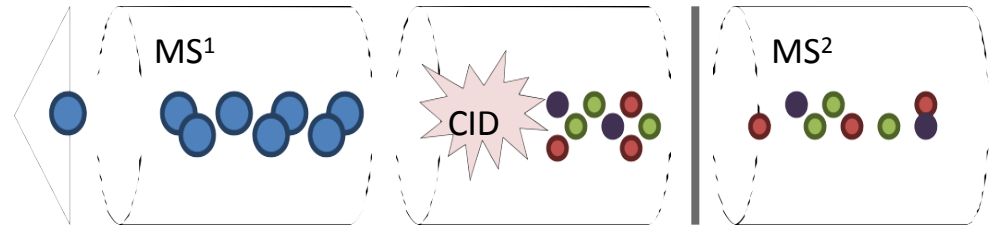
- TOF, QTOF, Orbitrap, QOrbitrap
- Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş analizler

DÜŞÜK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS'LER

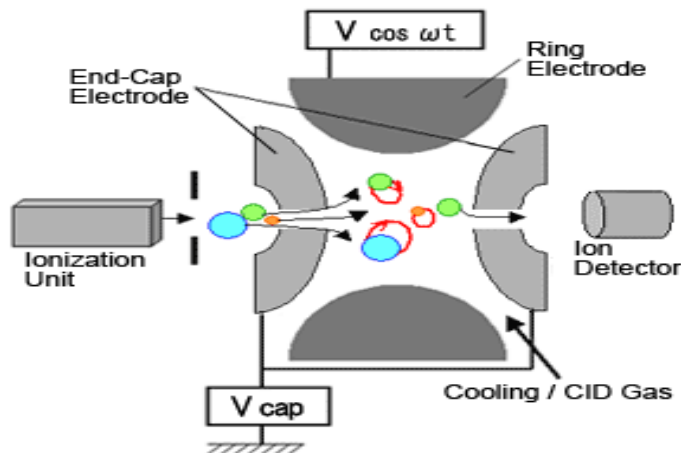
Q



QQQ

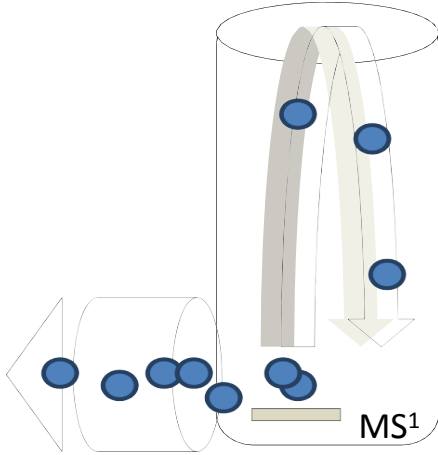


Ion Trap

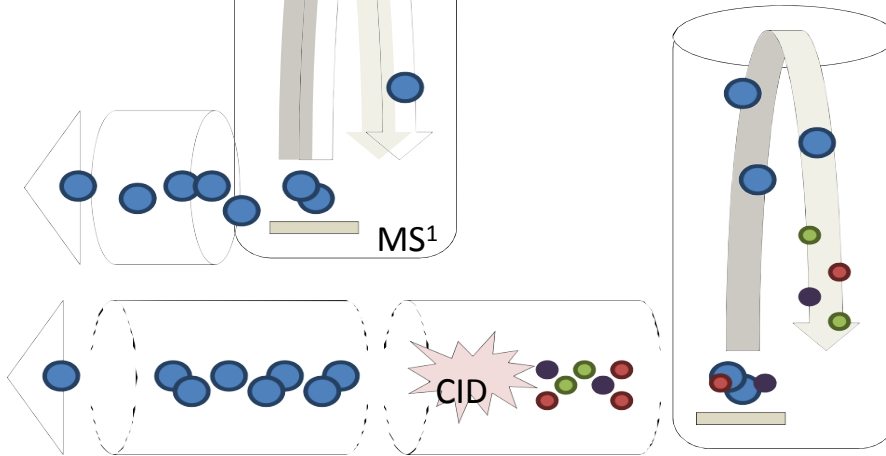


YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS'LER

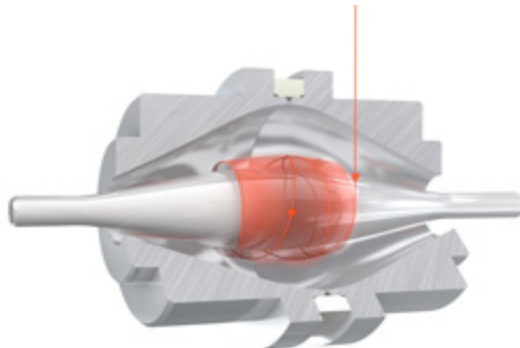
TOF



QTOF

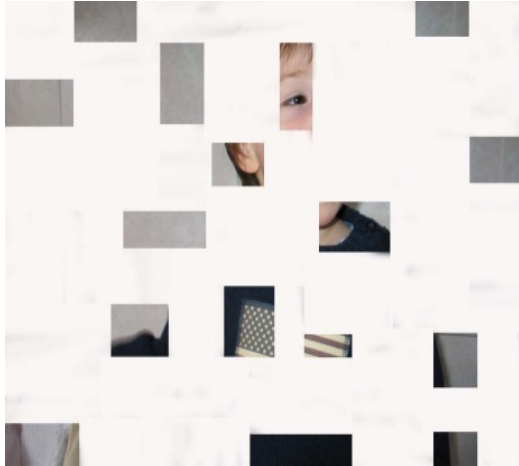


ORBITRAP



ÇÖZÜNÜRLÜK

QQQ



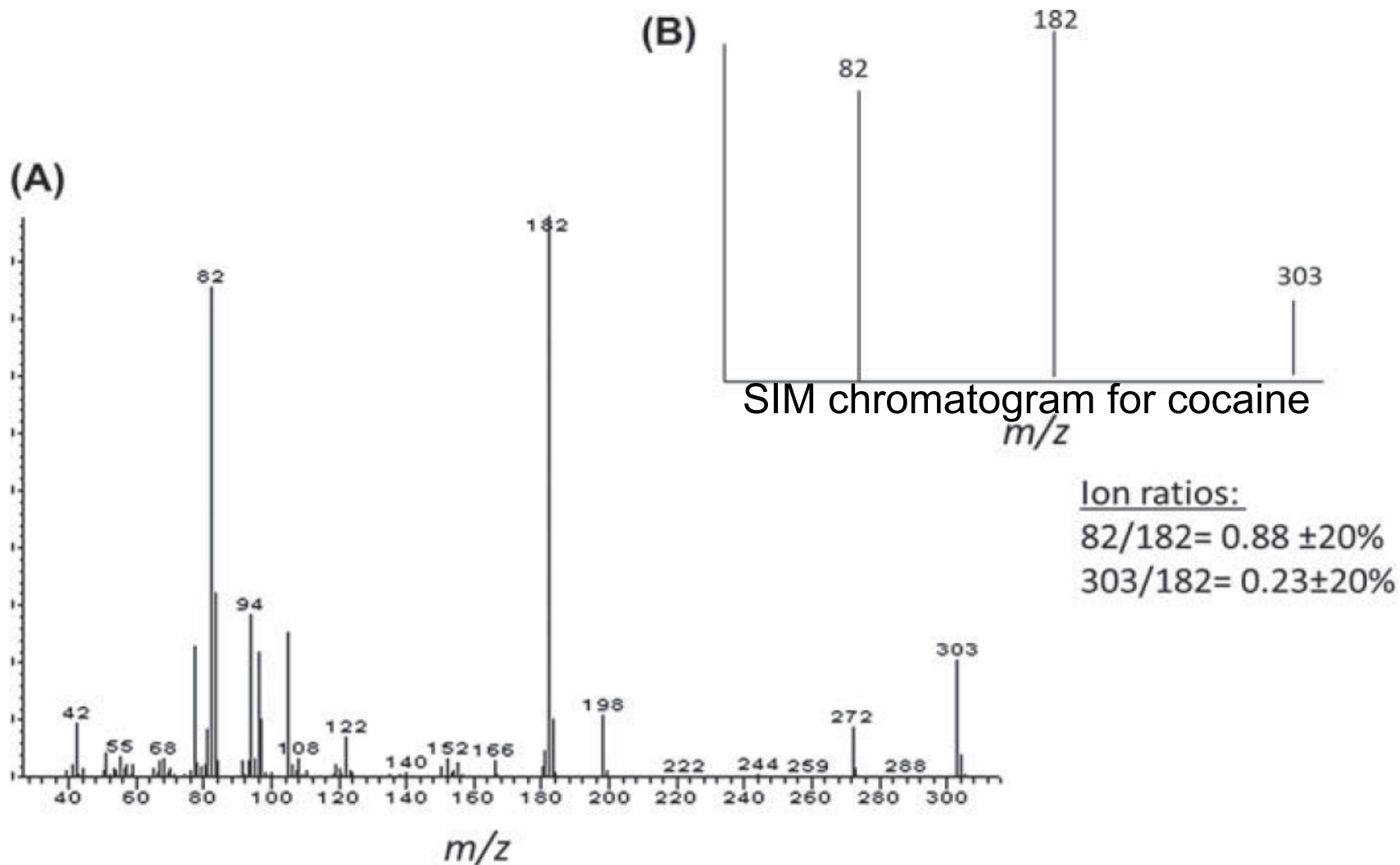
Ion Trap



Orbitrap

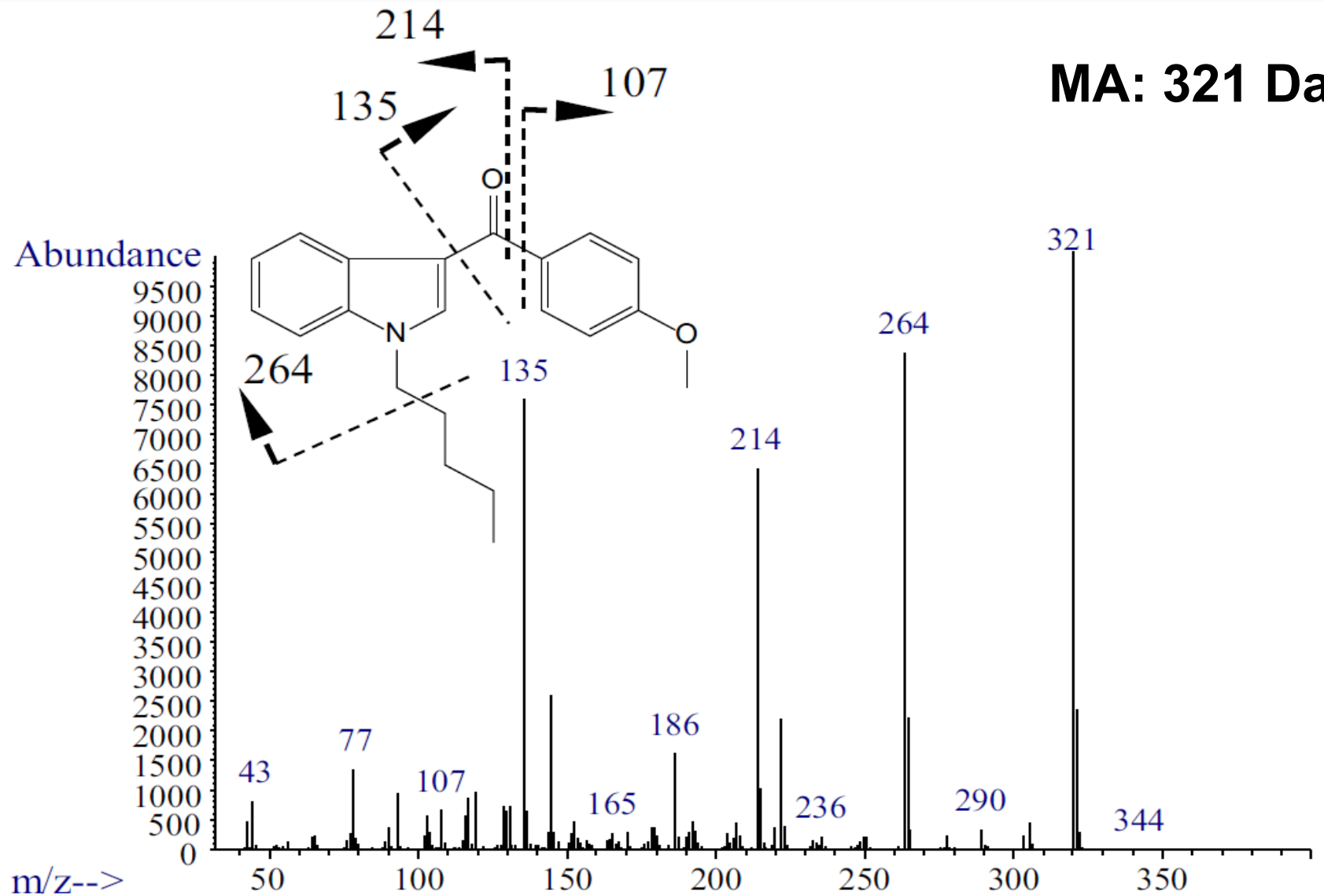


GC-MS / KOKAİN



GC-MS / RCS-4

MA: 321 Da



GC-MS AVANTAJ-DEZAVANTAJLARI

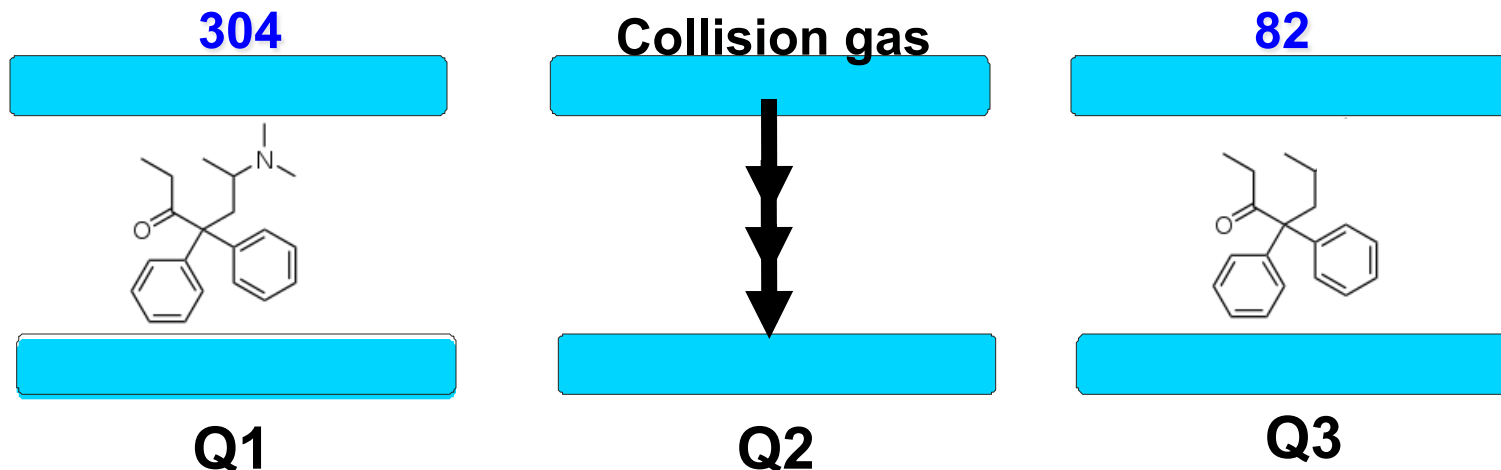
Avantajları

- IA ve HPLC-UV'den daha fazla sensitiftir.
- Yüksek tekrarlanabilirlik.
- Kütüphane.
- Headspace autosampler ile bağlantı sayesinde uçucuların analizi için idealdir.

Dezavantajları

- Uçucu olmayan, polar ve ısıya dayanıksız bileşikleri ölçemez.
- Uzun örnek hazırlama gerektirir. Çünkü separasyon olması için genellikle, maddeler ve metabolitleri az polar ve daha uçucu türevlerine dönüştürülmelidir.

LC-ESI-MRM



Compound	Molecular Weight	Prekürsör ion	Product ion	Dwell Time (msec)	Collision Energy (CE)	Retention Time
Alprazolam	308.0829	309.1	205	25	50	8.03
Amitriptyline	277.183	278.2	91	25	42	7.8
Cocaethylene	317.37	318.2	196	25	39	4.32
Cocaine	303.1471	304.1	82	25	40	3.6
Fentanyl	336.2202	337.2	188	25	43	5.18
Methadone	309.2093	310.1	265	25	35	7.56
Methamphetamine	149.1204	150.1	91	25	27	2.96
Oxycodone	315.1471	316.1	241	25	40	2.6
THC	314.2246	315.1	193	25	34	14.91

LC-MS/MS AVANTAJ-DEZAVANTAJLARI

(GC-MS ile karşılaştırma)

Avantajları

- Artmış sensitivite ve spesivite
- Minimal örnek hazırlama
- Uçucu olmayan, polar ve ısıya dayanıksız bileşikleri tespit edebilme
- Toksikoloji testlerinde yeni “gold standard” metod

Dezavantajları

- Kütüphanesinin yetersiz olması
- Metod validasyonunda matriks etkisi

YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS

Analytica Chimica Acta 927 (2016) 13–20



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

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



Review

Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices – Where do we stand today?



Markus R. Meyer ^{a,*}, Hans H. Maurer ^b

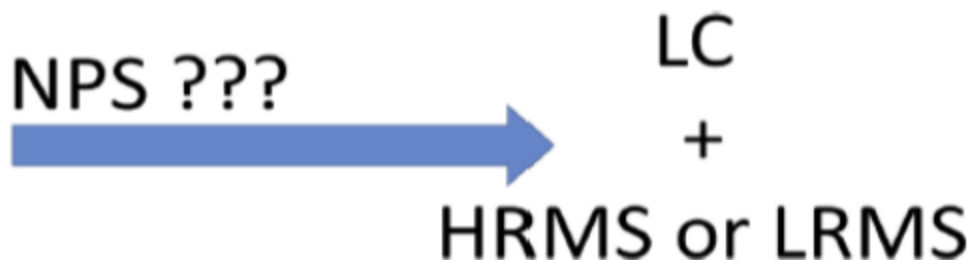
^a Department of Pharmacology and Pharmacoepidemiology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany

^b Department of Experimental and Clinical Toxicology, Saarland University, Homburg, Germany

HIGHLIGHTS

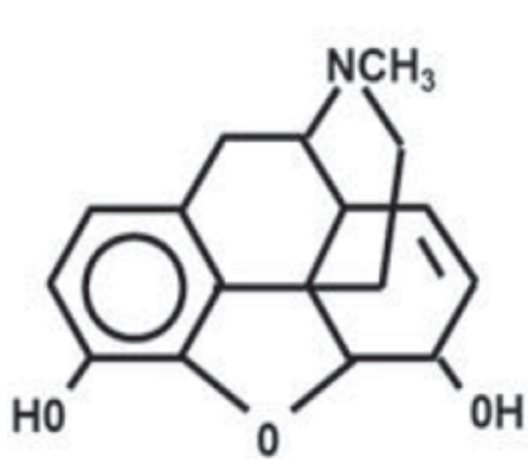
- Application of LC coupled to low- and high-resolution MS are reviewed.
- Only articles considered for new psychoactive substances screening.
- Latest developments and applications are highlighted.
- Selected papers critically discussed.

GRAPHICAL ABSTRACT

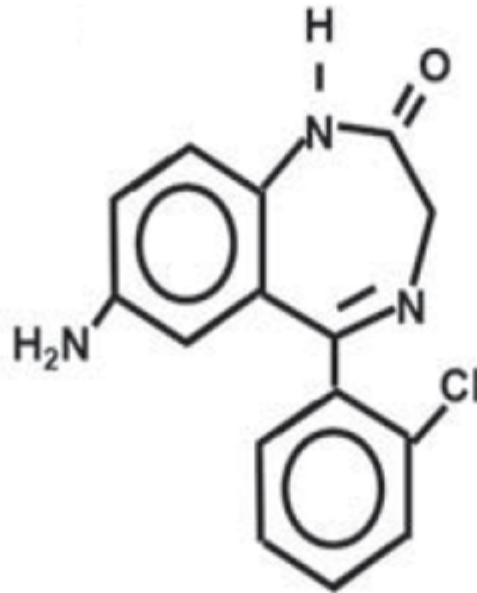


YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS

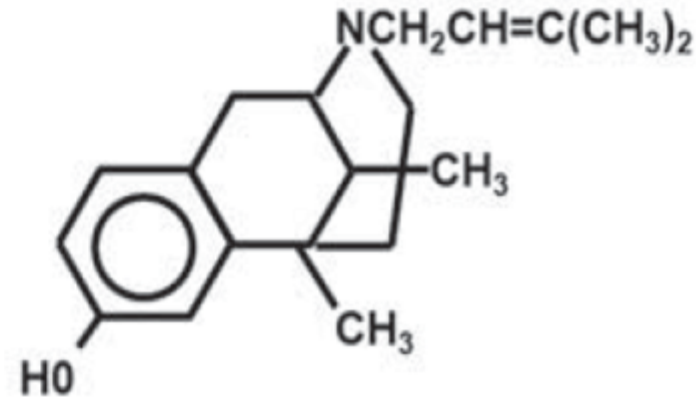
- GC-MS ve LC-MS/MS'deki kısıtlılık aynı prekürsör iyon (aynı nominal kütleli, izobarik) sahip olan bileşiklerin **kromatografik olarak ayrılması gerekliliğidir**. Aksi taktirde bu bileşikler birbirinden ayıramaz.
- Ancak LC-HR/MS aynı nominal kütleye sahip olan bileşikleri birbirinden ayırabilir. Bu nedenle matriks kaynaklı iyon sinyalinde artma ya da baskılanma olmadığı sürece bu bileşiklerin **kromatografik olarak ayrıştırılması gerekmez**.



Morfin (C₁₇H₁₉NO₃)
MA: 285.1365 Da



7-aminoklonazepam (C₁₅H₁₂ClNO₃)
MA: 285.0669 Da

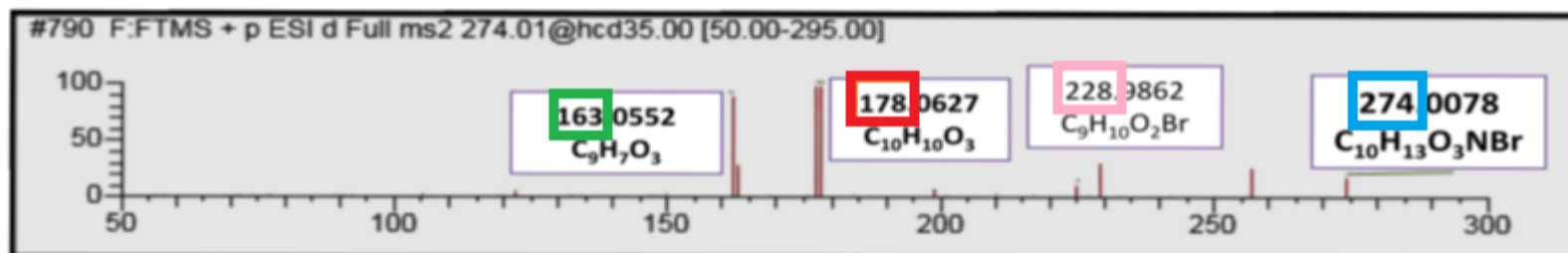
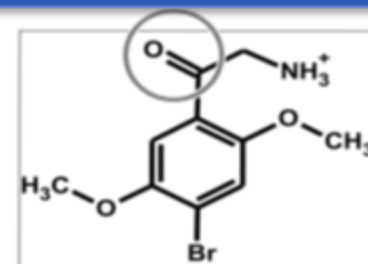
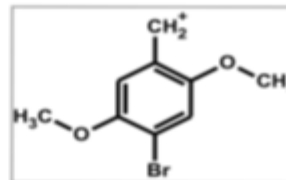
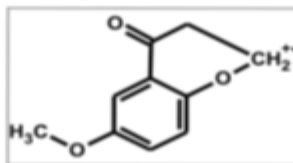
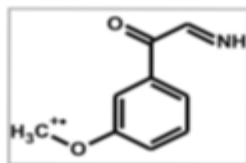


Pentazosin (C₁₉H₂₇NO)
MA: 285.2093 Da

İZOBARİK BİLEŞİKLER; HRMS

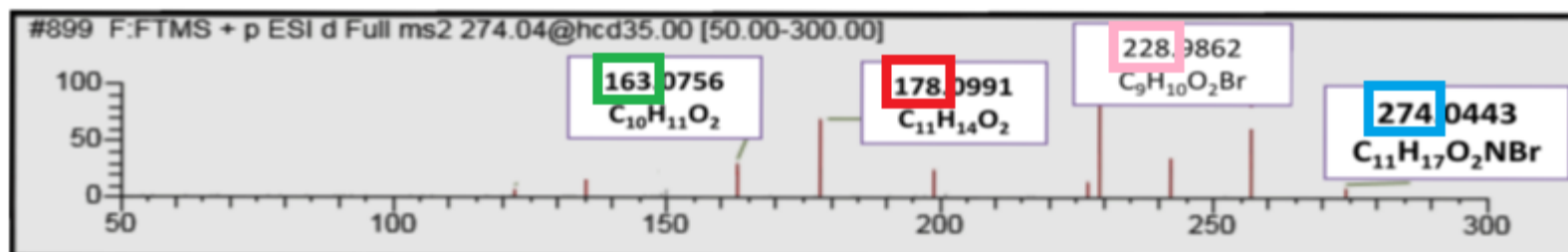
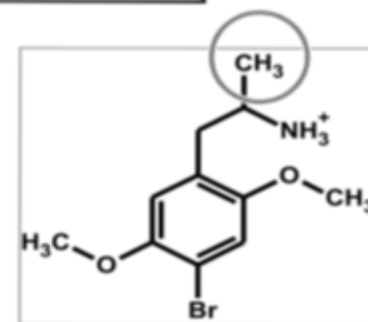
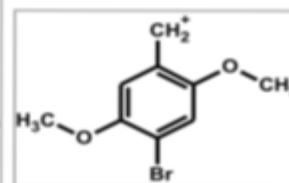
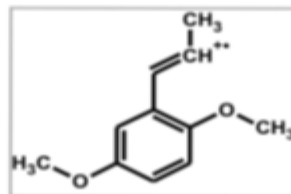
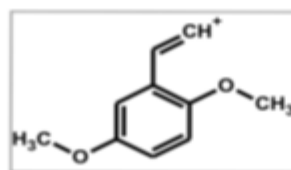
2-amino-1-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)ethanone

Beta-keto-2CB



2,5-dimethoxy-4-bromamphetamine

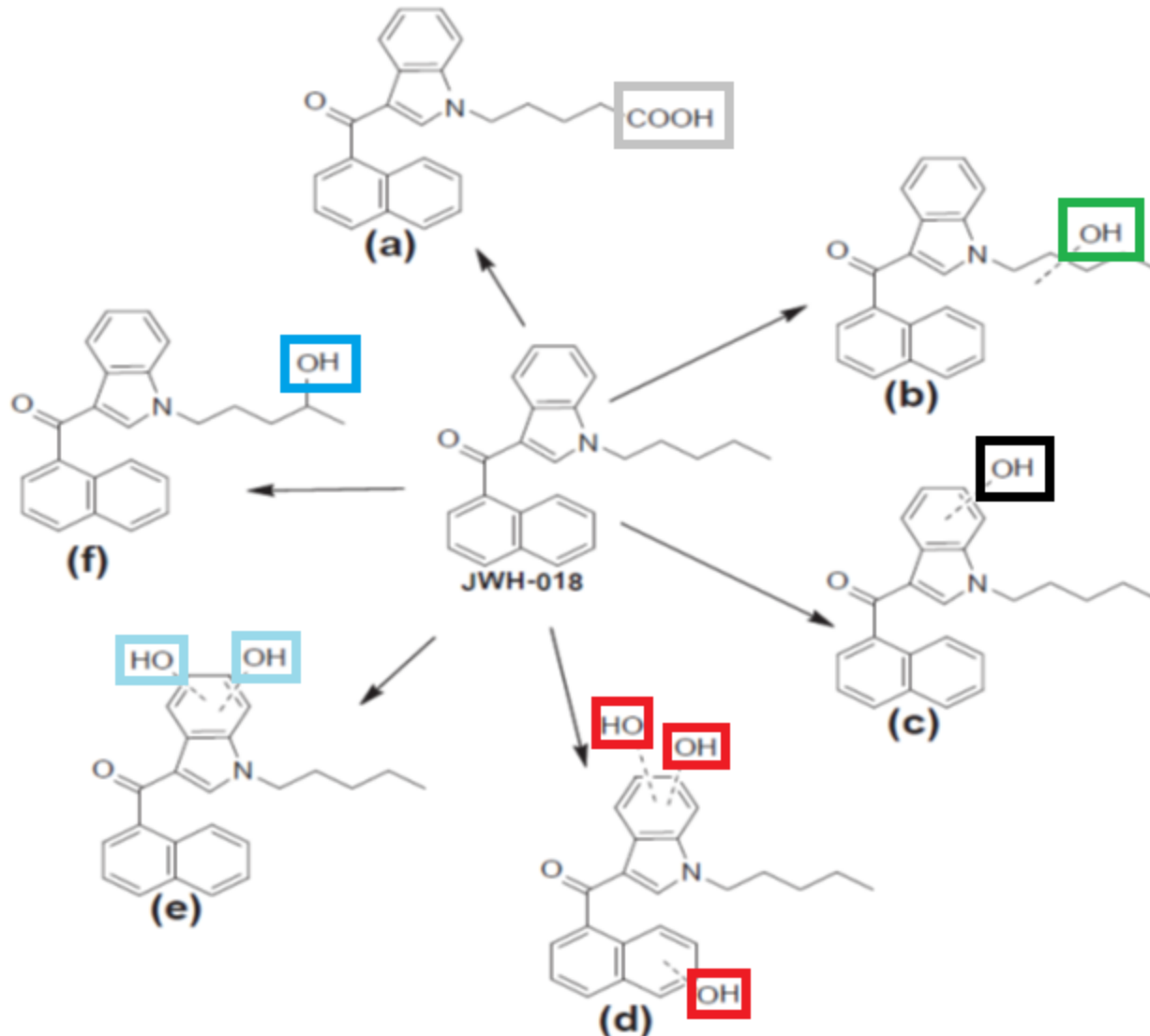
DOB



YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS'İN DEZAVANTAJLARI

- Yapısal ya da stereo izomer gibi aynı moleküler formüle sahip olan bileşikleri ayırt edemez. Bu durumda **kromatografik separasyon gerekir**.
- Kütle spektrum kütüphaneleri genellikle bir enstrümandan diğerine transfer edilemediği için **enstrümana özgü** kütüphanelerin oluşturulması gerekir.
- LC-HR/MS'in dinamik aralığı LC-MS/MS'inkisinden **daha küçüktür**. Dinamik aralık bir kütle analizörünün doğru olarak ölçebileceği en yüksek konsantrasyon demektir.
- **Pahalıdır**.

SENTETİK KANNABİNOİDLER



(a) Carboxylation at the N-alkyl chain

(b) Monohydroxylation at the N-alkyl chain

(c) Monohydroxylation at the indole moiety

(d) Trihydroxylation

(e) Dihydroxylation

(f) Monohydroxylation at N-alkyl chain

ÖZET

- *Tüm toksikolojik analizler için yeterli tek bir teknik yoktur.*
- GC-MS, LC-MS/MS ve LC-HRMS'in toksikolojik analizlerde *avantaj ve dezavantajları* vardır. Bu nedenle de *birden fazla tekniğin kombine kullanılması* gerekir.
- *GC-MS ve LC-MS/MS özellikle hedeflenmiş analizlerde* tercih edilmelidir.

ÖZET

- ***Yüksek çözünürlüklü MS'ler*** referans standartlar olmadan da fullscan MS ve MS/MS modlarında bileşiklerin doğru kütlelerini belirleyerek kütüphanede olmayan analitlerin tespitini yapabildiği için ***hedeflenmemiş taramalarda gold standarttır***. Ancak pratikteki temel sıkıntı izomerik bileşiklerin ayrımıdır.
- Yeni bileşiklerin tespiti için; numuneler öncelikle ***LC-HR/MS*** ile full-scan modda taranır.
- Sonraki basamakta ise; bu bileşiklerin kimyasal yapısını ortaya çıkaracak bilgilere ulaşabilmek için işe yarayabileceği düşünülen her bir sinyal için ***LC-MS/MS*** ile product iyonlar belirlenebilir.