



HAL
open science

Mise au point de méthodes de recherche large de xénobiotiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Tiphaine Robin

► **To cite this version:**

Tiphaine Robin. Mise au point de méthodes de recherche large de xénobiotiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2020. Français. NNT : 2020LIMO0052 . tel-03163213

HAL Id: tel-03163213

<https://theses.hal.science/tel-03163213>

Submitted on 9 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

**Service de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance du CHU de
Limoges**

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Sciences Biologiques et Santé

Présentée et soutenue par
Tiphaine Robin

Le 11 décembre 2020

**Mise au point de méthodes de recherche large de xénobiotiques par
chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en
tandem**

Thèse dirigée par Franck SAINT-MARCOUX et Souleiman EL BALKHI

JURY :

Président du jury
Pr Antoine Dupuis, CHU Poitiers, Poitiers

Rapporteurs
Pr Peggy GANDIA, CHU Purpan, Toulouse
Dr Zoubir DJERADA, CHU Reims

Examineurs
Pr Franck SAINT-MARCOUX, CHU Limoges
Dr Souleiman EL BALKHI, CHU Limoges

Invités
M. Stéphane MOREAU, Shimadzu Europa GmbH

Remerciements

Merci eux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Ces trois années de thèse m'ont amené à croiser, discuter, collaborer et travailler avec bon nombre de personnes. Chaque échange m'a apporté que ce soit d'un point de vue personnel ou professionnel. Je ne détaillerais pas ici mes remerciements mais sachez que le cœur y est sincèrement. J'espère tout simplement l'avoir fait de vive voix. Et si ce n'est pas le cas, ce n'est pas par manque d'envie mais simplement par oubli : cela a été un réel plaisir de travailler dans le service de Limoges et chez Shimadzu.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Introduction	2
Partie 1 : Spectrométrie de masse et screening, préparation automatisée des échantillons par le CLAM-2000	4
I) Spectrométrie de masse.....	4
1) Introduction.....	4
a) Définition	4
b) Principe.....	4
c) Intérêt.....	4
2) Mode d'ionisation, analyseur et détecteur choisis pour le développement du screening	4
a) Mode d'ionisation : l'Electrospray (ESI)	4
b) Type d'analyseur : quadripôle	6
c) Le détecteur	6
3) Le spectromètre de masse de type triple quadripôle	7
a) Organisation.....	7
b) Modes d'analyses en spectrométrie de masse simple.....	7
b.1) Mode scan	7
b.2) Mode Single ion monitoring (SIM).....	8
c) Principaux modes d'analyses en spectrométrie de masse en tandem	8
c.1) Product ion scan (PIS)	8
c.2) Multiple Reaction Monitoring (MRM)	9
II) Screening.....	10
1) Introduction.....	10
2) LC-DAD	11
3) GC-MS.....	11
4) LC-MS	12
5) Comparaison LC-DAD/GC-MS/LC-MS/MS	12
6) Expérience de Limoges pour le screening LC-MS	13
III) Extraction automatisée par le CLAM-2000 (Clinical Laboratory Automated sample preparation Module)	15
1) Introduction.....	15
2) Configuration	15
3) Principe général de préparation d'échantillon.....	16
Partie 2 : Travaux personnels.....	18
A) Stratégie globale	19
I) Système LC-MS/MS.....	20
II) Détermination des conditions chromatographiques et des paramètres de la source d'ionisation	20
1) Choix des conditions chromatographiques.....	20
2) Choix des paramètres de la source d'ionisation	22
III) Infusion des molécules	23
1) Méthode d'infusion développée pour le spectromètre de masse en tandem 8060	23

2) Traitement des résultats	24
IV) Choix des étalons internes.....	29
V) Détermination des temps de rétention	30
VI) Enregistrement des spectres de masse à partir des pics chromatographiques	33
VII) Création des méthodes d'acquisition	34
1) Le <i>General Unknown Screening</i> (GUS)	34
a) Principe	34
b) Méthode GUS créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060.....	34
2) Multiple Reaction Monitoring (MRM)	35
a) Principe	35
b) Méthode MRM créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060	35
1) Le MRM spectrum mode (MRM-SpM).....	35
a) Principe	35
b) Méthode MRM spectrum mode créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060	35
3) Multiple Target Screening (MTS)	36
a) Principe	36
b) Méthode MTS créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060	36
4) Comparaison aux bibliothèques de spectres de masse	36
5) Comparaison GUS / MRM / MRM-SpM / MTS	36
a) Aspects qualitatifs et quantitatifs	36
b) Spécificité.....	36
c) Sensibilité.....	37
VIII) Choix des méthodes d'extraction	37
1) Extraction par les sels QuEChERS	37
a) Méthode de référence	37
b) Kit micro-QuEChERS	40
2) Extraction automatisée : CLAM-2000.....	41
B) Résultats	41
I) Construction des librairies de spectres de masse et de transitions MRM	41
II) Méthodes développées avec une préparation manuelle d'échantillon	61
1) Evaluation de la méthode combinant GUS et MRM	61
2) Evaluation de la méthode MTS.....	66
3) Application du kit micro-QuEChERS à l'analyse de produits stupéfiants	74
III) Méthodes d'extraction automatisées	79
1) Evaluation de la méthode MRM-Spectrum mode : application à un panel de substances illicites	79
2) Evaluation de la méthode MRM-Spectrum mode : application à une méthode de screening quantitative pour un panel de 245 composés d'intérêt en toxicologie clinique...	94 118
3) Application à la quantification de l'uracile (U) et du dihydrouracile (UH ₂) dans le plasma	124
Discussion - Conclusion	133
Bibliographie	136

Table des illustrations

Figure 1 : Principe d'une ESI	5
Figure 2 : Principe d'un analyseur quadripolaire	6
Figure 3 : organisation du spectromètre de masse 8060	7
Figure 4 : mode scan.....	8
Figure 5 : mode SIM.....	8
Figure 6 : mode Product Ion Scan	8
Figure 7 : Mode Multiple Reaction Monitoring (MRM)	9
Figure 8 : pourcentage des molécules détectées par une, deux ou les trois méthodes de screening.....	13
Figure 9 : configuration générale du CLAM-2000	16
Figure 10 : Etapes de la préparation d'échantillon par le CLAM-2000	17
Figure 11 : Flux d'analyse avec le CLAM-2000	17
Figure 12 : étapes de développement de la méthode de screening	18
Figure 13 : principe d'une infusion à partir de l'ion pseudo-moléculaire	23
Figure 14 : <i>Select_Pre</i> de la clozapine	25
Figure 15 : <i>CE_Select</i> du [M+H] ⁺ de la clozapine	26
Figure 16 : <i>CE_Select</i> du [M+Na] ⁺ de la clozapine	27
Figure 17 : organigramme décisionnel du traitement des résultats de l'infusion.....	28
Figure 18 : chromatogramme de la clozapine	31
Figure 19 : chromatogramme de la chlorpromazine.....	32
Figure 20 : organigramme décisionnel du traitement des résultats des temps de rétention ..	33
Figure 21 : construction d'un spectre de masse à partir des intensités d'un pic chromatographique	33
Figure 22 : intensité des ions en fonction de leur rapport m/z	34
Figure 23 : principe de fonctionnement d'une extraction par les sels QuEChERS	39
Figure 24 : protocole d'extraction avec le kit micro-QuEChERS	40

Table des tableaux

Tableau 1 : résumé des différentes caractéristiques des méthodes de screening	12
Tableau 2 : mélange des 23 molécules de référence	21
Tableau 3 : paramètres chromatographiques retenus.....	22
Tableau 4 : paramètres du spectromètre de masse retenus	22
Tableau 5 : critères de sélection des transitions ion parent > ion fils	24
Tableau 6 : caractéristiques des 11 étalons internes retenus	30
Tableau 7 : rang des différentes transitions de la clozapine	32

Liste des abréviations

- HPLC : High Performance Liquid Chromatography
- LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem
- GC-MS : chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse
- LC-DAD : chromatographie liquide couplé à un détecteur UV à barrette de diodes
- PTP : Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance
- TR : temps de rétention
- m/z : masse sur charge
- ESI : ElectroSpraylonization
- CE : énergie de collision
- SIM : Single Ion Monitoring
- PIS : Product Ion Scan
- uma : unité de masse atomique
- TRR : temps de rétention relatif
- GUS : General Unknown Screening
- MRM : Multiple Reaction Monitoring
- MTS : Multiple Target Screening
- MRM-SpM : MRM spectrum mode
- CAO : cocaïne, amphétamines, opiacés

Introduction

Mes travaux de thèse se sont articulés autour du projet de développer des méthodes innovantes de LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) pour des applications de toxicologie clinique.

Ma thèse a été effectuée dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) unissant la société Shimadzu et le service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance (PTP) du CHU de Limoges.

La société Shimadzu est un fournisseur mondial d'instruments analytiques tels que des systèmes de chromatographie en phase liquide et en phase gazeuse, des spectromètres de masse etc. Dans le cadre de ce partenariat, un système LC-MS/MS (*LCMS 8060*) puis un préparateur d'échantillons totalement automatisé (*CLAM-2000*) ont été confiés au service PTP.

La plupart de mes travaux ont consisté à développer des méthodes de screening avec ou sans préparation automatisée des échantillons. Historiquement, un screening est une recherche sans a priori de médicaments ou de toxiques d'intérêt (xénobiotiques). Les termes « recherche large de xénobiotiques » ou « general unknown screening », ou encore de « criblage toxicologique » sont également employés.

Dans de nombreux contextes, il s'agit de la première analyse effectuée chez un patient, lorsque la nature ou la présence même de médicaments ou de toxiques est totalement inconnue (intoxication présumée d'origine médicamenteuse ou toxique, recherche des causes de la mort, analyse d'une poudre ou d'une boisson de nature inconnue...).

Le plus souvent, le screening précède la mise en œuvre d'analyses plus spécifiques. Schématiquement, le screening recherche et met en évidence des composés qui sont ensuite dosés par une méthode quantitative spécifique. Ceci augmente indubitablement le délai de rendu de résultats. Dans ce contexte, il est donc intéressant de développer une méthode de screening permettant non seulement de pouvoir identifier les composés présents dans un échantillon, mais de pouvoir également estimer si ces derniers sont présents à des concentrations thérapeutiques ou toxiques, et donc d'adapter rapidement la prise en charge du patient. Une partie de mes travaux à consister à mettre au point une telle méthode de screening.

La préparation des échantillons est une étape majeure pour une méthode de screening. Deux aspects, au moins sont importants : sa rapidité de mise en œuvre et sa capacité à extraire efficacement le panel le plus large possible de xénobiotiques. Il n'existe pas d'extraction universelle pour une méthode de screening et la littérature rapporte l'utilisation de simples dilutions des échantillons, de précipitations de protéines, d'extractions en phase solide, d'extractions liquide/liquide ou d'extractions par des sels. Si elles peuvent être efficaces une fois optimisées, toutes ces approches requièrent de multiples étapes manuelles. Quelques solutions en partie automatisées ont été proposées, mais aucune ne permettant de concrètement supprimer toute intervention humaine. C'est dans ce contexte qu'a été développé l'automate CLAM 2000 que nous avons utilisé, à la fois pour des méthodes de screening et pour une méthode de diagnostic de déficience enzymatique.

Dans une première partie, ce manuscrit propose de discuter de la place actuelle du screening en toxicologie clinique, médicolégale ou professionnelle. Quelques notions essentielles de spectrométrie de masse et notamment les modes d'acquisition spectrale les plus utiles pour les méthodes de screening y sont également abordés.

La partie consacrée à mes travaux personnels rapporte dans un premier temps la stratégie globale utilisée pour développer différentes méthodes de screening à la fois qualitatives et quantitatives ainsi que différentes méthodes d'extraction automatisées ou non. Chacune des

méthodes développées ont ensuite été évaluées afin de trouver le meilleur compromis possible pour une méthode de screening quantitative et automatisée pour des applications en toxicologie. Les résultats sont présentés dans la seconde partie de mes travaux personnels.

Partie 1 : Spectrométrie de masse et screening, préparation automatisée des échantillons par le CLAM-2000

I) Spectrométrie de masse

1) Introduction

a) Définition

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier les molécules d'intérêt en fonction de leur masse.

b) Principe

La première étape consiste à ioniser les molécules présentes dans l'échantillon à analyser. Les molécules sont ensuite séparées en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) par un analyseur avant d'arriver au détecteur.

c) Intérêt

Le spectromètre de masse est un détecteur sensible et facile à coupler à des méthodes séparatives telles que l'HPLC. L'utilisation croissante des spectromètres de masse en tandem (présence de plusieurs analyseurs) a permis de gagner en sensibilité et en spécificité.

2) Mode d'ionisation, analyseur et détecteur choisis pour le développement du screening

a) Mode d'ionisation : l'Electrospray (ESI)

A la sortie de la colonne de chromatographie, l'échantillon à analyser est conduit par un capillaire dans une aiguille d'ESI qui se situe dans la chambre d'ionisation. Une tension électrique (± 1 à ± 5 kV) est appliquée sur cette aiguille ce qui provoque une accumulation de charges dans le liquide de l'échantillon.

La tension électrique est obtenue en appliquant une forte différence de potentiel entre l'aiguille et une contre électrode (tension d'orifice). Cette différence de potentiel est positive si l'on veut étudier les ions positifs (ESI +) et négative (ESI -) si l'on veut étudier les ions négatifs.

Un gaz de nébulisation est soufflé autour du tube capillaire, vaporisant ainsi l'échantillon et générant de fines gouttelettes chargées en électricité statique de la même polarité que la tension appliquée. Sous l'action d'un gaz sec le solvant contenu dans les gouttelettes s'évapore progressivement. La densité de charges à la surface des gouttelettes augmente jusqu'à un point (appelé la limite de Rayleigh) où les forces de répulsion électrostatiques deviennent plus importantes que la tension de surface. Les gouttelettes explosent alors en

gouttelettes plus petites. Ce processus se répète jusqu'à obtenir de très fines petites gouttelettes et en fin de compte des ions sont expulsés dans la phase vapeur. Cette étape est appelée « vaporisation des ions ».

Les ions sont ensuite focalisés par un système de lentilles afin de faciliter leur entrée dans l'analyseur (1). Le principe de fonctionnement de l'ESI est schématisé dans la figure 1.

L'intérêt de l'ESI est qu'elle permet de produire des ions pseudo-moléculaires à de faibles tensions d'orifice (ex : M+H ou M-H avec M la masse de la molécule). Le fait de visualiser les ions pseudo-moléculaires est une information importante pour l'identification d'une molécule car celle-ci est intacte. A de plus fortes tensions d'orifice il devient impossible de visualiser les ions pseudo-moléculaires, la fragmentation augmentant avec la tension d'orifice.

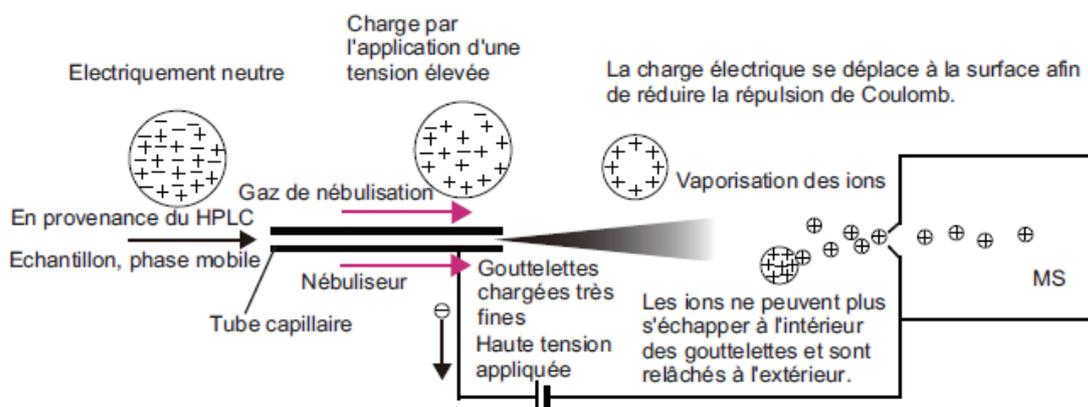


Figure 1 : Principe d'une ESI

Adduits possibles en ESI + (exemple d'une molécule de masse M 339,2) :

Proton	[M+H] ⁺	340,2	$\Delta m/z = +1$
Sodium	[M+Na] ⁺	362,2	$\Delta m/z = +23$
Potassium	[M+K] ⁺	378,2	$\Delta m/z = +39$
Ammonium	[M+NH ₄] ⁺	357,2	$\Delta m/z = +18$
Eau	[M+H+H ₂ O] ⁺	358,2	$\Delta m/z = +19$
Méthanol	[M+H+CH ₃ OH] ⁺	372,2	$\Delta m/z = +33$
Acétonitrile	[M+H+CH ₃ CN] ⁺	381,2	$\Delta m/z = +42$

Adduits possibles en ESI - (exemple d'une molécule de masse M 139.0) :

Déprotoné	[M-H] ⁻	138,0	$\Delta m/z = -1$
Formiate	[M+COO] ⁻	184,0	$\Delta m/z = +45$
Acétate	[M+CH ₃ COO] ⁻	198,0	$\Delta m/z = +59$

Des molécules ne possédant que des carbones et des protons (= molécules apolaires) vont être très difficilement ionisables par cette technique. C'est pourquoi l'ESI est surtout, théoriquement, applicable aux molécules polaires. Cependant, l'expérience montre que la

source ESI est une source universelle permettant l'ionisation d'un très large panel de molécules

b) Type d'analyseur : quadripôle

Un quadripôle est composé de quatre électrodes parallèles et cylindriques. Ces quatre électrodes sont associées électriquement deux par deux. Les électrodes opposées sont portées au même potentiel électrique tandis que les électrodes adjacentes ont un potentiel électrique opposé.

Une paire d'électrode est donc soumise au potentiel électrique Φ_0 tandis que l'autre paire est soumise au potentiel électrique $-\Phi_0$ (cf. figure 2).

Φ_0 est de la forme $U - V \cdot \cos(\omega t)$ avec :

- U la tension continue
- V la tension alternative
- ω la fréquence
- t le temps

Lorsque les ions entrent dans l'analyseur, ils sont soumis aux forces U et V qui leur communiquent une trajectoire oscillante. Ces trajectoires oscillantes obéissent aux équations de Matthieu. La résolution des équations de Matthieu montre que seuls les ions ayant une valeur de m/z comprise dans un certain intervalle possèdent une trajectoire stable. Ils peuvent donc traverser l'analyseur et arriver au détecteur pendant que les autres ions entrent en collision avec les électrodes ou sortent du système. En faisant varier les tensions U et V, cet intervalle de valeur varie aussi (1).

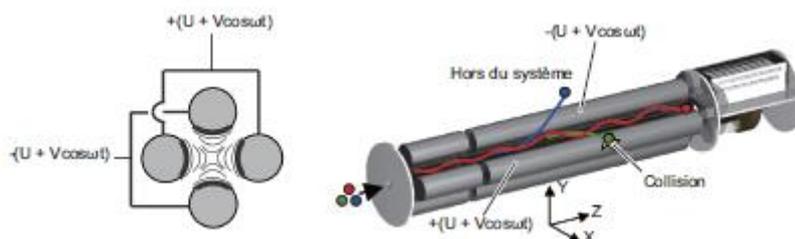


Figure 2 : Principe d'un analyseur quadripolaire

Très schématiquement, le quadripôle peut être utilisé de deux manières différentes. Soit on balaye les tensions U et V de 0 aux valeurs maximales pour trier les ions par ordre croissant des valeurs m/z ; cette approche est utilisée pour des applications qualitatives de type full scan (spectre complet). Soit on règle ses tensions de manière à ne laisser passer qu'un seul ion (= mode SIM) ; cette dernière approche est utilisée en application quantitative.

c) Le détecteur

Le détecteur se compose d'une dynode de conversion et d'un multiplicateur d'électrons.

Les ions qui ont traversé le quadripôle entrent en collision avec l'électrode de la dynode de conversion. Cette collision libère des électrons qui sont ensuite amplifiés par le multiplicateur d'électrons, puis qui sont comptés. Le signal ionique est alors converti en signal électrique.

Les résultats sont représentés sous forme d'un spectre de masse représentant l'intensité des ions formés en fonction de leur rapport m/z (1).

3) Le spectromètre de masse de type triple quadripôle

a) Organisation

Le spectromètre de masse en tandem utilisé pour nos travaux est de type triple quadripôle. Son organisation est représentée dans la figure 3 ci-dessous :

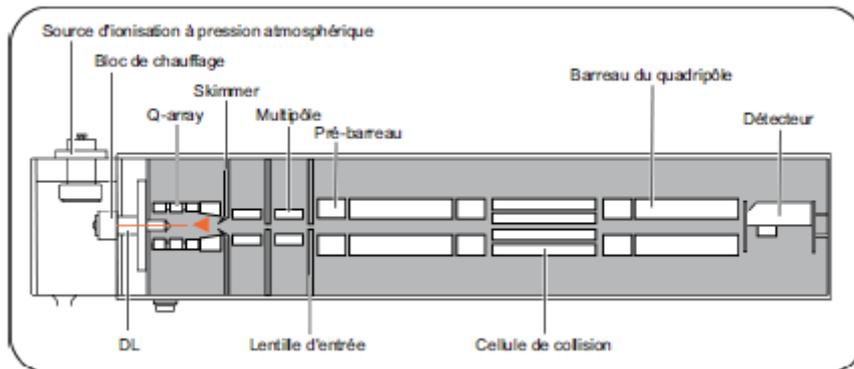


Figure 3 : organisation du spectromètre de masse 8060

Un triple quadripôle résulte de l'association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision. La cellule de collision est aussi un quadripôle. Cette organisation permet de travailler en spectrométrie de masse simple MS ou en tandem MS/MS (1).

En spectrométrie de masse simple, les ions produits dans la source sont « seulement » séparés par le premier analyseur (Q1) avant d'arriver au détecteur. Ils ne sont pas fragmentés.

La spectrométrie de masse en tandem consiste à sélectionner des ions en Q1. Ces ions sont appelés ions précurseurs. Ils entrent en collision avec un gaz inerte dans la cellule de collision afin de générer des ions fragments. Concrètement, ils « percutent » le gaz avec une certaine énergie de collision (CE) qu'on peut faire varier selon les besoins. L'analyse des ions fragments dans le troisième quadripôle (Q3) permet d'obtenir, par filiation, des informations sur la structure des ions précurseurs.

En fonction des informations recherchées, les quadripôles peuvent donc être réglés selon différents modes d'analyses.

b) Modes d'analyses en spectrométrie de masse simple

b.1) Mode scan

Dans ce mode d'acquisition, un balayage d'une plage de masse est réalisé à intervalles de temps fixes (ex : balayage de m/z 100 à 600 toutes les 1s). Le quadripôle ne joue pas à proprement parler un rôle de filtre : il « laisse passer » tous les ions produits dans la source compris dans la plage de mesure. On analyse donc un ensemble de rapports m/z comme illustré sur la figure 4. Cette approche est principalement utilisée pour l'analyse qualitative.

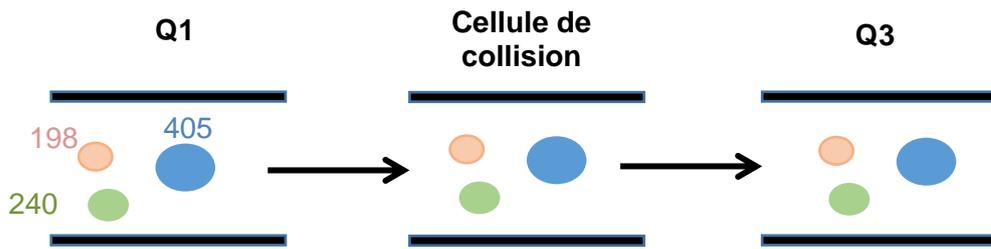


Figure 4 : mode scan

b.2) Mode Single ion monitoring (SIM)

Les tensions U et V sont réglées de manière à ne laisser passer qu'un seul rapport m/z comme illustré sur la figure 5. En comparaison avec le mode scan, le mode SIM permet une analyse à sensibilité élevée sans perte de temps due à la détection d'ions ayant des masses non requises. Le mode SIM est donc généralement utilisé pour des approches quantitatives.

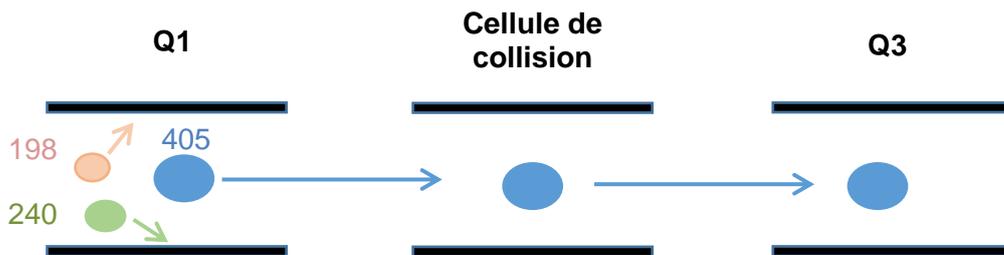


Figure 5 : mode SIM

c) Principaux modes d'analyses en spectrométrie de masse en tandem

c.1) Product ion scan (PIS)

Ce mode consiste à sélectionner un ion spécifique dans le premier quadripôle (= mode SIM) puis à le fractionner dans la cellule de collision. Les ions fils sont ensuite analysés dans le 3^{ème} quadripôle en mode scan comme illustré dans la figure 6.

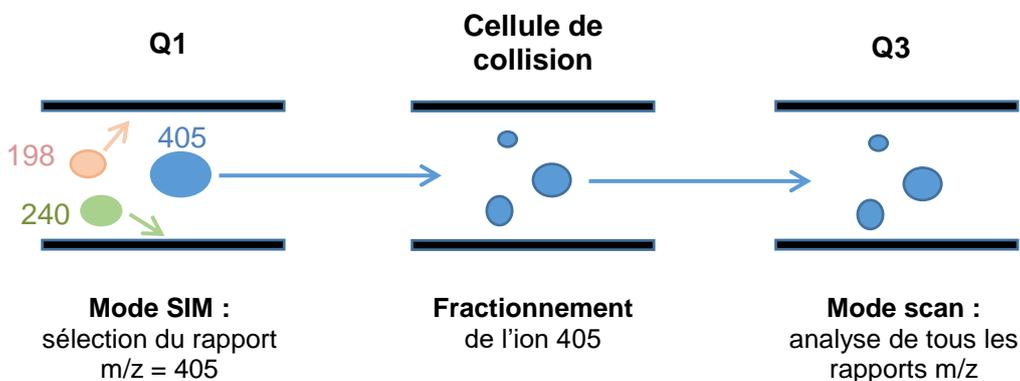


Figure 6 : mode Product Ion Scan

c.2) Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Ce mode consiste à sélectionner un ion spécifique en Q1 (=mode SIM) puis à le fragmenter dans la cellule de collision. Un seul ion fils est analysé en Q3. Son principe est schématisé dans la figure 7. Etant donné la double sélection en Q1 et Q3 ce mode est particulièrement adapté à une analyse quantitative.

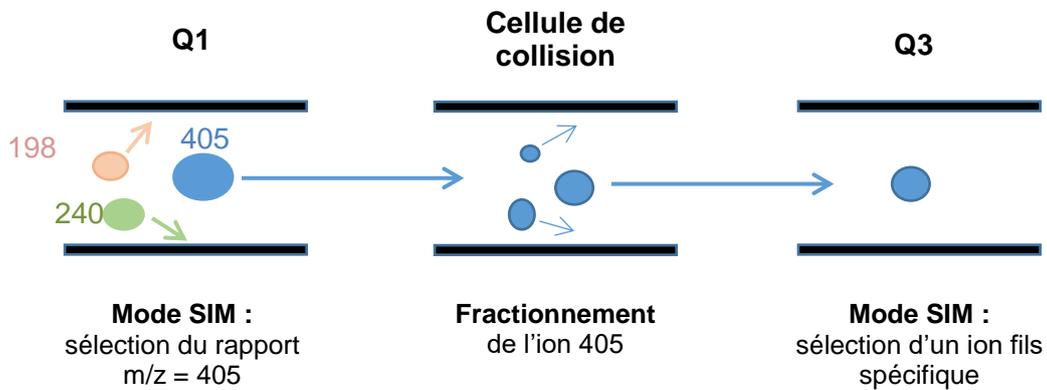


Figure 7 : Mode Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Lors du développement et de la mise en œuvre de méthodes de screening, ces modes d'analyses peuvent être combinés de différentes manières, créant ainsi différentes méthodes d'acquisition. Afin d'en faciliter la compréhension et de mieux les illustrer, les méthodes d'acquisition que nous avons développées sont présentées en détail dans les travaux personnels.

II) Screening

1) Introduction

Le procès de Marie Blandy à Oxford en Mars 1752 pour l'assassinat de son père est le premier usage déclaré de tests chimiques pour détecter un poison, en l'occurrence, l'arsenic, dans un procès criminel. Depuis cette époque, l'importance des tests chimiques pour confirmer une suspicion d'intoxication a été évidente. D'abord peu spécifiques (identification basée sur l'odorat, etc...), ces tests se sont développés de manière fulgurante.

Par exemple, Marsh a été le premier à développer un test spécifique pour détecter l'arsenic basé sur une réaction chimique. Des méthodes spectrophotométriques sont apparues permettant de doser le monoxyde de carbone ou l'éthanol, puis des méthodes colorimétriques pour mettre en évidence les barbituriques. Et ainsi de suite.

Si ces tests peuvent être très utiles dans un cadre médico-légal (recherche des causes de la mort, suspicion d'une soumission chimique...), ils le sont aussi dans les cas d'urgence toxicologique. Lors d'une suspicion d'intoxication et notamment lorsqu'un patient est inconscient, il est primordial d'identifier le plus rapidement possible le toxique mis en cause afin de mettre en place le traitement le plus adapté.

Actuellement, il existe des méthodes de dépistage permettant une orientation de diagnostic rapide : colorimétrie (carbamates, paraquat), photométrie (lithium) et enzymatique (éthanol, cholinestérases,...). Leur principal défaut est leur manque de spécificité.

Il existe également des techniques immunochimiques permettant un diagnostic de classe (benzodiazépines, antidépresseurs tricycliques,...), voire de quantifier des médicaments à risque toxique important (paracétamol, digoxine, méthotrexate,...) (2).

A ces méthodes viennent s'ajouter les approches chromatographiques (GC et LC), associées à des détecteurs UV à barrette de diodes ou à la spectrométrie de masse, permettant de rechercher et quantifier tel ou tel composé toxique.

Pour compléter ces méthodes, il est important de disposer d'autres techniques sensibles et spécifiques, recherchant le plus grand nombre possible de toxiques de manière ciblée ou non ciblée, afin d'être le plus exhaustif possible. Les méthodes de screening (ou criblage toxicologique) ont été créées de manière à répondre à ces critères.

Elles ont été tout d'abord développées en chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diode (LC-DAD) et en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) dans les années 1970-80. La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse simple ou en tandem (LC-MS/MS) est apparue un peu plus tardivement, dans les années 1990.

2) LC-DAD

Les détecteurs à barrette de diodes permettent l'acquisition de spectres ultraviolets (UV) et visibles (sur plusieurs longueurs d'ondes à la fois) au cours du processus chromatographique. Un temps de rétention et un spectre UV spécifiques sont obtenus pour chaque molécule et permettent l'identification de cette dernière (par comparaison des résultats obtenus avec une bibliothèque de référence) (3). La combinaison de ces deux paramètres a permis à l'époque d'augmenter de manière notable la fiabilité des méthodes HPLC.

Ces détecteurs permettent une analyse rapide et la préparation des échantillons est simple. Par rapport à la GC-MS développé à la même époque, le prix de la LC-DAD n'était pas excessif et était donc plus accessible.

Les principales faiblesses de la LC-DAD sont : (i) beaucoup de molécules absorbent peu ou pas dans l'UV ; (ii) beaucoup de molécules peuvent présenter un spectre peu spécifique (maximum d'absorption à 210 nm) ; (iii) des molécules peuvent avoir des spectres UV et des temps de rétention proches, notamment au sein d'une même famille. La LC-DAD est donc une méthode qui peut manquer de spécificité et d'universalité.

La co-élution de deux (ou plus) composés peut être également une source d'erreur. Les interférences entre les deux composés peuvent mimer le spectre UV d'un composé connu ou être à l'origine d'un spectre UV sans aucune correspondance dans la bibliothèque de référence. Avant d'effectuer la recherche en librairie, il est donc primordial de vérifier la pureté du pic d'intérêt afin d'éviter toute conclusion erronée (4).

Il existe une variabilité inter-système pour les détecteurs à barrette de diodes c'est-à-dire qu'une bibliothèque créée sur un système ne peut pas directement être transposée à un autre. Logiquement, il est donc nécessaire pour chaque utilisateur de développer sa propre bibliothèque de référence (5).

3) GC-MS

Le couplage de la GC avec un spectromètre de masse permet d'obtenir un temps de rétention et un spectre de masse pour chaque molécule. Ces informations sont utilisées pour l'identification, comme en LC-DAD. Les spectres de masse obtenus sont très riches en information et donc, théoriquement, très spécifiques pour chaque molécule. Surtout, le type d'ionisation utilisé (impact électronique) produit des spectres extrêmement reproductibles. Les bibliothèques de référence peuvent donc être transposées d'un appareil à un autre. Ainsi, il existe quelques bibliothèques comprenant des milliers de spectres, vendues à travers le monde (Maurer, Pflieger...). Dans les années 1990, la CG-MS est rapidement devenue la technique de référence (ou *gold standard*) en matière de screening, devant la LC-DAD.

En GC, les composés sont soumis à des températures importantes afin de permettre leur évaporation et leur entraînement par la phase gazeuse. La limite majeure de la GC donc d'être principalement adaptée aux composés volatiles (généralement molécules < 500 Da), non thermosensibles et plutôt apolaires.

Il est toutefois possible de dériver certaines molécules (méthylation, acétylation,...) afin d'abaisser leurs points d'ébullition et de les rendre plus volatiles. Cependant cette technique est consommatrice de temps (et d'argent !) et nécessite du personnel qualifié. La présence des composés dérivés et des nombreux artefacts inhérents à la technique peut compliquer

l'identification des composés. Bien entendu, les problèmes de co-élution de composés sont également présents (6).

4) LC-MS

La LC-MS s'est développée dans les années 1990, lorsque de nouveaux types d'ionisation en spectrométrie de masse ont été commercialisés : l'ESI (Electrospray) et l'APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Ces nouvelles techniques ont permis d'augmenter la sensibilité de la LC jusqu'à égaler celle de la GC (7). Puis, l'utilisation de la spectrométrie de masse, cette fois-ci « en tandem », a permis d'augmenter la richesse des informations (ex : obtention de transitions ion parent > ion fils) et donc d'augmenter la spécificité.

Le principal objectif de l'association de LC avec un spectromètre de masse simple, puis en tandem, a été de pouvoir détecter des composés non analysables jusqu'alors par GC-MS. Il est cependant rapidement apparu qu'elle permettait de détecter un très large panel de molécules que ce soit en termes de polarité, de poids moléculaire ou de stabilité thermique. La préparation des échantillons ne nécessite pas de techniques de dérivation et se montre donc plus simple et plus rapide qu'en GC-MS. Le temps d'analyse est également plus court (8).

Cependant, pour les premières générations d'appareils, il est apparu que la fragmentation obtenue en LC-MS/MS était bien moins reproductible qu'en GC-MS. ; celle-ci variant de manière non négligeable entre deux instruments notamment pour l'abondance relative des ions (9). D'autre part, un composé présent dans l'échantillon peut diminuer l'efficacité de l'ionisation vis-à-vis d'autres composés. Les termes « effet de matrice » ou « suppression ionique » sont employés pour qualifier cet événement. Ce dernier peut grandement perturber les analyses et doit obligatoirement être évalué lors de l'étape de validation (10).

5) Comparaison LC-DAD/GC-MS/LC-MS/MS

	LC-DAD	GC-MS	LC-MS/MS
Molécules détectées	Absorbant dans l'UV	Généralement < 500 Da, modérément ou totalement apolaire	Large gamme de molécules (polarité, masses moléculaire)
Reproductible	Non	Oui	Non
Préparation des échantillons	Simple	Contraignante (dérivation)	Simple
Spécificité	+	++	++

Tableau 1 : résumé des différentes caractéristiques des méthodes de screening

Chaque méthode de screening a ses avantages et ses inconvénients (voir tableau 1) et il est possible qu'une famille de molécules ne soit détectée que par une seule de ces méthodes.

A titre d'exemple, le travail de Saint-Marcoux et al. (11) (cf. figure 16) illustre ce cas de figure : 51 échantillons de sérum ont été analysés par les trois techniques de screening. Sur 80 molécules, 8,3 % n'étaient détectées qu'en LC-MS, 9,5 % en HPLC-DAD et 8,3 % en GC-MS.

Pour améliorer la recherche en bibliothèque, une fonction dite « Enhance » a été développée pour ce screening. Cet algorithme consistait à extraire du bruit de fond des signaux pouvant passer inaperçus en considérant qu'un signal devait être considéré si et seulement si 3 ions voyaient leurs intensités changer concomitamment.

Par la suite plusieurs méthodes ont été développées avec un système LC-MS/MS de type triple quadripôle avec une trappe à ions. Sauvage et al. (13) ont développé une méthode reposant sur une extraction en phase solide avec des cartouches Oasis HLB (Waters), une séparation à l'aide d'une colonne XTerra MS C18, 3,5 μm (100x2,1 mm) (Waters), et un couplage à un API QTRAP (Sciex). Le principe était de réaliser un full scan (100 à 1100 uma), puis de sélectionner les 3 ions les plus intenses et de les fragmenter à plusieurs énergies de collision : une faible (15V) pour visualiser l'ion pseudo-moléculaire, une moyenne (40 V) et une forte (60 V) pour visualiser les différents ions fils de la molécule analysée. Cet enchaînement d'évènements était d'abord réalisé en mode positif, puis en mode négatif. L'ensemble des ions fils formés aux 3 énergies de collision étaient accumulés au niveau de la trappe à ion. Lorsque celle-ci se vidait l'ensemble des ions étaient détectés simultanément afin de tracer un spectre de masse représentant l'ion pseudo-moléculaire et l'ensemble des ions fils. Une bibliothèque d'environ 1000 spectres en mode positif et 250 spectres en mode négatif a été construite sur ce principe.

Dulaurent et al. (14). ont développé une méthode de screening dédiée à la recherche de pesticides et de leurs métabolites dans les milieux biologiques. Cette approche était très novatrice à l'époque. Elle reposait sur une extraction en phase solide avec des cartouches Oasis HLB, MAX et WAX (Waters), une séparation à l'aide d'une colonne Inertsil ODS3 C18, 3 μm (100x1 mm) (Waters) et un couplage à système LTQ (Thermo Fischer). Le principe était de réaliser un full scan (MS) de 100 à 1100 uma. L'ion le plus intense était sélectionné puis fragmenté à une énergie de collision de 35V pour obtenir un spectre MS². L'ion le plus intense de ce spectre MS² était ensuite sélectionné, puis fragmenté à son tour à 35V pour obtenir un spectre MS³. Ce mode de scan (MS/MS²/MS³) était effectué en mode positif puis en mode négatif. Le fait de réaliser un spectre MS³ permettait d'augmenter le niveau de confiance dans l'identification d'un composé. En effet, il est possible que deux molécules différentes possèdent les mêmes spectres MS et MS², mais il est rare qu'elles possèdent également le même spectre MS³. Une bibliothèque de 450 spectres MS² et 430 spectres MS³ a été construite à l'époque.

Un des avantages de ces méthodes est qu'elles utilisaient l'IDA (Information Data Acquisition). Dans ce procédé, le déclenchement de la fragmentation des ions parents dépendait de leur détection à un certain seuil (pic le plus abondant dit « pic de base ») lors du full scan MS. Le fait de fixer ces contraintes permettait d'éviter de sélectionner des ions provenant du bruit de fond et donc d'éviter « d'occuper » le système avec des ions sans réelle importance.

L'exclusion dynamique est un autre processus qui permettait d'améliorer les performances d'acquisition. Ce mode excluait un ion parent une fois celui-ci fragmenté, permettant ainsi au système de se focaliser sur le second ion le plus abondant lors du cycle suivant, et ainsi de suite. Ceci permettait d'éviter de masquer un ion de faible intensité par un ion de trop forte intensité.

L'ensemble des méthodes décrites ci-dessus sont des méthodes de screening non ciblés ou general unknown screening (GUS) : les molécules sont recherchées sans a priori, sur la base d'un spectre de masse acquis ou reconstruit. A la même époque, des méthodes de screening ciblés se sont développés : multi-target screening (MTS) et multiple reaction monitoring (MRM). Des détails sur le principe des méthodes d'acquisition « GUS », « MTS » et « MRM » sont donnés au paragraphe VII de la partie 2.

III) Extraction automatisée par le CLAM-2000 (Clinical Laboratory Automated sample preparation Module)

Le CLAM-2000 est un module de préparation d'échantillon automatisé directement connecté au système LC-MS/MS.

1) Introduction

Les matrices biologiques telles que le plasma ou l'urine contiennent des composés endogènes (protéines, phospholipides,...) qui peuvent être à l'origine d'interférences ou d'effets matrices vis-à-vis du composé à analyser. Traditionnellement, ces composés sont éliminés en utilisant des techniques d'extraction telles que la précipitation des protéines (*protein precipitation*, PP), l'extraction en phase solide (*solide phase extraction*, SPE) ou l'extraction liquide-liquide (*liquid/liquid extraction*, LLE). Quelle que soit l'approche, de multiples étapes manuelles sont nécessaires, tels que le marquage de tubes secondaires, l'aliquotage des échantillons, le pipetage des différents réactifs, le transfert dans des vials de LC-MS,... Ceci rend la préparation d'échantillon fastidieuse, consommatrice en temps, en personnels et en argent.

Intuitivement, on comprend que le progrès viendrait de l'automatisation du procédé. Diminuer les étapes manuelles permettrait d'augmenter le débit d'analyse tout en diminuant l'exposition aux solvants d'extraction et aux risques qu'ils comportent. De plus, toutes ces interventions humaines peuvent être sources d'erreurs. Ainsi, l'automatisation a également pour but d'augmenter la fiabilité des résultats en réduisant l'incidence des erreurs de préparation et en augmentant la répétabilité, reproductibilité et la robustesse de l'extraction.

Les procédures d'extraction les plus récentes impliquant des étapes automatisées ont été revue en détail par Vogeser and Kirchhoff (15), Zheng et al (16), Prabhu (17) et Wei (18). Les méthodes d'extraction automatisée « off-line » offrent une infinité de possibilité mais ne sont pas, par définition, 100% automatisée puisqu'elles nécessitent toujours une étape manuelle de transfert des extraits dans le système LC. De nombreuses méthodes d'extraction « on-line » sont utilisées telles que la SPE ou la chromatographie en flux turbulent. Celles-ci permettent des analyses à très haut débit mais nécessite des systèmes complexes, peu flexibles qui sont généralement dédiés à une seule analyse.

Dans ce contexte, Shimadzu a développé un système de préparation d'échantillon automatisé directement connecté à la chaîne HPLC. Une partie de mes travaux a donc consisté à développer des procédés entièrement automatisés à l'aide du CLAM-2000.

2) Configuration

Brièvement, le CLAM-2000 se compose d'un module de stockage de filtres, d'un rack pour les d'échantillons et d'un rack pour les réactifs. Il contient également une unité de mélange, de filtration et de chauffage. La configuration générale est représentée dans la figure 9 ci-dessous.

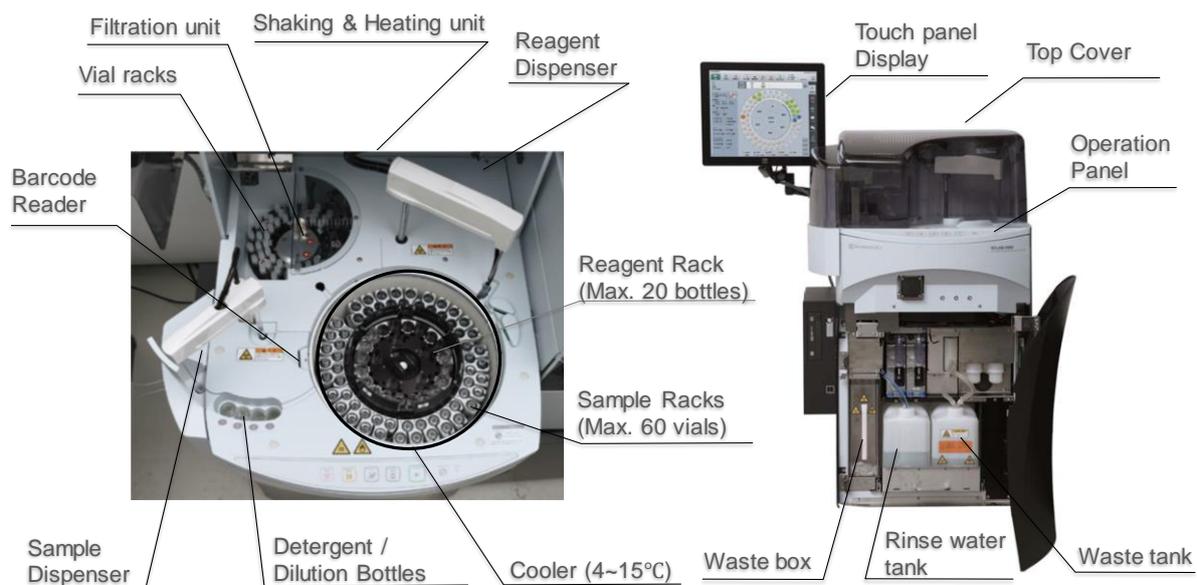


Figure 9 : configuration générale du CLAM-2000

3) Principe général de préparation d'échantillon

La préparation d'échantillon avec le CLAM-2000 est basée sur un système de mélange/filtration. Elle consiste à ajouter sur un filtre de polytetrafluoroethylene (PTFE) l'échantillon et un solvant organique de précipitation. Après un temps de mélange suffisant, le mélange est filtré par l'application d'un vide. L'extrait est collecté dans un vial avant d'être automatiquement transféré dans l'*autosampler* de la LC pour injection. Des options de chauffage de l'échantillon et de dilution de l'extrait, avant et après filtration, sont également disponibles. Le principe général de la préparation d'échantillon est résumé dans la figure 10 ci-après.

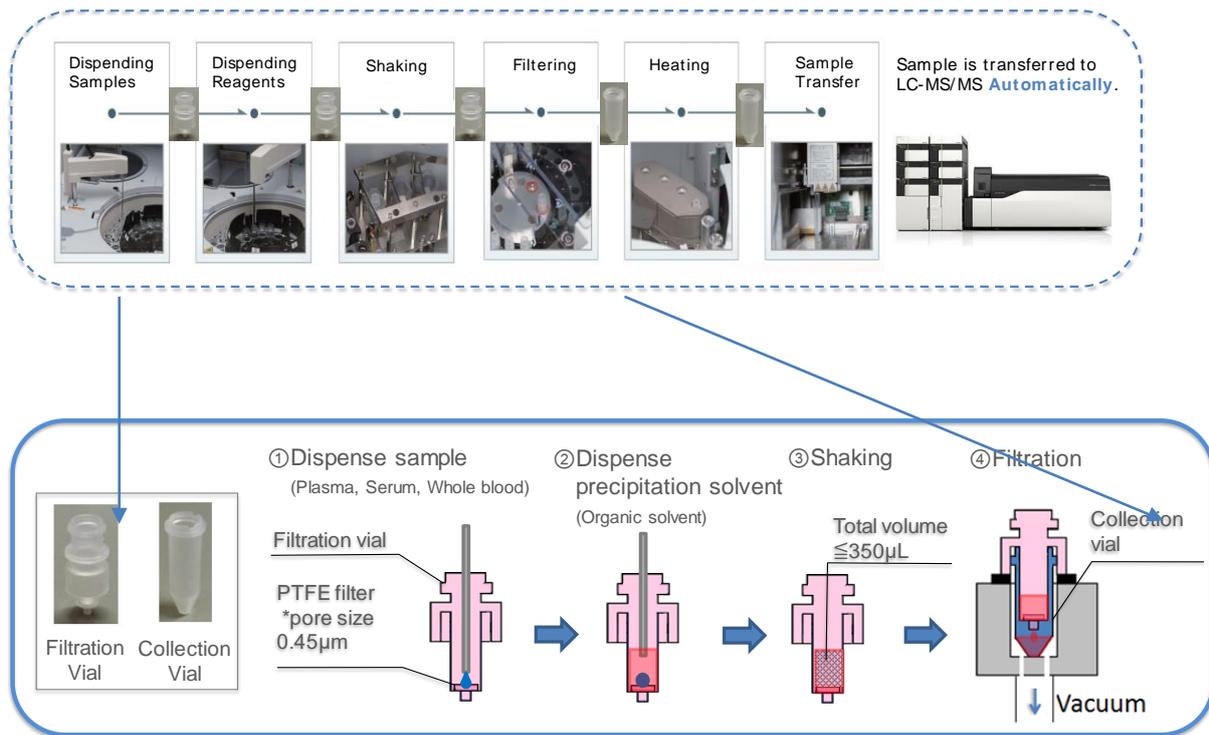


Figure 10 : Etapes de la préparation d'échantillon par le CLAM-2000

Pendant l'analyse d'un échantillon, le CLAM-2000 prépare en parallèle l'échantillon suivant. Il n'y a donc pas de temps d'attente entre l'analyse de deux échantillons (après que le premier ait été extrait) ce qui permet d'augmenter le débit d'analyse. La figure 11 représente un exemple de flux d'analyse.

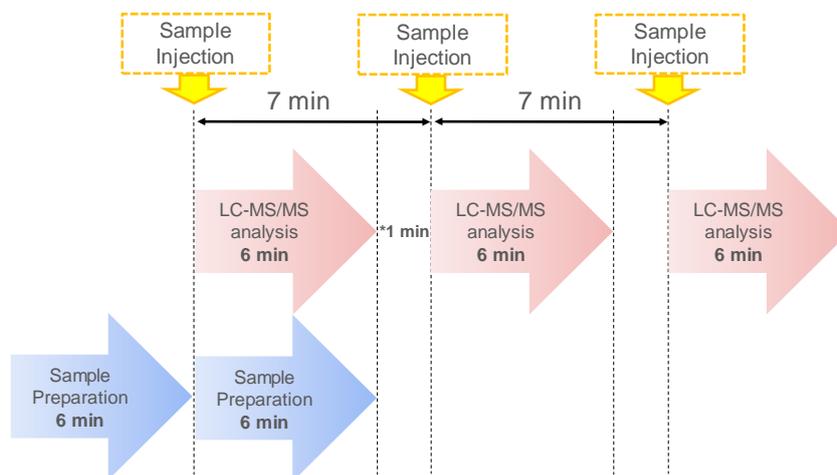


Figure 11 : Flux d'analyse avec le CLAM-2000

Partie 2 : Travaux personnels

Chronologiquement, mes travaux ont consisté dans un premier temps à développer une méthode de screening applicable sur le spectromètre de masse en tandem, modèle 8060.

Les différentes étapes du développement de ce screening sont résumées dans la figure 12 ci-dessous.

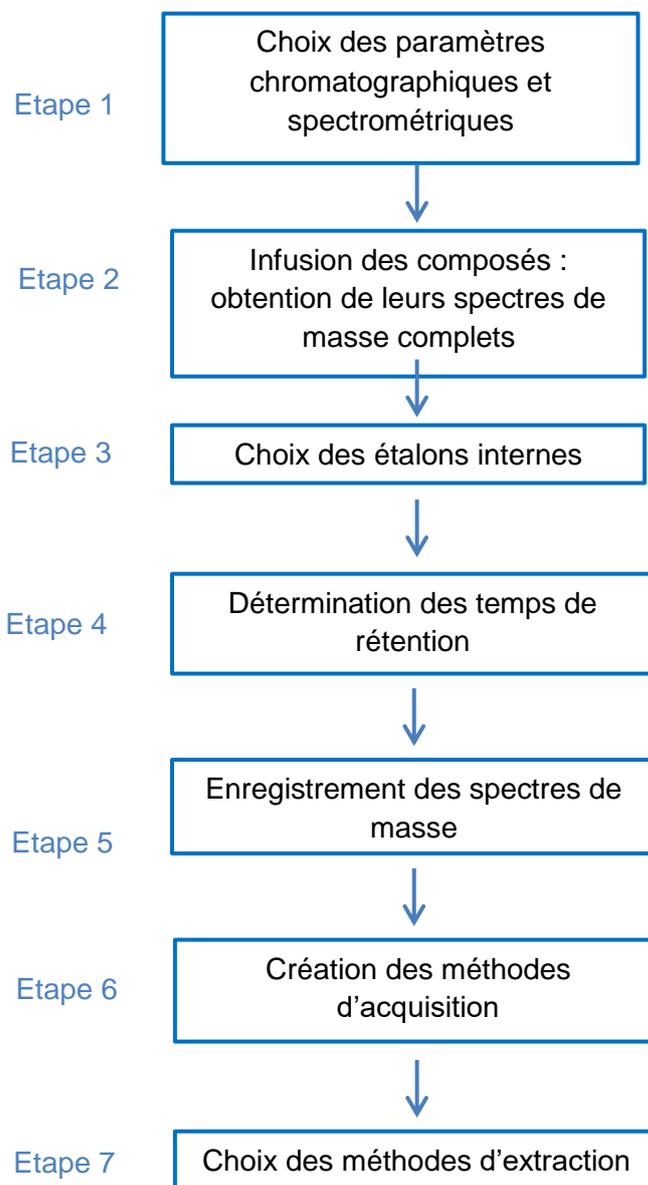


Figure 12 : étapes de développement de la méthode de screening

A) Stratégie globale

Le travail s'est appuyé, dans une phase préliminaire, sur un **mélange de référence de 23 molécules présentant des caractéristiques très diverses**.

Ces molécules ont été choisies pour couvrir le plus largement possible la gamme de polarité-apolarité. Le but a été de déterminer les paramètres chromatographiques permettant la séparation de ces 23 molécules ; le pari étant fait que si ces conditions étaient capables d'éluer ce panel de composés, elles pourraient être capables d'éluer les centaines de composés que nous devons à terme inclure dans nos méthodes.

Ces 23 molécules devaient également permettre de déterminer les paramètres d'acquisition spectrale. Ainsi, le choix ne s'est pas limité à la nature polaire ou apolaire des molécules. Nous nous sommes efforcés d'inclure des molécules de masse moléculaires variées, se fragmentant et s'ionisant dans l'un ou l'autre des 2 modes d'ionisation.

La première étape a consisté à infuser les composés. Une infusion consiste à étudier un composé uniquement par l'intermédiaire d'un spectromètre de masse sans passer par une étape chromatographique, le but étant d'obtenir le spectre de masse du composé étudié. On peut voir cette étape comme une injection directe du composé dans le spectromètre : les composés mis en solution, arrivent directement dans la chambre d'ionisation. Les ions pseudo-moléculaires sont recherchés. S'ils sont détectés, ils sont alors sélectionnés puis fragmentés pour obtenir le spectre global de la molécule.

Une fois les spectres de masse obtenus, il a alors été possible de passer à la mise au point des conditions de séparation chromatographiques et **déterminer le temps de rétention des composés**. Toutefois, avant de commencer l'étape de détermination des temps de rétention il a été nécessaire d'introduire **plusieurs étalons internes** dans la méthode (voir plus loin).

En ce qui concerne l'acquisition spectrale, il nous a fallu, dans un premier temps, évaluer les différentes méthodes selon lesquelles le système peut fonctionner. On parle de « méthodes d'acquisition ». Notre objectif était de développer plusieurs méthodes d'acquisition pour proposer, à terme, plusieurs approches de screening, ceci en mode d'ionisation positif et négatif. Pour les screenings développés par LC-MS/MS, les molécules peuvent être recherchées **de manière ciblée** (Multiple Target Screening ou MTS ; Multiple Reaction Monitoring ou MRM) ou **de manière non ciblée** (= General Unknown Screening ou GUS). *(Ces approches sont détaillées dans le paragraphe VII de cette partie).*

Les développements se sont faits, dans un premier temps, à partir de solutions pures. **L'étape suivante a été la mise au point de méthodes d'extraction adaptées au screening** à la fois par des approches manuelles et par les approches automatisées réalisables avec le CLAM 2000. Quelle que soit l'approche, il s'agissait de mettre au point des méthodes permettant le meilleur compris.

Tout ou partie de ces développements a été réalisé en collaboration avec l'équipe Shimadzu de Shimadzu France et l'équipe Shimadzu Europe, plus particulièrement la "MSO Unit" (Mass Spectrometry Business Unit- Overseas) : Neil Loftus (General Manager) et Alan Barnes (LC-MS/MS application).

I) Système LC-MS/MS

Le système est composé d'un CLAM-2000, d'une chaîne UHPLC (Nexera LC, Shimadzu) et d'un spectromètre de masse en tandem, modèle 8060 (Shimadzu). La séparation chromatographique est réalisée en phases inverses en utilisant comme colonne une Restek Biphenyl 2.7um 2.1x100mm.



II) Détermination des conditions chromatographiques et des paramètres de la source d'ionisation

1) Choix des conditions chromatographiques

Les molécules du mélange de référence ayant permis de déterminer les conditions chromatographiques sont présentées dans le tableau 2 ci-après.

Nom	Classe	Caractéristiques
Acide 2 4-dichlorophenoxyacétique	Pesticide	ESI -
Acide salicylique	Antalgique	ESI -
Amiodarone	Anti-arythmique de classe III	ESI +, masse moléculaire élevée
Amphétamine	Stupéfiant	ESI +, masse moléculaire faible
Apixaban	Anticoagulant	ESI +
Aripiprazole	Neuroleptique	ESI +
Aténolol	β -bloquant	ESI +
Benzoylecgonine	Stupéfiant (principal métabolite de la cocaïne)	ESI +, polaire
Buprénorphine	Agoniste/antagoniste morphinique	ESI +, se fragmente peu
Citalopram	Antidépresseur (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine)	ESI +
Halopéridol	Neuroleptique	ESI +
Ketamine	Anesthésique	ESI +
Lidocaïne	Anesthésique	ESI +
Metformine	Anti-diabétique	ESI +
Morphine	Antalgique	ESI +, polaire
Nordiazépam	Benzodiazépine	ESI +
Phénobarbital	Barbiturique	ESI -
THC	Stupéfiant	ESI + ou -, très apolaire
THC-COOH	Stupéfiant (métabolite du cannabis)	ESI + ou -, très apolaire
Tramadol	Antalgique	ESI +, se fragmente peu
Vérapamil	Inhibiteur calcique	ESI +
Warfarine	Anticoagulant	ESI +
Zonisamide	Anti-épileptique	ESI +

Tableau 2 : mélange des 23 molécules de référence

Différentes phases stationnaires et phases mobiles, gradients, conditions de débit ont été testés afin de déterminer les conditions assurant une séparation optimale des 23 molécules du mélange.

Les paramètres qui ont été finalement retenus sont résumés dans le tableau 3.

Colonne	Restek Raptor Biphenyl 2,7 μ m 100 x2,1 mm	
Température du four	40°C	
Débit	0,3 mL/min	
Phase aqueuse	Eau + 2mM formiate d'ammonium + 0,002 % acide formique	
Phase organique	Méthanol + 2mM formiate d'ammonium + 0,002 % acide formique	
Gradient	Temps (min)	% phase organique
	1.00	10
	2.00	40
	10.50	100
	13.50	100
	13.51	10
	18	10

Tableau 3 : paramètres chromatographiques retenus

2) Choix des paramètres de la source d'ionisation

Le mélange de 23 molécules a également été utilisé pour cette étape.

Les paramètres retenus sont résumés dans le tableau 4.

<i>Heat block temperature</i>	400 °C
<i>DL temperature</i>	250 °C
<i>Interface temperature</i>	300 °C
<i>Interface voltage</i>	\pm 1.5 kV
<i>Heating gas flow</i>	10 L/min
<i>Drying gas flow</i>	10 L/min
<i>Nebulization gas flow</i>	3 L/min

Tableau 4 : paramètres du spectromètre de masse retenus

III) Infusion des molécules

1) Méthode d'infusion développée pour le spectromètre de masse en tandem 8060

La méthode d'infusion réalisée sur le spectromètre de masse en tandem 8060 est résumée dans la figure 13 ci-dessous.

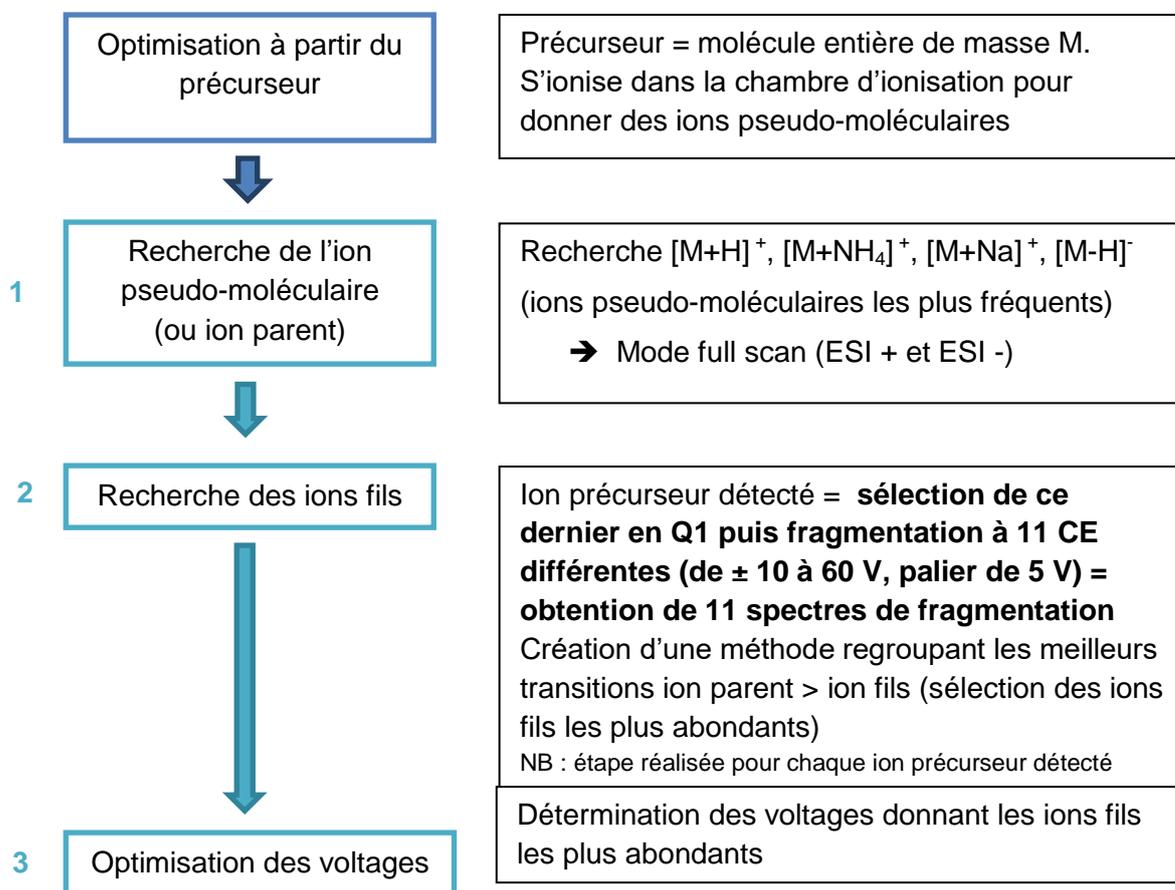


Figure 13 : principe d'une infusion à partir de l'ion pseudo-moléculaire

Pour une intensité inférieure à 2 000 cps, les ions pseudo-moléculaires n'étaient pas sélectionnés pour être fragmentés. Ces derniers étaient recherchés avec une tolérance en masse de +/- 0,5 uma.

Les critères de sélection des transitions ion parents > ion fils sont résumés dans le tableau 5.

Nombre maximal de transitions sélectionnées	15	= sélection des 15 ions fils les plus intenses
Minimum m/z ion produit	10 uma	= les ions en dessous de 10 uma ne sont pas considérés comme des ions fils
Maximum m/z ion produit	- 5 uma	= on considère comme ions fils les ions ayant une masse M - 5 uma

Tableau 5 : critères de sélection des transitions ion parent > ion fils

Des molécules différentes peuvent avoir des fragments en commun. Pour éviter toute interférence, **toutes les molécules ont été infusées individuellement à une concentration de 0,2 mg/L.**

2) Traitement des résultats

Pour chaque molécule, les résultats suivants sont obtenus :

- Un *Select_Pre* (*Selection Precurseur*) qui permet de visualiser tous les ions détectés (=Total Ion Count ou TIC). Il permet d'avoir une idée des ions pseudo-moléculaires détectés ou non.
- Un *CE_Select* (*collision energy*) pour chaque ion pseudo-moléculaire détecté. Il permet de visualiser les 11 spectres obtenus aux 11 énergies de collision différentes.
- Un *CE_Detail* pour chaque ion précurseur détecté. Il permet de visualiser les énergies de collision maximisant chacune des transitions.

La figure 14 représente le SelectPre de la clozapine de masse molaire 326 g/mol. On peut y observer les ions 327,2, 348,9 et 325,1 uma. Ces ions peuvent correspondre respectivement aux ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M-H]^-$.

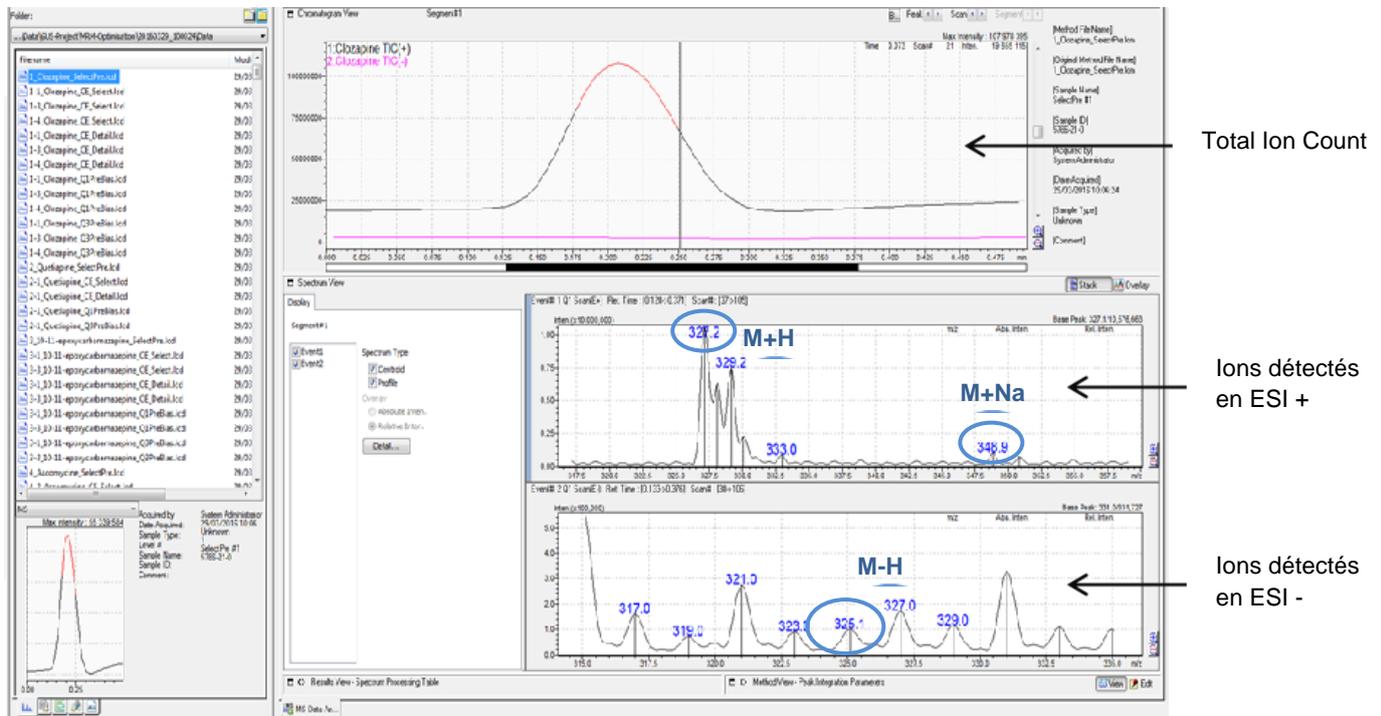
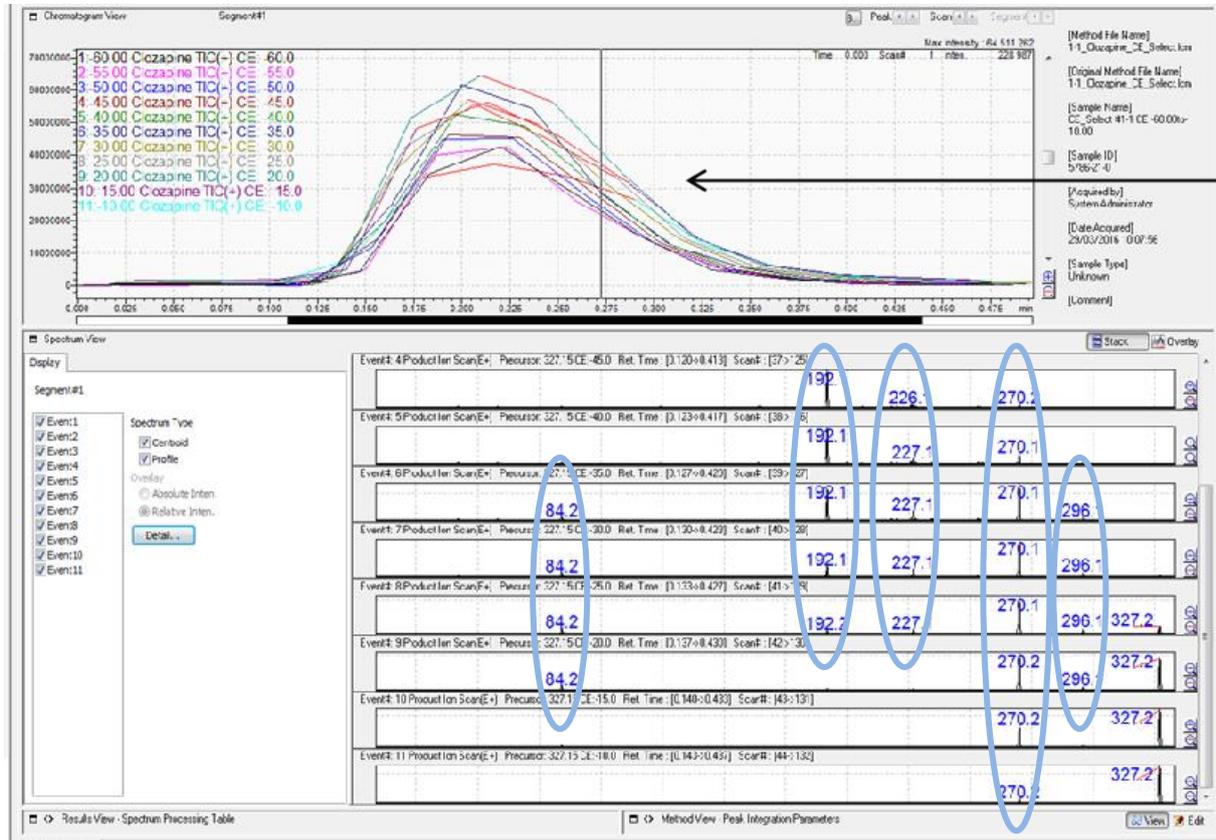


Figure 14 : *Select_Pre* de la clozapine

Ces ions ont pu être sélectionnés et fragmentés à différentes énergies de collision. L'étape suivante est de vérifier que les ions fils obtenus proviennent bien du même ion parent.

La figure 15 montre le CE_select du $[M+H]^+$. On remarque que pour plusieurs énergies de collision différentes on obtient exactement les mêmes ions fils : (ex : 296,1, 270,1, 227,1....) à des intensités différentes. Puisqu'ils apparaissent systématiquement, ces ions proviennent très probablement de la fragmentation de la clozapine. Les transitions « ion parent > ion fils » 327,2 > 296,1, 327,2 > 270,1, etc... sont donc spécifiques de la clozapine.



Pic
gaussien

Figure 15 : CE_Select du $[M+H]^+$ de la clozapine

Au contraire, si on regarde le CE_Select du $[M+Na]^+$ (cf. figure 16) de la clozapine, il est impossible de trouver une transition ion parent > ion fils spécifique de la clozapine puisque aucun ion fils ne se retrouve plusieurs fois. Un pic gaussien n'est de plus pas obtenu. Dans ce cas présent, le spectre de masse du $[M+H]^+$ sera enregistré et non celui du $[M+Na]^+$.

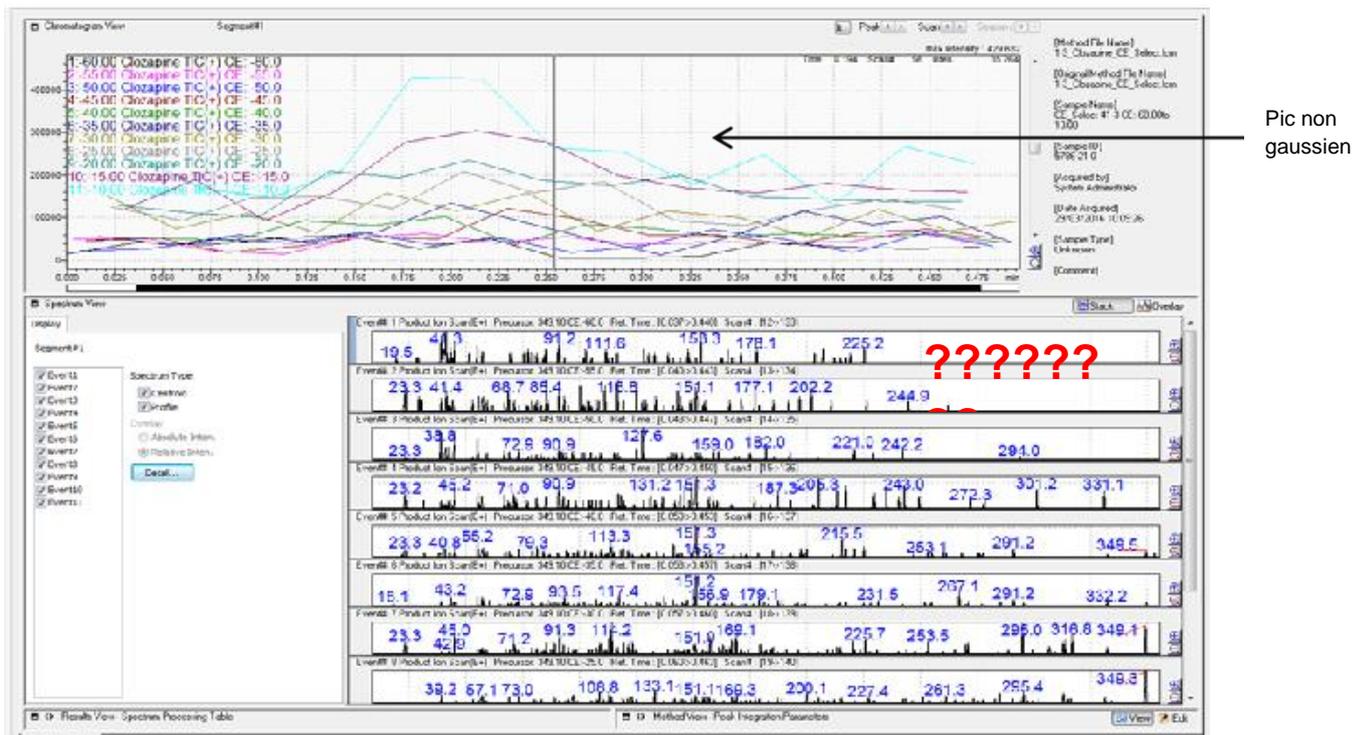


Figure 16 : CE_Select du $[M+Na]^+$ de la clozapine

Les spectres de masse MS^2 (=CE_Select) ainsi vérifiés, sont gardés pour constituer une bibliothèque de spectres de masse. Ces spectres de masse seront dits « complets » puisqu'ils comprennent l'ensemble des fragments obtenus pour une énergie de collision donnée.

Plus spécifiquement, les spectres obtenus aux énergies de collision $\pm 10, 35, 55$ V ont été utilisés pour constituer la bibliothèque de référence (cf. paragraphe VII Création des méthodes d'acquisition).

NB :

- Il est possible que plusieurs ions pseudo-moléculaires soient obtenus pour une même molécule : $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$... Si les intensités obtenues sont similaires, les spectres de masse obtenus à partir de chacun de ces ions pseudo-moléculaires ont été conservés.
- Les spectres des ions $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ ont été enregistrés tous les deux si l'intensité du $[M-H]^-$ correspondait à au moins 15 % de l'intensité du $[M+H]^+$.
- **A ce stade du développement, les transitions ion parent > ion fils déterminées lors de l'infusion (maximum 15) n'étaient considérées que comme « hypothétiques ». Elles devaient être confirmées lors du passage de chaque molécule en chromatographie.**

Il était également possible qu'aucun ion pseudo-moléculaire ne soit détecté ou que la fragmentation des ions pseudo-moléculaire ne soit pas satisfaisante. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées dans ce cas.

- La concentration peut-être trop faible. Il suffit donc de l'augmenter afin d'augmenter le signal.
- La molécule peut ne pas être adaptée au mode d'ionisation (ex : molécules très apolaires). Il sera donc difficile d'obtenir un spectre de masse sans changer de type d'ionisation (passage vers l'APCI, par exemple).
- Il est aussi possible que la molécule se fragmente totalement dans la chambre d'ionisation, même dans les conditions d'ionisation les plus douces. Ces molécules auront besoin d'être ré-infusées en considérant des masses plus faibles comme les ions parents.
- La présence d'isotope peut expliquer l'absence de résultats. On appelle isotopes tous les éléments possédant le même nombre de protons mais un nombre différent de neutrons. Le Cl^{35} et le Cl^{37} sont deux isotopes. La masse atomique du chlore correspond à la moyenne des masses des isotopes tout en tenant compte de leur proportion respective (proportion $Cl^{37} = 37,5 \%$ du Cl^{35}). La masse atomique est donc de 35,5 g/mol. Cependant, le spectromètre de masse identifie les différents isotopes. Il détecte soit un Cl^{35} soit un Cl^{37} . Or, plus le nombre de Cl augmente plus la probabilité d'avoir un Cl^{37} augmente. Il est donc possible d'avoir comme ion précurseur non plus un $[M+H]^+$ mais un $M+H+2$ (le +2 provenant d'un Cl^{37} au lieu d'un Cl^{35}), par exemple.

La stratégie de traitement des résultats des infusions est résumée dans la figure 17 ci-dessous.

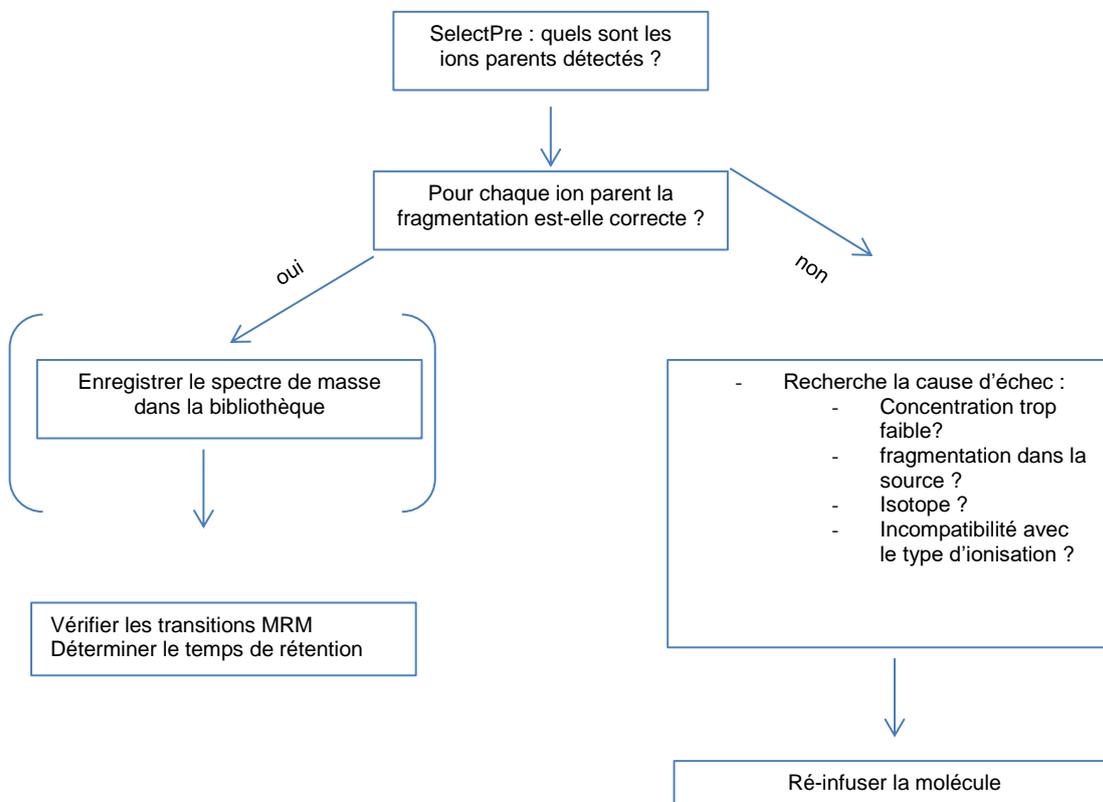


Figure 17 : organigramme décisionnel du traitement des résultats de l'infusion

IV) Choix des étalons internes

L'utilisation d'un ou de plusieurs étalons internes en chromatographie liquide est indispensable. Ils sont l'assurance qu'aucune perturbation n'est survenue au cours de l'analyse (de l'extraction jusqu'à la détection ou la quantification).

En effet, pour un étalon interne donné correspond une aire sous la courbe et un temps de rétention donnés. Une modification de ces paramètres est le signe d'une anomalie. Par exemple, une diminution de l'aire de l'étalon interne peut être le signe d'un simple bouchage de l'aiguille d'injection, mais peut également traduire un problème de compétition dans la source (effet matrice, suppression ionique). Une modification de son temps de rétention peut être liée à une fuite au niveau de la colonne, par exemple.

Un étalon interne, si tant est qu'il soit bien choisi, permet aussi de corriger les erreurs analytiques. Si l'aire sous la courbe d'une molécule diminue pour une concentration donnée, l'aire sous la courbe de l'étalon interne diminue aussi dans les mêmes proportions. Cependant, le rapport des aires reste constant. Il est donc plus pertinent d'utiliser le rapport de ces aires pour le calcul des concentrations (l'aire sous la courbe étant proportionnelle à la concentration).

Le principe est identique pour les temps de rétention. Le rapport entre le temps de rétention de la molécule et le temps de rétention de l'étalon interne, aussi appelé temps de rétention relatif TRR, est supposé rester constant. Il sert donc de référence.

Un étalon interne doit répondre à plusieurs critères. Il ne doit pas être produit par l'organisme et il doit avoir les mêmes propriétés physico-chimiques que les molécules à doser.

Dans le cadre du screening, il est nécessaire d'utiliser plusieurs étalons internes. Ils sont choisis de manière à :

- Représenter plusieurs classes (4-5) de molécules
- Avoir une bonne répartition en termes de temps de rétention et de mode d'ionisation
- Être accessible facilement et de façon pérenne
- Avoir un coût faible

Nous avons choisi de travailler avec des analogues deutérés, c'est-à-dire que l'un des atomes de la molécule est remplacé par son isotope (ex : ^1H remplacé par ^2H). Le temps de rétention reste identique. La masse de la molécule étant modifiée, il est possible de différencier la molécule d'origine et son analogue par la spectrométrie de masse.

11 étalons internes ont été sélectionnés selon les critères cités précédemment. Leurs différentes caractéristiques sont résumées dans le tableau 6 ci-après.

Nom	Classe pharmacologique	Temps de rétention dans les conditions retenues (min)	Mode d'ionisation
Atenolol-D7	β -bloquant	2.99	ESI +
Benzoylecgonine-D3	Métabolite de la cocaïne	4.53	ESI +
Clonazepam-D4	Benzodiazépine (anticonvulsivant)	7.43	ESI -
Cocaïne	Stupéfiant	4.93	ESI +
Diazepam-D5	Benzodiazépine (anxiolytique)	9.03	ESI +
Haloperidol-D4	Neuroleptique	6.08	ESI +
Mianserine-D3	Antidépresseur	6.64	ESI +
Morphine-D3	Analgésique opioïde	2.94	ESI +
Phenobarbital-D5	Barbiturique	5.05	ESI -
THC-COOH-D3	Stupéfiant (métabolite du cannabis)	9.62	ESI +
Topiramate-D12	Anticonvulsivant	5.41	ESI +

Tableau 6 : caractéristiques des 11 étalons internes retenus

V) Détermination des temps de rétention

Pour déterminer les temps de rétention, des mélanges de composés ont été créés (parfois jusqu'à 30 molécules par mélange). Ils contenaient :

- Des molécules à une concentration de 100 $\mu\text{g/L}$,
- sans aucun ion pseudo-moléculaire en commun pour éviter les interférences.
- Les onze étalons internes

Pour chaque mélange, une méthode regroupant toutes les transitions ion parent > ion fils déterminées lors de l'infusion a été créée.

Si les transitions établies lors de l'infusion étaient correctes, les molécules étaient directement identifiées, et leur TR et TRR (par rapport à chacun des étalons internes) étaient enregistrés.

Les résultats se présentaient sous la forme suivante :

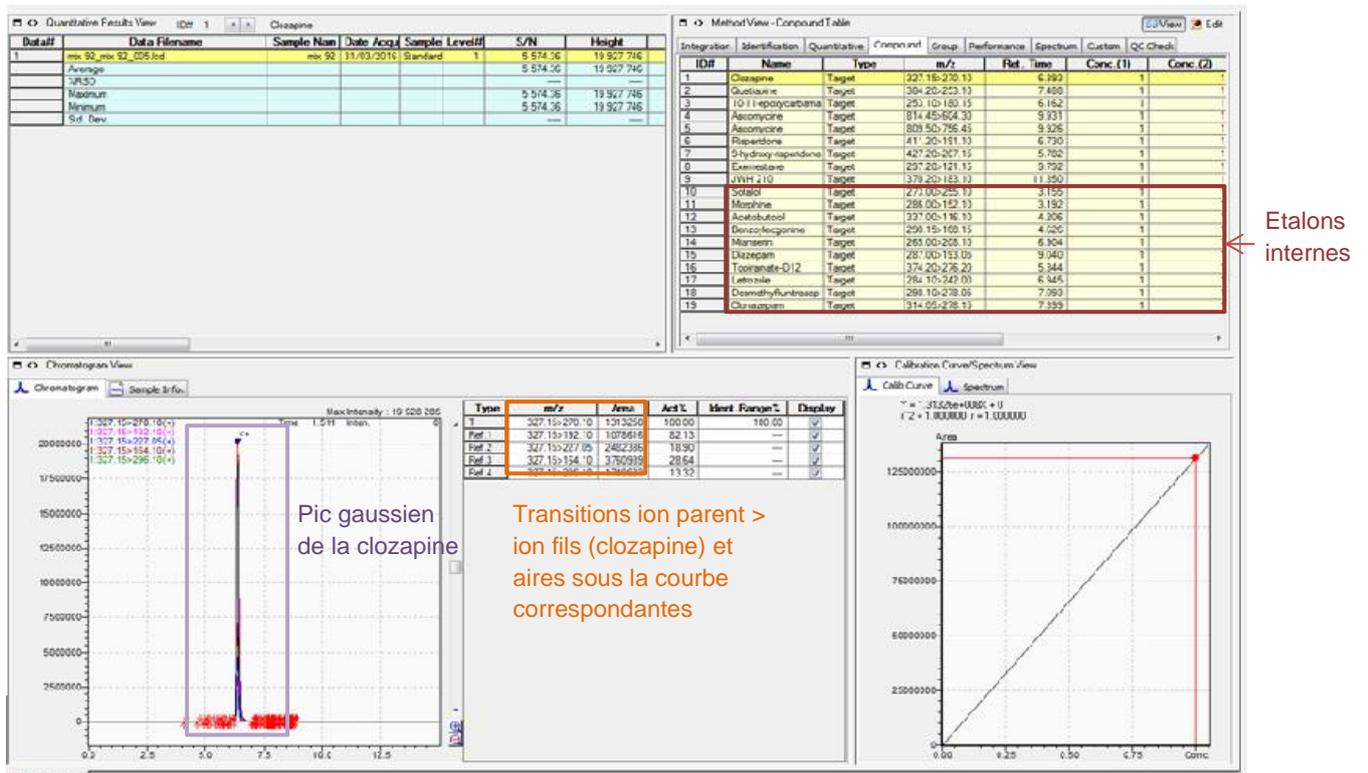


Figure 18 : chromatogramme de la clozapine

La première étape est de s'assurer que les TR et les aires des étalons internes correspondaient aux valeurs attendues.

On vérifiait ensuite qu'un pic chromatographique gaussien soit obtenu pour chaque composé et pour chaque transition. La figure 18 représente l'exemple de la clozapine pour laquelle les transitions choisies et la séparation chromatographique étaient correctes.

En cas de pic non gaussien (cf. figure 19), les transitions ion parent > ion fils sélectionnées pour une molécule lors de l'infusion étaient considérées non spécifiques et la molécule devait être ré-infusée.

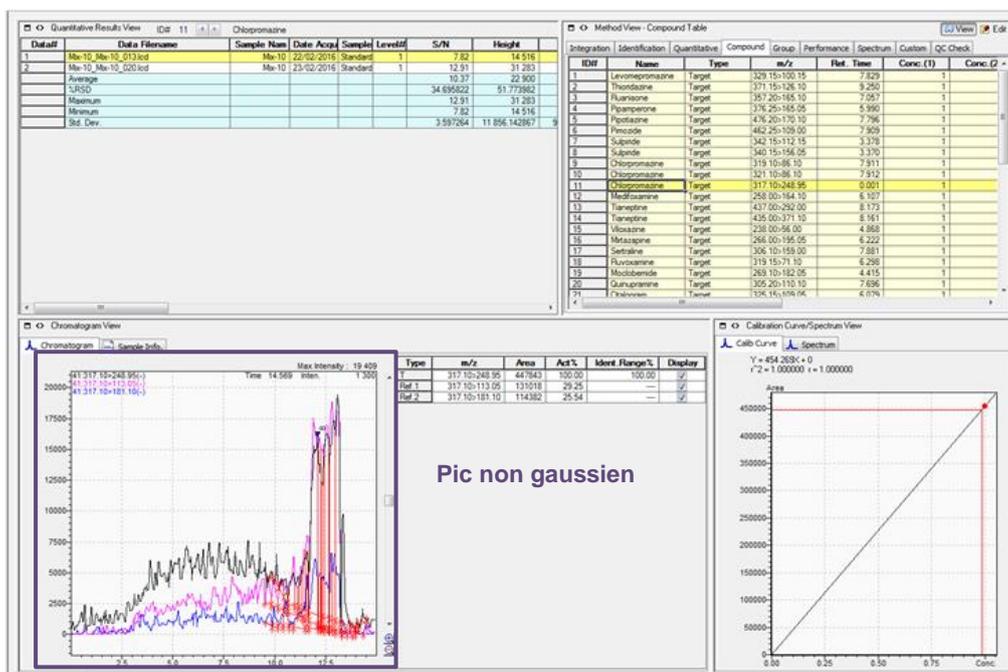


Figure 19 : chromatogramme de la chlorpromazine

Il était aussi important de noter les aires sous les courbes. Cela permettait d'attribuer un rang classant les transitions d'une molécule les unes par rapport aux autres. Le tableau 7 référence les transitions choisies de la clozapine avec les aires sous les courbes et les rangs correspondants.

Transition ion parent > ion fils	Aire sous la courbe	Rang
327,15 > 270,10	155 325 855	1
327,15 > 192,10	107 861 670	2
327,15 > 227,05	24 823 869	4
327,15 > 164,10	37 609 397	3
327,15 > 296,10	17 496 856	5

Tableau 7 : rang des différentes transitions de la clozapine

Ces rangs devaient être utiles lors de la création ultérieure de méthodes d'acquisition ; phase où la sélection des transitions devait être basée sur leur aire sous la courbe.

La figure 20 synthétise la stratégie mise en place pour le traitement des résultats.

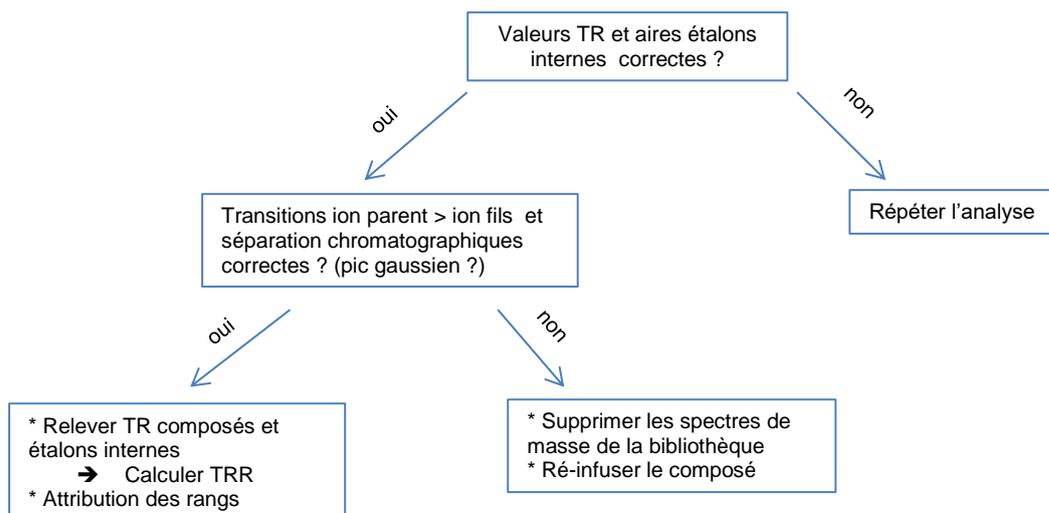


Figure 20 : organigramme décisionnel du traitement des résultats des temps de rétention

VI) Enregistrement des spectres de masse à partir des pics chromatographiques

Lors du passage dans la colonne chromatographique, plusieurs transitions ion parent > ion fils spécifiques étaient suivies ; chaque transition formant un pic chromatographique. L'intensité du pic chromatographique est dépendante de la transition. Il est possible à partir de ces intensités de construire un spectre de masse comme illustré dans la figure 21 ci-dessous.



Figure 21 : construction d'un spectre de masse à partir des intensités d'un pic chromatographique

Ces spectres de masse ont été enregistrés pour chaque molécule dont les transitions ion parent > ions fils étaient correctes. Ils ont permis de constituer une deuxième bibliothèque de spectre de masse qui sert de référence pour la méthode d'acquisition dite MRM spectrum mode (voir paragraphe VII.4 comparaison à la bibliothèque de spectres de masse).

A ce stade, après infusion et passage dans les conditions chromatographiques, nous avons donc à disposition pour environ 1300 composés :

- Une bibliothèque de spectres de masse comprenant l'ensemble des ions fils d'une molécule aux énergies de collision $\pm 10, 35, 55$ V.
- Une bibliothèque de spectre de masse regroupant les différentes transitions ion parent > ion fils (maximum de 15) pour chaque molécule
- Le classement des transitions les unes par rapport aux autres en fonction de leurs aires
- Les TR et TRR de chaque molécule

A partir de ces informations, il a été possible de créer différentes méthodes d'acquisitions.

VII) Création des méthodes d'acquisition

1) Le *General Unknown Screening* (GUS)

a) Principe

L'approche GUS est une méthode de recherche sans a priori. Contrairement aux approches MRM ou MTS (voir plus loin), la première étape consiste à considérer l'ensemble des ions détectés. Un ion est ensuite sélectionné et fragmenté, pour obtenir un spectre de masse. Ce dernier est comparé aux spectres de masse préalablement enregistrés en bibliothèque, dans les mêmes conditions.

b) Méthode GUS créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060

La première étape est une acquisition en mode full scan ($=MS^1$). Le spectre de masse acquis permet de visualiser les différents ions formés dans la source et leur intensité (cf. figure 22).

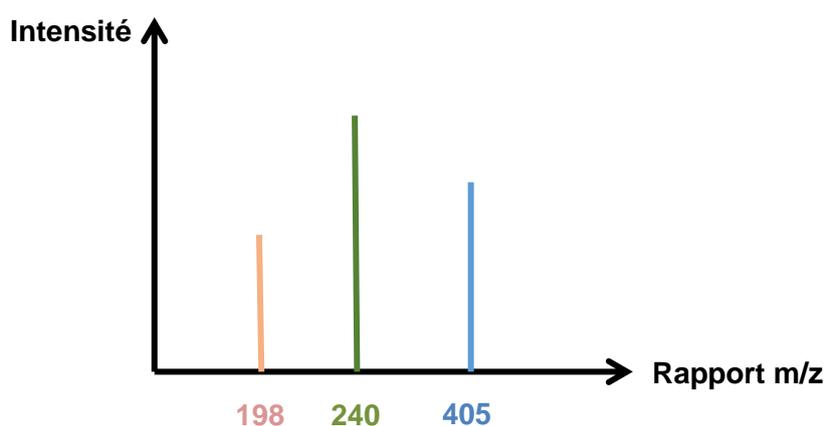


Figure 22 : intensité des ions en fonction de leur rapport m/z

L'ion le plus intense (dans l'exemple ci-dessus, $m/z = 240$) **du spectre de masse** ou « **pic de base** » est sélectionné pour réaliser des PIS ($=MS^2$) à 3 énergies de collision

différentes : une faible ($\pm 10V$), une moyenne ($\pm 35V$) et une forte ($\pm 55 V$). On obtient ainsi 3 spectres de masse complets avec théoriquement les informations suivantes :

- Energie de collision faible : visualisation de l'ion pseudo-moléculaire
- Energie de collision moyenne : visualisation des ions fils des molécules se fragmentant aisément
- Energie de collision forte : visualisation des ions fils des molécules nécessitant une forte énergie de collision pour se fragmenter

Le déclenchement des MS² est dépendant des informations obtenues lors du MS¹. On parle d'acquisition data dependant (DDA : dependant data acquisition).

L'acquisition MS¹ est ensuite répétée. Si le pic de base obtenu est le même, les PIS seront effectués sur le deuxième ion le plus intense (ici, $m/z = 405$). Ce processus s'appelle exclusion dynamique : il permet d'éviter les problèmes de « masquage » d'un ion de faible intensité par un ion de forte intensité.

Cette succession d'étape est d'abord effectuée en ESI + puis en ESI -.

2) Multiple Reaction Monitoring (MRM)

a) Principe

Contrairement au GUS, cette méthode a pour point de départ une liste préétablie de « candidats » ions parents. Son principe a déjà été vu dans le paragraphe I.3.c.c.1 Multiple Reaction Monitoring (MRM).

b) Méthode MRM créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060

Pour chaque molécule, deux transitions MRM sont suivies. Les énergies de collision sont optimisées pour chaque transition.

Le choix de ces transitions est basé sur le rang établi lors de la détermination des TR (sélection des rangs 1 et 2).

1) Le MRM spectrum mode (MRM-SpM)

a) Principe

Le MRM spectrum mode suit le même principe qu'une méthode MRM classique sauf que le nombre de transitions MRM suivies est beaucoup plus important. L'augmentation du nombre de transitions a pour objectif de construire un spectre de masse où chaque ion fils a été obtenu à une énergie de collision optimale.

Cette approche est intuitivement beaucoup plus spécifique qu'une MRM classique.

b) Méthode MRM spectrum mode créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060

Pour chaque molécule toutes les transitions MRM obtenues (jusqu'à 15) lors de l'infusion ont été suivies.

3) Multiple Target Screening (MTS)

a) Principe

Contrairement au GUS, l'acquisition ne se fait pas sans *a priori* : on recherche spécifiquement un ion pseudo-moléculaire avant de le fragmenter. Dans cette approche, il existe une liste préétablie de candidats à rechercher et les PIS ne sont déclenchés qu'une fois qu'une transition MRM atteint un seuil prédéfini.

b) Méthode MTS créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060

Les PIS (MS^2) sont déclenchés sur la base de la transition MRM de rang 1. On obtient, ensuite, comme pour le GUS, trois spectres de masse complets pour les 3 énergies de collision ($\pm 10, 35, 55V$).

4) Comparaison aux bibliothèques de spectres de masse

Pour les méthodes GUS et MTS les spectres de masse obtenus ont été comparés à la première bibliothèque de spectres de masse (celle obtenue lors de l'infusion).

Pour le MRM spectrum mode, les spectres de masse ont été comparés à la bibliothèque spécifiquement construite pour ce mode.

La présence d'une molécule dans un échantillon est rendue positive lorsque les spectres de masse obtenus lors de l'acquisition sont identiques à ceux enregistrés dans la bibliothèque. Il faut également que le temps de rétention corresponde à la molécule en question.

5) Comparaison GUS / MRM / MRM-SpM / MTS

a) Aspects qualitatifs et quantitatifs

Le GUS est une méthode purement qualitative : les trois spectres de masse obtenus à 3 énergies différentes sont comparés aux spectres de masse de la bibliothèque.

Les méthodes MRM, MRM spectrum mode et MTS peuvent, elles, permettre un abord quantitatif. En effet, il est possible de suivre les transitions MRM au cours du temps (« au fur et à mesure que la molécule sort de la colonne »). Ces dernières vont donc avoir un profil gaussien et les aires sous la courbe seront proportionnelles à la concentration de la molécule.

b) Spécificité

Les méthodes MRM classiques ne permettent de suivre qu'un nombre limité d'ions fils. Pour éviter le risque de confondre des composés isobariques, il est recommandé de suivre au moins 2 ou 3 transitions par composé et d'utiliser le rapport entre les ions pour l'identification des analytes. Cependant, mesurer de tels rapports pour des composés présents sous forme de trace jusqu'à des concentrations toxiques peut être difficile. Ces méthodes ne sont généralement pas utilisées dans le cadre d'un screening toxicologique dû au manque de spécificité. Elles sont plutôt dédiées à l'analyse quantitative d'une classe de composés lorsqu'une indication de recherche est présente (par exemple : recherche de produits stupéfiants).

Les méthodes GUS qui considèrent l'ensemble des ions fils sont par essence beaucoup plus spécifiques. Les méthodes MTS rajoutent une information supplémentaire avec le suivi d'une transition MRM. Cependant, le choix des énergies de collision utilisées pour les PIS ne sont pas optimisées pour chaque molécule. Il devient donc parfois difficile d'avoir un score de similarité élevé entre le spectre acquis et le spectre de référence, particulièrement si les concentrations sont faibles.

Le MRM-SpM a des énergies optimisées pour chaque transition suivie ce qui en théorie permettrait d'être hautement spécifique même à de faibles concentrations. Cependant l'ensemble des ions fils produits n'est pas représentés.

c) Sensibilité

L'acquisition en GUS est dépendante de l'intensité des ions détectés lors du full scan. Il n'y a donc aucune pré-sélection d'un analyte ce qui semble idéal dans le cadre d'un screening toxicologique où les indications de recherche peuvent être absentes. On est en théorie capable de détecter tous les composés présents dans un échantillon. Ceci implique que l'analyste peut parfois se trouver face à une molécule n'ayant aucune correspondance dans la bibliothèque.

Cependant, le temps nécessaire à la réalisation des PIS peut être long et certains composés éluant rapidement de faible ou moyenne intensité peuvent être visible dans le spectre MS¹ mais ne pas être sélectionnés pour les PIS. Le GUS n'est donc pas exempt de résultats faussement négatifs.

Les méthodes basées sur le suivi des transitions MRM prennent en compte l'ion pseudo-moléculaire. Elles seront par conséquent plus sensibles que le GUS.

Cependant avec de telles approches « on ne trouve que ce que l'on cherche ». De plus, le déclenchement des PIS en MTS dépend d'un seuil d'intensité. Il est donc possible de ne pas obtenir de spectres MS² lors de l'analyse bien que le composé soit présent dans l'échantillon. L'acquisition en MRM-SpM ne dépend d'aucun seuil d'intensité. La recherche des transitions MRM se fera que le composé soit présent ou non dans l'échantillon.

Chaque méthode a donc ses avantages et ses inconvénients. Dans nos travaux, nous avons testé chacune d'entre elles afin de déterminer quel était le meilleur compromis possible pour développer une méthode de screening à la fois qualitative et quantitative.

Le deuxième axe de travail s'est concentré sur les méthodes d'extraction.

VIII) Choix des méthodes d'extraction

1) Extraction par les sels QuEChERS

a) Méthode de référence

QuEChERS est un acronyme pour QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged, and Safe. Il s'agit donc d'une méthode d'extraction qui se veut rapide, facile, bon marché, robuste et

fiable. Elle a vraisemblablement été utilisée pour la première il y a une dizaine d'années pour l'analyse de résidus de pesticides dans les fruits et légumes (19). Brièvement, il s'agit d'une méthode de préparation des échantillons qui consiste à rajouter des sels dits « QuEChERS » à la matrice d'intérêt (polaire) qui aura été mélangée au préalable dans un solvant organique. Le but des sels étant de séparer la phase aqueuse du solvant organique tout en « séchant » la phase aqueuse.

En effet, il est connu qu'un système binaire homogène contenant de l'eau et un solvant organique peut être séparé en deux phases hétérogènes par l'addition de sels (20,21). Ce phénomène a lieu car la dissolution des sels altère les propriétés du système, particulièrement la force ionique et la pression de vapeur des composants individuels des solvants (20). Il a été montré que la solubilité du sel dans chaque solvant est un facteur clé : la séparation la plus efficace est réalisée avec des sels hautement solubles dans l'eau et insolubles (ou très peu solubles) dans les solvants organiques (21). Plusieurs solvants d'extraction ont été testés: acétone (19, 22), acétonitrile (19,23, 24) et acétate d'éthyle (25,26). Dans une étude dédiée au dosage de pesticides, il a été montré que ces solvants permettent tous un bon rendement d'extraction. L'acétone est facilement miscible à l'eau, mais la séparation de l'eau à partir de ce solvant n'est pas possible sans l'addition d'un solvant non polaire. L'acétate d'éthyle est partiellement miscible à l'eau, ce qui rend superflue l'addition de solvant non polaire pour le séparer de l'eau. Les extraits à base d'acétonitrile contiennent moins de substances interférentes que les extraits à base d'acétate d'éthyle ou d'acétone, et l'acétonitrile peut être séparé assez facilement de l'eau. C'est pour cette raison que l'acétonitrile a finalement été retenu dans la méthode QuEChERS. Au fur et à mesure de l'extension de l'utilisation de cette méthode, il est apparu évident que la force et la quantité des sels utilisés ne pouvaient pas être la même pour toutes les applications. Aujourd'hui, il existe au moins trois variantes de la méthode QuEChERS en fonction des sels utilisés:

- La méthode ref 22 : 4 g MgSO₄ + 1 g NaCl
- La méthode « EN 15662 » : 1g citrate trisodique dihydraté + 0.5 g hydrogencitratedisodique sesquihydraté + 1 g NaCl + 4 g MgSO₄
- La méthode « AOAC 2007.01 » : 6 g MgSO₄ + 1.5 g acétate de sodium

Ces quantités de sels sont disponibles sous la forme de kits prêts à l'emploi, utilisés pour l'extraction des pesticides avec un volume de solvant de 10 à 12 mL et 10 grammes d'échantillon.

Si les méthodes d'extractions à base de sels QuEChERS ont d'abord été utilisées pour la recherche de pesticides dans des matrices alimentaires ou environnementales, ils sont depuis appliqués à des matrices biologiques. Le laboratoire du CHU de Limoges a ainsi développé une extraction basée sur les sels QuEChERS pour l'analyse des stupéfiants et des benzodiazépines (27) La procédure d'extraction est décrite dans la figure 23 ci-dessous et a été utilisé pour la suite de ces travaux.

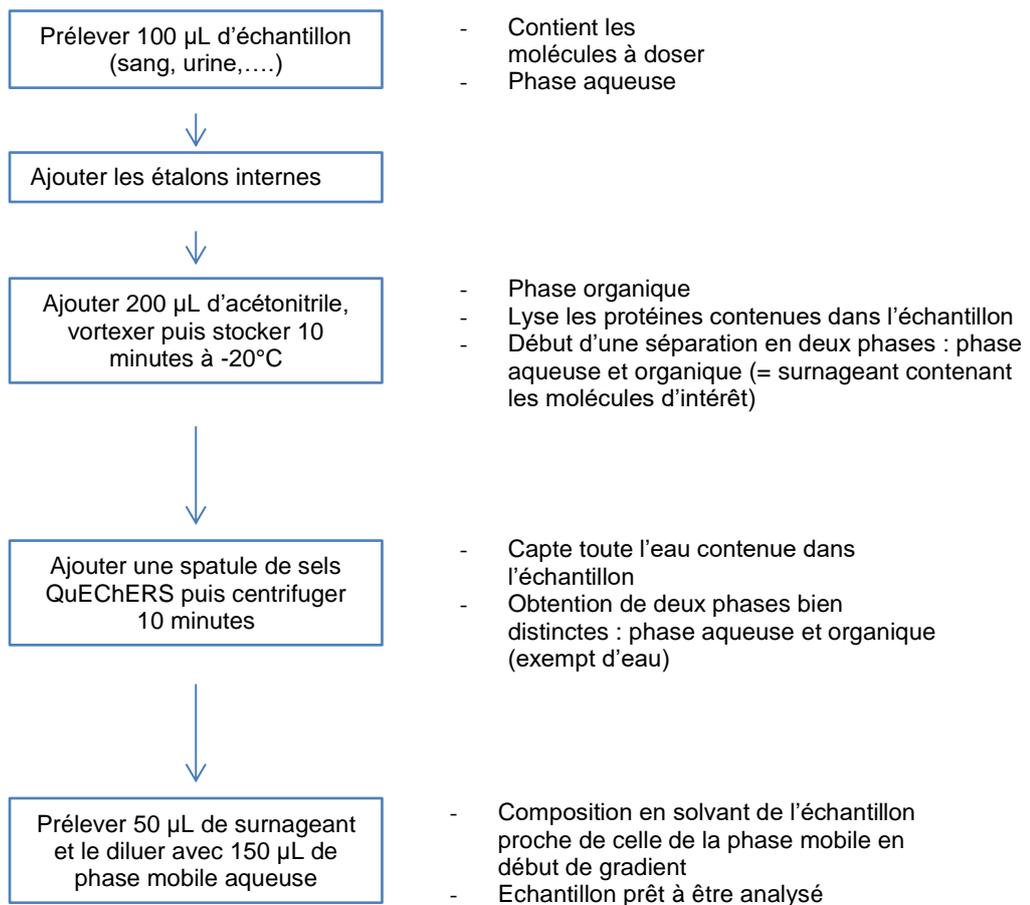


Figure 23 : principe de fonctionnement d'une extraction par les sels QuEChERS

b) Kit micro-QuEChERS

Ce kit propose des tubes préalablement remplis avec des sels QuEChERS. Il évite donc l'étape manuelle de pesée et d'ajout des sels. Le protocole est résumé dans la figure 24 ci-dessous.

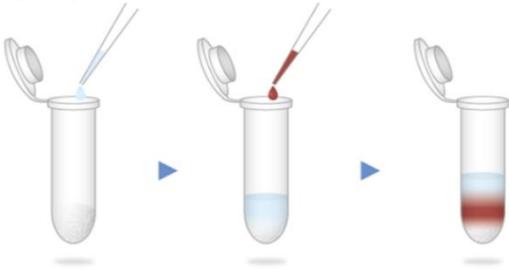
Tube QuEChERS : prêt à l'emploi



Le tube contient les sels QuEChERS **préalablement pesés** :

- 80 mg magnésium sulfate ($MgSO_4$)
- 40 mg sodium acetate (CH_3COONa)

Etape 1



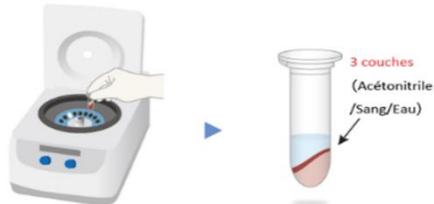
1. Ajouter dans le tube :
 - 300 μL ACN
 - 200 μL water
2. Ajouter l'échantillon:
 - 100 μL (sang,...)

Etape 2



Mélanger la solution avec un vortex

Etape 3



Centrifuger la solution
(10 000 rpm, 10 min)

3 couches doivent être obtenues :

- ACN
- Sang
- Eau

Etape 4



Transférer le surnageant dans un vial LC-MS

Analyse LC-MS/MS

Figure 24 : protocole d'extraction avec le kit micro-QuEChERS

2) Extraction automatisée : CLAM-2000

Le CLAM-2000 est présenté dans la partie 1 paragraphe III.

L'optimisation de la méthode d'extraction s'est basée sur le mélange de référence Le but étant de trouver le meilleur compromis permettant le meilleur rendement pour l'ensemble des 23 composés. Le protocole retenu est le suivant :



B) Résultats

I) Construction des bibliothèques de spectres de masse et de transitions MRM

Une première bibliothèque contenant 8122 transitions MRM pour 1280 standards de référence (incluant 37 étalons internes deutérés) et 6084 spectres de masses pour différents adduits ($[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$, etc....) aux deux mode d'ionisation (positif et négatif) a été construite.

La librairie de spectres inclut les spectres de masse aux énergies de collision ± 10 , 35 et 55V et les « merged » spectres qui représente l'addition de ces trois spectres de masse (en intensité absolue).

A ces informations spectrales sont également associés pour chaque molécule : la structure, le temps de rétention, le numéro CAS, la formule chimique, les synonymes, la classe pharmacologiques, le Chemspider URL, l'InChi et l'InChIKey.

Une deuxième bibliothèque a été construite en utilisant le MRM-Spectrum mode. Techniquement, chacune des molécules a été infusée à nouveau et son spectre de masse produit par ce mode d'acquisition original a été enregistré.

A la fin de cette première étape de mes travaux, il a été mis à disposition 2 bibliothèques spectrales constituant les outils nécessaires pour le développement de méthodes de screening ciblés ou non ciblés.

La première bibliothèque a fait l'objet d'une note d'application. Cette dernière est présentée ci-après.

**Application
News**
LCMS
No.MXX

Liquid Chromatography Mass Spectrometry

**Shimadzu Clinical Toxicology and Forensic
Method Package: MRM & Spectral Library
database containing over 1250 compounds**

Alan J. Barnes¹, Tiphaine Robin², Neil Loftus¹, Pierre Marquet², Souleiman El Balkhi², Sylvain Dulaurent², Franck Saint-Marcoux²

¹Shimadzu Corporation, Manchester, UK; ²CHU Limoges, France

Abstract

To reduce the incidence of both false positive and false negative reporting in clinical and forensic toxicology a spectral library has been developed for the Shimadzu LC-MS/MS platforms. This library uses product ion spectrum data which could be used in routine library searching and compound verification using reference library match scoring.

Keywords. Spectral Library; Reduced false positive and false negative reporting; Toxicological screening; LCMS-8045/50/60; higher specificity

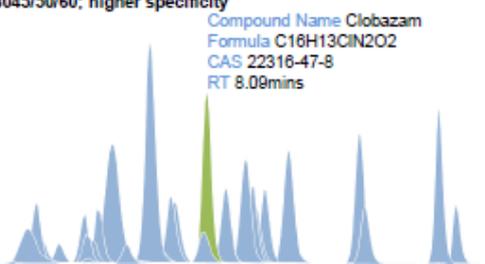


Figure. 1 Benzodiazepines targeted screening by MTS highlighting clobazam

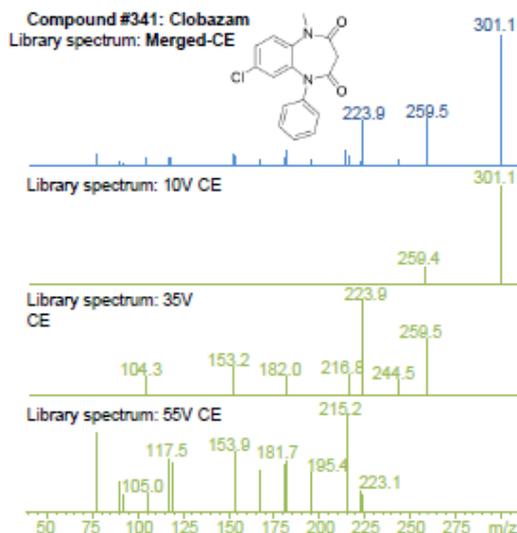


Fig 2 Each certified reference material was acquired with 3 different collision energies to generate an information rich merged-CE spectrum which can be used in library matching and compound verification.

**Using the Shimadzu Clinical and Forensic
Toxicology Library for LC-MS/MS**

The Shimadzu Clinical and Forensic Toxicology Library is designed to create fully optimized methods for compound screening and quantitation using a data base of 1280 certified reference standards.

This method package contains 8122 MRM transitions for 1280 certified reference standards (including 37 deuterated internal standard compounds) with 6084 registered spectra supporting different adduct states of ionised compounds including positive and negative ionisation modes. Library spectra are represented as single CE steps (10, 35, 55) in addition to absolute intensity merged spectrum representing all three collision energies. Compound metadata includes: structure (as a mol file), RT, CAS number, formula, synonyms, compound class/properties, ChemSpider URL and ID number, InChI and InChIKey. Targeted MTS methods with preselected compound classes have been generated for a number of compound groups including: antidepressants, antiepileptics, antipsychotics, barbiturates, benzodiazepines, cannabinoids, amphetamines, opioids and neuroleptics

Library entry information

Library entry information	
Compound Information	Compound name Synonyms CAS number Chemical Formula Mono-isotopic mass Theoretical m/z including [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M+NH4] ⁺ , [M-H] ⁻ Activity & class Structure: mol file, InChI, InChIKey Chemspider ID number Web link (Chemspider)
MRM parameters	Ionization mode Q1 (m/z) Q3 (m/z) Q1 Pre Bias CE Q3 Pre Bias
Library spectra	Merged CE Library spectra Individual CE (10, 35, 55) Library spectra

Table 1. The Shimadzu Clinical and Forensic Toxicology Library supports a data base of MRM and product ion spectrum data acquired using 1280 authentic standards. The data base also includes meta data on compound information to help build new methods quickly and easily.

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
1	1-(3,4-dichlorophenyl)-urea	2327-02-8	C7H8Cl2N2O	203.99	ESI -	[M-H]-	4
2	1-(3-chloro-4-methylphenyl)urea	590393-14-9	C8H9ClN2O	184.04	ESI +	[M+H]+	5
3	1-(4-chlorophenyl)urea	140-38-5	C7H7ClN2O	170.02	ESI +	[M+H]+	4
4	10-11-epoxycarbamazepine	36507-30-9	C15H12N2O2	252.09	ESI +	[M+H]+	5
5	10-hydroxycarbamazepine	29331-92-8	C15H14N2O2	254.11	ESI +	[M+H]+	6
6	11-OH-THC	36557-05-8	C21H30O3	330.22	ESI +	[M+H]+	8
7	1-hydroxymidazolam	59468-90-5	C18H13ClFN3O	341.07	ESI +	[M+H]+	5
8	1-hydroxypyrene	5315-79-7	C16H10O	218.07	ESI +	[M+H]+	4
9	1-Methyl-3-phenylpiperazine	5271-27-2	C11H16N2	176.13	ESI +	[M+H]+	5
10	1-naphthyl acetic acid	86-87-3	C12H10O2	186.07	ESI +	[M+NH4]+	3
11	2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	1563-56-0	C12H9BrN2O	275.99	ESI +	[M+H]+	4
12	2,3,6-Trichlorobenzoic acid	50-31-7	C7H3Cl3O2	223.92	ESI -	[M-H]-	1
13	2,4,5-T	93-76-5	C8H5Cl3O3	253.93	ESI -	[M-H]-	4
14	2,4,6-Trichlorophenol	88-06-2	C6H3Cl3O	195.92	ESI -	[M-H]-	4
15	2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)	94-75-7	C8H8Cl2O3	219.97	ESI -	[M-H]-	2
16	2,4-DB	94-82-6	C10H10Cl2O3	248.00	ESI -	[M-H]-	3
17	2,4-DB methyl ester	18625-12-2	C11H12Cl2O3	262.02	ESI +	[M+H]+	10
18	2,4-dichlorophenol	120-83-2	C6H4Cl2O	161.96	ESI -	[M-H]-	2
19	2,4-DMA	87-82-7	C8H11N	121.09	ESI +	[M+H]+	6
20	2,6 dichlorobenzoic acid	50-30-6	C7H4Cl2O2	189.96	ESI +	[M+NH4]+	3
21	2,6-dimethylaniline	87-82-7	C8H11N	121.09	ESI +	[M+H]+	5
22	2-amino-5-chloropyridine	1072-98-6	C5H5ClN2	128.01	ESI +	[M+H]+	5
23	2C-B	66142-81-2	C10H14BrNO2	259.02	ESI +	[M+H]+	5
24	2-CB	58743-75-2	C15H13N	207.10	ESI +	[M+Na]+	5
25	2C-E	71539-34-9	C12H19NO2	209.14	ESI +	[M+H]+	6
26	2-CI	64584-32-3	C10H14INO2	307.01	ESI +	[M+H]+	5
27	2-oxo-3-hydroxy LSD	111295-09-1	C20H25N3O3	355.19	ESI +	[M+H]+	5
28	3,3'-Sulfonyldianiline	599-61-1	C12H12N2O2S	248.06	ESI +	[M+H]+	10
29	3,4-Methylenedioxypropylvalerone	687603-66-3	C16H21NO3	275.15	ESI +	[M+H]+	5
30	3,5,6-trichloro-2-pyridinol	6515-38-4	C5H2Cl3NO	196.92	ESI +	[M+H]+	10
31	3-acetamidophenol	621-42-1	C8H9NO2	151.06	ESI +	[M+H]+	5
32	3-aminobenzotrifluoride	98-16-8	C7H6F3N	161.05	ESI +	[M+H]+	5
33	3-aminophenol	591-27-5	C6H7NO	109.05	ESI +	[M+H]+	5
34	3-bromophenol	591-20-8	C6H5BrO	171.95	ESI -	[M+2-H]-	1
35	3-chloro-4-methylaniline	95-74-9	C7H8ClN	141.03	ESI +	[M+H]+	4
36	3-chloroaniline	108-42-9	C6H6ClN	127.02	ESI +	[M+NH4]+	2
37	3-chloro-p-anisidine	5345-54-0	C7H8ClNO	157.03	ESI +	[M+H]+	3
38	3-Hydroxybromazepam	13132-73-5	C14H10BrN3O2	331.00	ESI +	[M+H]+	5
39	3-hydroxycarbofuran	16655-82-6	C12H15NO4	237.10	ESI +	[M+H]+	11
40	3-hydroxy-flunitrazepam	67739-71-3	C16H12FN3O4	329.08	ESI +	[M+H]+	5
41	3-methyl-4-nitrophenol	2581-34-2	C7H7NO3	153.04	ESI -	[M-H]-	5
42	3-Methylclonazepam	5527-71-9	C16H12ClN3O3	329.06	ESI +	[M+H]+	10
43	4-bromoaniline	106-40-1	C6H6BrN	170.97	ESI +	[M+2-H]-	8
44	4-bromomethyl-7-methoxycoumarin	35231-44-8	C11H9BrO3	267.97	ESI +	[M+H]+	5
45	4-chloro-2-methylaniline	95-69-2	C7H8ClN	141.03	ESI +	[M+H]+	5
46	4-chloroaniline	106-47-8	C6H6ClN	127.02	ESI +	[M+H]+	3
47	4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid	77279-99-1	C13H9FO3	232.05	ESI -	[M-H]-	4
48	4-Fluoroamphetamine	459-02-9	C9H12FN	153.10	ESI +	[M+H]+	5
49	4-hydroxymidazolam	59468-85-8	C18H13ClFN3O	341.07	ESI +	[M+H]+	5
50	4-isopropylaniline	99-88-7	C9H13N	135.10	ESI +	[M+H]+	5
51	4-MEC	1225617-18-4	C12H17NO	191.13	ESI +	[M+H]+	5
52	4-methyl-a-pyrrolidinobutienone	732180-91-5	C15H21NO	231.16	ESI +	[M+H]+	5
53	4-MTA	14116-06-4	C10H15NS	181.09	ESI +	[M+H]+	5
54	5-(p-Methylphenyl)-5-phenylhydantoin	51169-17-6	C16H14N2O2	266.11	ESI -	[M-H]-	4
55	5-APB (5-(2-aminopropyl)benzofuran)	286834-80-8	C11H13NO	175.10	ESI +	[M+H]+	5
56	5-Chlorouracil	1820-81-1	C4H3ClN2O2	145.99	ESI -	[M-H]-	5
57	5-fluorouridine	77180-80-4	C9H11FN2O6	262.06	ESI +	[M+H]+	17
58	5-hydroxy-florasulam	292085-54-2	C11H8F3N5O3S	345.01	ESI -	[M-H]-	9
59	5-IT (5-(2-Aminopropyl)indole)	3784-30-3	C11H14N2	174.12	ESI +	[M+H]+	6
60	6-chloronicotinic acid	5326-23-8	C6H4ClNO2	156.99	ESI +	[M+H]+	4
61	6-MAM	2784-73-8	C19H21NO4	327.15	ESI +	[M+H]+	8
62	6-MAM-D3	136765-25-8	C19H18NO4D3	330.17	ESI +	[M+H]+	2
63	6-Methoxysalicylic acid	3147-64-6	C8H8O4	289.09	ESI +	[M+H]+	8
64	7-aminoclonazepam	4959-17-5	C15H12ClN3O	341.24	ESI +	[M+H]+	5
65	7-aminoclonazepam-D4	125070-96-4	C15H8ClN3OD4	289.09	ESI +	[M+H]+	5
66	7-aminofunitrazepam	34084-50-9	C16H14FN3O	313.11	ESI +	[M+H]+	5
67	7-aminofunitrazepam-D7	879894-27-6	C16H7FN3OD7	290.16	ESI +	[M+H]+	2
68	7-aminonitrazepam	4928-02-3	C15H13N3O	292.15	ESI +	[M+H]+	5
69	7-hydroxy-amoxapine	37081-76-8	C17H16ClN3O2	292.15	ESI +	[M+H]+	5
70	8-hydroxy-amoxapine	61443-78-5	C17H16ClN3O2	319.07	ESI +	[M+H]+	5
71	9-hydroxy-risperidone	144598-75-4	C23H27FN4O3	319.07	ESI +	[M+H]+	5
72	Abemectin	71751-41-2	C48H72O14	306.17	ESI +	[M+Na]+	10
73	Acebutolol	37517-30-9	C18H28N2O4	303.10	ESI +	[M+H]+	12
74	Acebutolol-D5	1189500-68-2	C18H23N2O4D5	341.24	ESI +	[M+H]+	10
75	Acenocoumarol	152-72-7	C19H15NO6	289.13	ESI -	[M-H]-	10

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
76	Acephate	30560-10-1	C4H10NO3PS	318.27	ESI +	[M+H] ⁺	16
77	Acepromazine	61-00-7	C19H22N2OS	288.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
78	Aceprometazine	13461-01-3	C19H22N2OS	344.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
79	Acetamidiprid	135410-20-7	C10H11CIN4	318.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
80	Acetazolamide	59-66-5	C4H8N4O3S2	278.16	ESI +	[M+H] ⁺	9
81	Acetyldigoxin	1111-39-3	C43H86O14	351.17	ESI +	[M+Na] ⁺	2
82	Acetyldigoxin	5355-48-6	C43H86O15	351.17	ESI +	[M+Na] ⁺	2
83	Acetylisoniazide	1078-38-2	C8H9N3O2	351.17	ESI +	[M+H] ⁺	10
84	Acetylsalicylic acid	50-78-2	C9H8O4	180.04	ESI +	[M+NH4] ⁺	4
85	Acibenzolar-s-methyl	135158-54-2	C8H8N2OS2	209.99	ESI +	[M+H] ⁺	5
86	Aciclovir	59277-89-3	C8H11N5O3	225.09	ESI +	[M+H] ⁺	11
87	Aclonifen	74070-46-5	C12H9CIN2O3	264.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
88	Acrinathrin	101007-06-1	C26H21F6NO5	541.13	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
89	Adenosine	58-61-7	C10H13N5O4	267.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
90	Adrafinil	63547-13-7	C15H15NO3S	289.08	ESI -	[M-H] ⁻	6
91	Ajmaline	4360-12-7	C20H26N2O2	326.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
92	Alachlor	15972-60-8	C14H20CINO2	269.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
93	Albendazole	54965-21-8	C12H15N3O2S	265.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
94	Aldicarb	116-06-3	C7H14N2O2S	190.08	ESI +	[M+NH4] ⁺	9
95	Aldicarb-sulfoxide	1646-87-3	C7H14N2O3S	206.07	ESI +	[M+H] ⁺	12
96	Aldoxycarb	1646-88-4	C7H14N2O4S	222.07	ESI +	[M+NH4] ⁺	16
97	Alfentanil	71195-56-9	C21H32N8O3	416.25	ESI +	[M+H] ⁺	5
98	Alfuzosine	81403-80-7	C19H27N5O4	389.21	ESI +	[M+H] ⁺	10
99	Alimemazine	84-96-8	C18H22N2S	298.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
100	Alizapride	59338-93-1	C16H21N5O2	315.17	ESI +	[M+H] ⁺	10
101	Allethrin	584-79-2	C19H26O3	302.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
102	Allidochlor	93-71-0	C8H12CINO	173.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
103	Allopurinol	315-30-0	C5H4N4O	136.04	ESI +	[M+H] ⁺	7
104	Alminopropene	39718-89-3	C13H17NO2	219.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
105	Almitrine	27469-53-0	C26H28F2N7	477.25	ESI +	[M+H] ⁺	5
106	alpha-hydroxytriazolam	37115-45-0	C17H12CIN4O	358.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
107	Alpidem	82628-01-5	C21H23CIN3O	403.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
108	Alprazolam	28981-97-7	C17H13CIN4	308.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
109	Alprazolam-D5	125229-61-0	C17H8CIN4D5	313.11	ESI +	[M+H] ⁺	2
110	Alprenolol	13655-52-2	C15H23NO2	249.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
111	Althiazide	5588-16-9	C11H14CIN3O4S3	382.98	ESI -	[M-H] ⁻	5
112	Altretamine	645-05-6	C9H18N6	210.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
113	AM 2201	335161-24-5	C24H22FNO	359.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
114	AM 694	335161-03-0	C20H19FINO	435.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
115	Amantadine	768-94-5	C10H17N	151.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
116	Ambeonium	7648-98-8	C28H42CIN4O2	536.27	ESI +	[ESI] ⁺	9
117	Ambroxol	18683-91-5	C13H18Br2N2O	375.98	ESI +	[M+H] ⁺	5
118	Amcinonide	51022-69-6	C28H35FO7	502.24	ESI +	[M+H] ⁺	5
119	Amfepramone	134-80-5	C13H19NO	205.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
120	Amiloride	2609-46-3	C8H8CIN7O	229.05	ESI +	[M+H] ⁺	15
121	Amino-4-chloro-6-benzene-1,3-disulfonamide	121-30-2	C6H8CIN3O4S2	284.96	ESI -	[M-H] ⁻	5
122	Aminoglutethimide	125-84-8	C13H16N2O2	232.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
123	Aminophylline	317-34-0	C16H24N10O4	420.20	ESI -	[M-H] ⁻	6
124	Aminorex	2207-50-3	C9H10N2O	162.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
125	Amiodarone	1951-25-3	C25H29I2NO3	645.02	ESI +	[M+H] ⁺	5
126	Amiphenazol	490-55-1	C9H9N3S	191.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
127	Amisulpride	71675-85-9	C17H27N3O4S	369.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
128	Amitraz	33089-61-1	C19H23N3	293.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
129	Amitriptyline	50-48-6	C20H23N	277.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
130	Amlodipine	88150-42-9	C20H25CIN2O5	408.15	ESI +	[M+H] ⁺	8
131	Amobarbital	57-43-2	C11H18N2O3	226.13	ESI -	[M-H] ⁻	3
132	Amodiaquine	86-42-0	C20H22CIN3O	355.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
133	Amoxapine	14028-44-5	C17H16CIN3O	313.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
134	Amoxicillin	26787-78-0	C16H19N3O5S	365.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
135	Amphepramone	90-84-6	C13H19NO	205.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
136	Amphetamine	300-82-9	C9H13N	135.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
137	Amphetamine-D5	65538-33-2	C9H8ND5	140.14	ESI +	[M+H] ⁺	2
138	Amphotericin B	1397-89-3	C47H73NO17	923.49	ESI +	[M+Na] ⁺	10
139	Ampicillin	69-53-4	C16H19N3O4S	349.11	ESI +	[M+H] ⁺	3
140	Amprenavir	161814-49-9	C25H35N3O6S	505.22	ESI +	[M+H] ⁺	9
141	Amrinone	60719-84-8	C10H9N3O	187.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
142	Amsacrine	51264-14-3	C21H19N3O3S	393.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
143	Anavar	53-39-4	C19H30O3	306.22	ESI +	[M+H] ⁺	10
144	Anhydroecgonine methyl ester	43021-26-7	C10H15NO2	181.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
145	Aniline	62-53-3	C6H7N	93.06	ESI +	[M+H] ⁺	3
146	Antipyrine	60-80-0	C11H12N2O	188.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
147	Apixaban	503612-47-3	C25H25N5O4	459.19	ESI +	[M+H] ⁺	11
148	Apomorphine	58-00-4	C17H17NO2	267.13	ESI +	[M+H] ⁺	10
149	Aprindine	37640-71-4	C22H30N2	322.24	ESI +	[M+H] ⁺	5
150	Aprobarbital	77-02-1	C10H14N2O3	210.10	ESI -	[M-H] ⁻	2

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
151	Aripiprazole	129722-12-9	C23H27Cl2N3O2	447.15	ESI +	[M+H]+	5
152	Ascomycine	11011-38-4	C43H69NO12	791.48	ESI +	[M+NH4]+	10
153	Astemizol	68844-77-9	C28H31FN4O	458.25	ESI +	[M+H]+	10
154	Asulam	3337-71-1	C8H10N2O4S	230.04	ESI +	[M+NH4]+	12
155	Atazanavir	198904-31-3	C38H52N6O7	704.39	ESI +	[M+H]+	15
156	Atenolol	29122-68-7	C14H22N2O3	266.16	ESI +	[M+H]+	5
157	Atomoxetine	82248-69-7	C17H21NO	255.16	ESI +	[M+H]+	4
158	Atovaquone	95233-18-4	C22H19ClO3	366.10	ESI -	[M-H]-	5
159	Atracurium	64228-81-5	C65H82N2O18S2	1242.50	ESI +	[ESI]+	9
160	Atraton-desisopropyl	30380-66-6	C6H11N5O	169.10	ESI +	[M+H]+	5
161	Atrazine	1912-24-9	C8H14ClN5	215.09	ESI +	[M+H]+	5
162	Atrazine-desethyl	6190-65-4	C6H10ClN5	187.06	ESI +	[M+H]+	3
163	Atrazine-desethyl-desisopropyl-2-hydroxy	645-92-1	C3H5N5O	127.05	ESI +	[M+H]+	3
164	Atrazine-desisopropyl	1007-28-9	C5H8ClN5	173.05	ESI +	[M+H]+	5
165	Atropine	51-55-8	C17H23NO3	289.17	ESI +	[M+H]+	5
166	Azaconazole	60207-31-0	C12H11Cl2N3O2	299.02	ESI +	[M+H]+	10
167	Azacyclonol	115-46-8	C18H21NO	267.16	ESI +	[M+H]+	5
168	Azadirachtin	11141-17-6	C35H44O16	720.26	ESI +	[M+Na]+	3
169	Azatadine	3964-81-6	C20H22N2	290.18	ESI +	[M+H]+	5
170	Azathioprine	446-86-6	C9H7N7O2S	277.04	ESI +	[M+H]+	10
171	Azinphos-ethyl	2842-71-9	C12H16N3O3PS2	345.04	ESI +	[M+H]+	10
172	Azinphos-methyl	86-50-0	C10H12N3O3PS2	317.01	ESI +	[M+H]+	10
173	Azocyclotin	41083-11-8	C20H35N3Sn	438.19	ESI -	[M-H]-	5
174	Azoxystrobin	131860-33-8	C22H17N3O5	403.12	ESI +	[M+H]+	5
175	Aztreonam	78110-38-0	C13H17N5O8S2	435.05	ESI +	[M+H]+	15
176	Bacampicillin	50972-17-3	C21H27N3O7S	465.16	ESI +	[M+H]+	10
177	Baclofen	1134-47-0	C10H12ClNO2	213.06	ESI +	[M+H]+	12
178	Bamethan	3703-79-5	C12H19NO2	209.14	ESI +	[M+H]+	6
179	Bamifyline	2016-63-9	C20H27N5O3	385.21	ESI +	[M+H]+	5
180	Barbital	57-44-3	C8H12N2O3	194.08	ESI -	[M-H]-	2
181	BDB	42542-07-4	C11H15NO2	193.11	ESI +	[M+H]+	5
182	Beclometazone dipropionate	5534-09-8	C28H37ClO7	520.22	ESI +	[M+H]+	9
183	Benazepril	86541-75-5	C24H28N2O5	424.20	ESI +	[M+H]+	13
184	Bendiocarb	22781-23-3	C11H13NO4	223.08	ESI +	[M+H]+	10
185	Bendroflumethiazide	73-48-3	C15H14F3N3O4S2	421.04	ESI -	[M-H]-	15
186	Benfluorex	23602-78-0	C19H20F3NO2	351.14	ESI +	[M+H]+	5
187	Benfluralin	1861-40-1	C13H16F3N3O4	335.11	ESI +	[M+H]+	4
188	Benorilate	5003-48-5	C17H15NO5	313.10	ESI +	[M+NH4]+	17
189	Benoxacor	98730-04-2	C11H11Cl2NO2	259.02	ESI +	[M+H]+	9
190	Bentazone	25057-89-0	C10H12N2O3S	240.06	ESI -	[M-H]-	5
191	Benzatropine	86-13-5	C21H25NO	307.19	ESI +	[M+H]+	5
192	Benzbromarone	3562-84-3	C17H12Br2O3	421.92	ESI +	[M+H]+	5
193	Benzocaine	94-09-7	C9H11NO2	165.08	ESI +	[M+H]+	5
194	Benzoximate	29104-30-1	C18H18ClNO5	363.09	ESI +	[M+H]+	4
195	Benzoylcegonine	519-09-5	C16H19NO4	289.13	ESI +	[M+H]+	5
196	Benzoylcegonine-D3	115732-68-8	C16H16NO4D3	292.15	ESI +	[M+H]+	10
197	Benzphetamine	156-08-1	C17H21N	239.17	ESI +	[M+H]+	3
198	Benzthiazide	91-33-8	C15H14ClN3O4S3	430.98	ESI -	[M-H]-	5
199	Benzthiazuron	1929-88-0	C9H9N3OS	207.05	ESI +	[M+H]+	5
200	Benzyladenine	1214-39-7	C12H11N5	225.10	ESI +	[M+H]+	10
201	Benzylpiperazine	2759-28-6	C11H16N2	176.13	ESI +	[M+H]+	5
202	Benzylthiouracyle	6336-50-1	C11H10N2O5	218.05	ESI +	[M+H]+	6
203	Bepiridil	64706-54-3	C24H34N2O	366.27	ESI +	[M+H]+	5
204	Betahistine	19690-13-2	C8H12N2	136.10	ESI +	[M+H]+	5
205	Betamethasone	378-44-9	C22H29FO5	392.20	ESI +	[M+H]+	5
206	Betamethasone-21-acetate	987-24-6	C24H31FO6	434.21	ESI +	[M+H]+	5
207	Betamethasone-21-phosphate	360-63-4	C22H30FO8P	472.17	ESI +	[M+H]+	8
208	Betaxolol	63659-18-7	C18H29NO3	307.21	ESI +	[M+H]+	5
209	Bezafibrate	41859-67-0	C19H20ClNO4	361.11	ESI +	[M+H]+	15
210	Bifenazate	149877-41-8	C17H20N2O3	300.15	ESI +	[M+H]+	6
211	Bifenox	42576-02-3	C14H9Cl2NO5	340.99	ESI +	[M+NH4]+	7
212	Bifenthrin	83322-02-5	C23H22ClF3O2	422.13	ESI +	[M+NH4]+	6
213	Biperidene	514-65-8	C21H29NO	311.22	ESI +	[M+H]+	5
214	Bisacodyl	603-50-9	C22H19NO4	361.13	ESI +	[M+H]+	5
215	Bisantrene	78186-34-2	C22H22N8	398.20	ESI +	[M+H]+	5
216	Bisoprolol	66722-44-9	C18H31NO4	325.23	ESI +	[M+H]+	5
217	Bitertanol	55179-31-2	C20H23N3O2	337.18	ESI +	[M+H]+	5
218	Boscalid	188425-85-6	C18H12Cl2N2O	342.03	ESI +	[M+H]+	5
219	Brallobarbital	561-86-4	C10H11BrN2O3	286.00	ESI -	[M-H]-	3
220	Brefeldin A	20350-15-6	C16H24O4	280.17	ESI +	[M+H]+	5
221	Brodifacoum	56073-10-0	C31H23BrO3	522.08	ESI +	[M+2+H]+	15
222	Bromacil	314-40-9	C9H13BrN2O2	260.02	ESI +	[M+2+H]+	11
223	Bromadiolone	28772-66-7	C30H23BrO4	526.08	ESI -	[M-H]-	7
224	Bromazepam	1812-30-2	C14H10BrN3O	315.00	ESI +	[M+H]+	5
225	Bromocriptine	25614-03-3	C32H40BrN5O5	653.22	ESI +	[M+H]+	15

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
226	Bromo-Dracofly	502759-67-3	C13H12BrNO2	293.01	ESI +	[M+H] ⁺	5
227	Bromophos ethyl	4824-78-6	C10H12BrCl2O3PS	391.88	ESI +	[M+2+H] ⁺	10
228	Bromophos-methyl	2104-96-3	C8H8BrCl2O3PS	363.85	ESI +	[M+H] ⁺	5
229	Bromopropylate	18181-80-1	C17H16Br2O3	425.95	ESI +	[M+2+NH4] ⁺	6
230	Bromoxynil	1689-84-5	C7H3Br2NO	274.86	ESI -	[M-H] ⁻	2
231	Brompheniramine	86-22-6	C16H19BrN2	318.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
232	Buflomedil	55837-25-7	C17H25NO4	307.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
233	Bumetanide	28395-03-1	C17H20N2O6S	364.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
234	Buphedrone	408332-79-6	C11H15NO	177.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
235	Bupiramate	41483-43-6	C13H24N4O3S	316.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
236	Bupivacaine	2180-92-9	C18H28N2O	288.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
237	Bupranolol	14556-46-8	C14H22ClNO2	271.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
238	Buprenorphine	52485-79-7	C29H41NO4	467.30	ESI +	[M+H] ⁺	5
239	Buprenorphine-D4	136781-89-0	C29H37NO4D4	471.33	ESI +	[M+H] ⁺	2
240	Buprofezin	69327-76-0	C16H23N3OS	305.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
241	Bupropion	34841-39-9	C13H18ClNO	239.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
242	Buspiron	36505-84-7	C21H31N5O2	385.25	ESI +	[M+H] ⁺	5
243	Butalbital	77-26-9	C11H16N2O3	224.12	ESI -	[M-H] ⁻	2
244	Butobarbital	77-28-1	C10H16N2O3	212.12	ESI -	[M-H] ⁻	2
245	Butorphanol	42408-82-2	C21H29NO2	327.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
246	Butylone	802575-11-7	C12H15NO3	221.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
247	Cadusaphos	95465-99-9	C10H23O2PS2	270.09	ESI +	[M+H] ⁺	6
248	Cafedrine	58166-83-9	C18H23N5O3	357.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
249	Caffeine	58-08-2	C8H10N4O2	194.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
250	Cannabidiol	13956-29-1	C21H30O2	314.22	ESI +	[M+H] ⁺	2
251	Cannabinol	521-35-7	C21H28O2	310.19	ESI +	[M+H] ⁺	10
252	Canrenic acid	4138-96-9	C22H30O4	358.21	ESI +	[M+H] ⁺	9
253	Canrenone	976-71-6	C22H28O3	340.20	ESI +	[M+H] ⁺	8
254	Captafol	2425-06-1	C10H9Cl4NO2S	346.91	ESI +	[M+H] ⁺	4
255	Captan	133-06-2	C9H8Cl3NO2S	298.93	ESI +	[M+2+H] ⁺	5
256	Captodiamine	486-17-9	C21H29NS2	359.17	ESI +	[M+H] ⁺	4
257	Captopril	62571-86-2	C9H15NO3S	217.08	ESI +	[M+H] ⁺	10
258	Carbamazepine	298-46-4	C15H12N2O	236.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
259	Carbaryl	63-25-2	C12H11NO2	201.08	ESI +	[M+H] ⁺	12
260	Carbendazim	10605-21-7	C9H9N3O2	191.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
261	Carbetamide	16118-49-3	C12H16N2O3	236.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
262	Carbimazole	22232-54-8	C7H10N2O2S	186.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
263	Carbinoxamine	486-16-8	C16H19ClN2O	290.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
264	Carbocromen	804-10-4	C20H27NO5	361.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
265	Carbofuran	1563-66-2	C12H15NO3	221.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
266	Carbophenothion	786-19-6	C11H16ClO2PS3	341.97	ESI +	[M+H] ⁺	3
267	Carbosuffan	55285-14-8	C20H32N2O3S	380.21	ESI -	[M-H] ⁻	4
268	Carboxin	5234-68-4	C12H13NO2S	235.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
269	Carbromal	77-65-6	C7H13BrN2O2	236.02	ESI +	[M+H] ⁺	4
270	Carbutamide	339-43-5	C11H17N3O3S	271.10	ESI -	[M-H] ⁻	10
271	Carisoprodol	78-44-4	C12H24N2O4	260.17	ESI +	[M+H] ⁺	9
272	Camitine	541-15-1	C7H15NO3	161.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
273	Carpipramine	5942-95-0	C28H38N4O	446.30	ESI +	[M+H] ⁺	5
274	Carteolol	51781-06-7	C16H24N2O3	292.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
275	Carvedilol	72956-09-3	C24H26N2O4	406.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
276	Cathinone	71031-15-7	C9H11NO	149.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
277	CDEPA	6967-29-9	C12H16ClNO	225.09	ESI +	[M+H] ⁺	9
278	Cefadroxil	66592-87-8	C16H17N3O5S	363.09	ESI +	[M+H] ⁺	4
279	Cefalexin	15686-71-2	C16H17N3O4S	347.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
280	Cefalotin	153-61-7	C16H18N2O6S2	396.04	ESI +	[M+NH4] ⁺	4
281	Cefamandole	34444-01-4	C18H18N6O5S2	462.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
282	Cefapirin	24356-60-3	C17H17N3O6S2	423.08	ESI +	[M+H] ⁺	10
283	Cefatrizine	51627-14-6	C18H18N6O5S2	462.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
284	Cefazoline	25953-19-9	C14H14N8O4S3	454.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
285	Cefepime	88040-23-7	C19H24N8O5S2	480.12	ESI +	[M+Na] ⁺	10
286	Cefixime	79350-37-1	C16H15N5O7S2	453.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
287	Cefoperazone	62893-19-0	C25H27N9O8S2	645.14	ESI +	[M+H] ⁺	15
288	Cefotetan	69712-56-7	C17H17N7O8S4	575.00	ESI +	[M+H] ⁺	15
289	Cefotiam	61622-34-2	C18H23N9O4S3	525.10	ESI +	[M+H] ⁺	9
290	Cefoxitin	35607-66-0	C16H17N3O7S2	427.05	ESI +	[M+NH4] ⁺	5
291	Cefpodoxime	80210-62-4	C16H17N5O6S2	427.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
292	Cefradine	38821-53-3	C16H19N3O4S	349.11	ESI +	[M+H] ⁺	3
293	Ceftazidime	72558-82-8	C22H22N8O7S2	546.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
294	Ceftizoxime	68401-81-0	C13H13N5O5S2	383.04	ESI +	[M+H] ⁺	9
295	Ceftriaxone	73384-59-5	C18H18N8O7S3	554.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
296	Cefuroxime	55288-75-2	C16H16N4O8S	424.07	ESI +	[M+NH4] ⁺	14
297	Celiprolol	56980-93-9	C20H33N3O4	379.25	ESI +	[M+H] ⁺	15
298	Cetizine	83881-51-0	C21H25ClN2O3	388.16	ESI +	[M+H] ⁺	3
299	CGA321113 (Trifloxystrobin Metabolite)	252913-85-2	C19H17F3N2O4	394.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
300	Chlormethiazole	533-45-9	C6H8ClNS	161.01	ESI +	[M+H] ⁺	4

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
301	Chloramphenicol	56-75-7	C11H12Cl2N2O5	322.01	ESI -	[M-H]-	5
302	Chlorantraniprole	500008-45-7	C18H14BrCl2N5O2	480.97	ESI +	[M+H]+	10
303	Chlorbromuron	13360-45-7	C9H10BrClN2O2	291.96	ESI +	[M+H]+	5
304	Chlordiazepoxide	58-25-3	C16H14ClN3O	299.08	ESI +	[M+H]+	5
305	Chlorfuazuron	71422-67-8	C20H9Cl3F5N3O3	538.96	ESI +	[M+H]+	10
306	Chlormadinone acetate	302-22-7	C23H29ClO4	404.18	ESI +	[M+H]+	5
307	Chlomequat	7003-89-6	C5H13ClN	122.07	ESI +	[M]+	6
308	Chlomezanone	80-77-3	C11H12ClNO3S	273.02	ESI +	[M+H]+	8
309	Chlorobenzylate	510-15-6	C16H14Cl2O3	324.03	ESI +	[M+NH4]+	1
310	Chlorophacinone	3691-35-8	C23H15ClO3	374.07	ESI -	[M-H]-	9
311	Chlorothalonil	1897-45-6	C8Cl4N2	263.88	ESI +	[M+NH4]+	5
312	Chlorpheniramine	113-92-8	C16H19ClN2	274.12	ESI +	[M+H]+	5
313	Chlorphenoxamine	77-38-3	C18H22ClNO	303.14	ESI +	[M+H]+	6
314	Chlorpreamide	94-20-2	C10H13ClN2O3S	276.03	ESI +	[M+H]+	10
315	Chlorproethazine	84-01-5	C19H23ClN2S	347.13	ESI -	[ESI]-	4
316	Chlorpromazine	50-53-3	C17H19ClN2S	318.10	ESI +	[M+H]+	10
317	Chlorpropham	101-21-3	C10H12ClNO2	213.06	ESI +	[M+H]+	10
318	Chlorpyrifos-ethyl	2921-88-2	C9H11Cl3NO3PS	348.93	ESI +	[M+H]+	5
319	Chlorpyrifos-methyl	5598-13-0	C7H7Cl3NO3PS	320.89	ESI +	[M+H]+	5
320	Chlortalidone	77-36-1	C14H11ClN2O4S	338.01	ESI -	[M-H]-	20
321	Chlorthion	500-26-7	C8H9ClNO5PS	296.96	ESI +	[M+H]+	3
322	Chlorthiophos	21923-23-9	C11H15Cl2O3PS2	359.96	ESI +	[M+H]+	5
323	Chlortoluron	15545-48-9	C10H13ClN2O	212.07	ESI +	[M+H]+	5
324	Chlorzoxazone	95-25-0	C7H4ClNO2	168.99	ESI -	[M-H]-	3
325	Cianidanol	154-23-4	C15H14O6	290.08	ESI +	[M+H]+	10
326	Cibenzoline	53267-01-9	C18H18N2	262.15	ESI +	[M+H]+	5
327	Cidetaanine	89943-82-8	C14H12ClNO2	261.06	ESI +	[M+H]+	15
328	Cicloprolol	63659-12-1	C18H29NO4	323.21	ESI +	[M+H]+	5
329	Ciclosporin	59885-13-3	C62H111N11O12	1201.84	ESI +	[M+H]+	13
330	Cilazapril	88768-40-5	C22H31N3O5	417.23	ESI +	[M+H]+	13
331	Cimetidine	51481-61-9	C10H16N6S	252.12	ESI +	[M+H]+	13
332	Ciprofibrate	52214-84-3	C13H14Cl2O3	288.03	ESI -	[M-H]-	3
333	Ciprofloxacin	85721-33-1	C17H18FN3O3	331.13	ESI +	[M+H]+	5
334	Cisatracurium	96946-41-7	C53H72N2O12	928.51	ESI +	[ESI]+	9
335	Citalopram	59729-33-8	C20H21FN2O	324.16	ESI +	[M+H]+	5
336	Clemastine	15886-51-8	C21H26ClNO	343.17	ESI +	[M+H]+	5
337	Clenbuterol	37148-27-9	C12H18Cl2N2O	276.08	ESI +	[M+H]+	5
338	Clindamycine	18323-44-9	C18H33ClN2O5S	424.18	ESI +	[M+H]+	3
339	Clobazam	22316-47-8	C16H13ClN2O2	300.07	ESI +	[M+H]+	5
340	Clobenzorex	13364-32-4	C16H18ClN	259.11	ESI +	[M+H]+	5
341	Clofentazine	74115-24-5	C14H8Cl2N4	302.01	ESI +	[M+H]+	5
342	Clofibrate	637-07-0	C12H15ClO3	242.07	ESI +	[M+H]+	10
343	Clofibrade	26717-47-5	C16H22ClNO4	327.12	ESI +	[M+H]+	7
344	Clomazon	81777-89-1	C12H14ClNO2	239.07	ESI +	[M+H]+	5
345	Clometacin	25803-14-9	C19H16ClNO4	357.08	ESI +	[M+H]+	8
346	Clomifene	911-45-5	C26H28ClNO	405.19	ESI +	[M+H]+	5
347	Clomipramine	303-49-1	C19H23ClN2	314.15	ESI +	[M+H]+	10
348	Clonazepam	1622-61-3	C15H10ClN3O3	315.04	ESI +	[M+H]+	10
349	Clonazepam-D4	170082-15-2	C15H8ClN3O3D4	319.07	ESI +	[M+H]+	10
350	Clonazolam	33887-02-4	C17H12ClN5O2	353.07	ESI +	[M+H]+	5
351	Clonidine	4205-90-7	C9H9Cl2N3	229.02	ESI +	[M+H]+	5
352	Clopamide	636-54-4	C14H20ClN3O3S	345.09	ESI +	[M+H]+	15
353	Clopyralid	1702-17-6	C8H3Cl2NO2	190.95	ESI +	[M+H]+	5
354	Clothianidin	210880-92-5	C6H8ClN5O2S	249.01	ESI +	[M+H]+	10
355	Clotiapine	2058-52-8	C18H18ClN3S	343.09	ESI +	[M+H]+	5
356	Clotiazepam	33671-46-4	C16H15ClN2OS	318.06	ESI +	[M+H]+	5
357	Clotrimazole	23593-75-1	C22H17ClN2	344.11	ESI +	[M+Na]+	6
358	Cloxacilline	61-72-3	C19H18ClN3O5S	435.07	ESI +	[M+H]+	8
359	Clozapine	5786-21-0	C18H19ClN4	326.13	ESI +	[M+H]+	5
360	Cocaeethylene	529-38-4	C18H23NO4	317.16	ESI +	[M+H]+	5
361	Cocaeethylene-D3	136765-30-5	C18H20NO4D3	320.18	ESI +	[M+H]+	2
362	Cocaine	50-36-2	C17H21NO4	303.15	ESI +	[M+H]+	5
363	Cocaine-D3	65266-73-1	C17H18NO4D3	306.17	ESI +	[M+H]+	2
364	Codeine	76-57-3	C18H21NO3	299.15	ESI +	[M+H]+	5
365	Colchicine	64-86-8	C22H25NO6	399.17	ESI +	[M+H]+	9
366	Convallatoxin	508-75-8	C29H42O10	550.28	ESI +	[M+NH4]+	10
367	Cortisone	53-06-5	C21H28O5	360.19	ESI +	[M+H]+	5
368	Cortivazol	1110-40-3	C32H38N2O5	530.28	ESI +	[M+H]+	5
369	Coumachlore	81-82-3	C19H15ClO4	342.07	ESI +	[M+H]+	10
370	Coumafuryl	117-52-2	C17H14O5	298.08	ESI +	[M+H]+	8
371	Coumaphos	56-72-4	C14H16ClO5PS	362.01	ESI +	[M+H]+	5
372	Coumarine	91-64-5	C9H6O2	146.04	ESI +	[M+H]+	5
373	Coumatetralyl	5836-29-3	C19H16O3	292.11	ESI +	[M+H]+	10
374	CP 47 497	70434-82-1	C21H34O2	318.26	ESI -	[M-H]-	4
375	Crimidine	535-89-7	C7H10ClN3	171.06	ESI +	[M+H]+	5

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
376	Crotaline	315-22-0	C16H23NO6	325.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
377	Cyamemazine	3546-03-0	C19H21N3S	323.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
378	Cyanazine	21725-46-2	C8H13CIN6	240.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
379	Cyclandelate	456-59-7	C17H24O3	276.17	ESI +	[M+Na] ⁺	7
380	Cyclobenzaprine	303-53-7	C20H21N	275.17	ESI +	[M+H] ⁺	6
381	Cycloguanil	516-21-2	C11H14CIN5	251.09	ESI +	[M+H] ⁺	10
382	Cycloheximide	66-81-9	C15H23NO4	281.16	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
383	Cyclothiazide	2259-96-3	C14H16CIN3O4S2	389.03	ESI +	[M+NH4] ⁺	9
384	Cycloxydim	101205-02-1	C17H27NO3S	325.17	ESI +	[M+H] ⁺	9
385	Cyflufenamide	180409-60-3	C20H17F5N2O2	412.12	ESI +	[M+H] ⁺	10
386	Cyhexatin	13121-70-5	C18H34OSn	386.16	ESI -	[M-H] ⁻	4
387	Cymiazole	61676-87-7	C12H14N2S	218.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
388	Cymoxanil	57966-95-7	C7H10N4O3	198.08	ESI +	[M+H] ⁺	12
389	Cyproconazole	94361-06-5	C15H18CIN3O	291.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
390	Cyprodenate	15585-86-1	C13H25NO2	227.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
391	Cyprodinil	121552-61-2	C14H15N3	225.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
392	Cyproheptadine	129-30-3	C21H21N	287.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
393	Cytosine	71-30-7	C4H5N3O	111.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
394	Dabigatran	211914-51-1	C25H25N7O3	471.20	ESI +	[M+H] ⁺	10
395	Dacarbazine	4342-03-4	C8H10N6O	182.09	ESI +	[M+H] ⁺	7
396	Daminozide	1596-84-5	C8H12N2O3	160.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
397	Danazol	17230-88-5	C22H27NO2	337.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
398	Dantrolene	7261-97-4	C14H10N4O5	314.07	ESI +	[M+H] ⁺	9
399	Dapsone	80-08-0	C12H12N2O2S	248.06	ESI +	[M+H] ⁺	10
400	Darunavir	206361-99-1	C27H37N3O7S	547.24	ESI +	[M+H] ⁺	9
401	DCPMU	3567-62-2	C8H8Cl2N2O	218.00	ESI +	[M+H] ⁺	9
402	DCPU	13142-57-9	C7H8Cl2N2O	203.99	ESI +	[M+H] ⁺	10
403	DEA (2,6-diethylaniline)	579-86-8	C10H15N	149.12	ESI +	[M+H] ⁺	3
404	DEET	134-62-3	C12H17NO	191.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
405	Deferoxamine	70-51-9	C25H48N8O8	560.35	ESI +	[M+H] ⁺	10
406	Dehydronorketamine	57683-62-2	C12H12CINO	221.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
407	Deltamethrine	52918-63-5	C22H19Br2NO3	502.97	ESI +	[M+2+NH4] ⁺	23
408	Demeton-s	126-75-0	C8H19O3PS2	258.05	ESI +	[M+H] ⁺	6
409	Demeton-s-methyl	919-86-8	C8H15O3PS2	230.02	ESI +	[M+H] ⁺	2
410	Demeton-s-methyl-sulfone	17040-19-6	C8H15O5PS2	262.01	ESI +	[M+H] ⁺	10
411	Demexiptiline	24701-51-7	C18H18N2O	278.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
412	Demoxepam	963-39-3	C15H11CIN2O2	286.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
413	Deoxyguanosine	961-07-9	C10H13N5O4	267.10	ESI +	[M+H] ⁺	8
414	Desacetyldiltiazem	42399-40-6	C20H24N2O3S	372.15	ESI +	[M+H] ⁺	7
415	Desalkylflurazepam	2886-65-9	C15H10CIFN2O	288.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
416	Desalkylflurazepam-D4	1286430-01-0	C15H8CIFN2OD4	292.07	ESI +	[M+H] ⁺	2
417	Deschloroetizolam	40054-73-7	C17H16N4S	308.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
418	Desethylamiodarone	83409-32-9	C23H25I2NO3	616.99	ESI +	[M+H] ⁺	5
419	Desipramine	50-47-5	C18H22N2	266.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
420	Deslanoside	17598-65-1	C47H74O19	942.48	ESI -	[M-H] ⁻	5
421	Desmedipham	13684-56-5	C16H16N2O4	300.11	ESI +	[M+NH4] ⁺	11
422	Desmethylcitalopram	144025-14-9	C19H18FN2O	310.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
423	Desmethylclomipramine	303-46-0	C18H21CIN2	300.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
424	Desmethylflunitrazepam	2558-30-7	C15H10FN3O3	299.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
425	Desmethylflunitrazepam-D4	1397234-19-3	C15H8FN3O3D4	303.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
426	Desmethylmianserin	71936-92-0	C17H18N2	250.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
427	Desmethylmirtazapine	61337-68-6	C16H17N3	251.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
428	Desmethylsertraline	87857-41-8	C16H15CIN2	291.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
429	Desmethylsibutramine	259731-39-0	C16H24CIN	265.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
430	Desmethylvenlafaxine	93413-62-8	C16H25NO2	263.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
431	Desmetryn	1014-69-3	C8H15N5S	213.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
432	DETP	2465-65-8	C4H10O3PS	169.01	ESI -	[M] ⁻	4
433	Dexamethasone	50-02-2	C22H29FO5	392.20	ESI +	[M+Na] ⁺	5
434	Dexchlorpheniramine	25523-97-1	C16H19CIN2	274.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
435	Dexfenfluramine	3239-44-9	C12H16F3N	231.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
436	Dextromethorphan	125-71-3	C18H25NO	271.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
437	Dextropropoxyphene	469-62-5	C22H29NO2	339.22	ESI +	[M+H] ⁺	4
438	Diacetolol	22568-64-5	C16H24N2O4	308.17	ESI +	[M+H] ⁺	9
439	Dialifos	10311-84-9	C14H17CINO4PS2	393.00	ESI +	[M+H] ⁺	15
440	Diazepam	439-14-5	C16H13CIN2O	284.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
441	Diazepam-D5	65854-76-4	C16H8CIN2OD5	289.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
442	Diazinon	333-41-5	C12H21N2O3PS	304.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
443	Diazoxide	364-98-7	C8H7CIN2O2S	229.99	ESI +	[M+H] ⁺	16
444	Dibutyl phthalate (DBP)	84-74-2	C16H22O4	278.15	ESI -	[M-H] ⁻	3
445	Dicamba	1918-00-9	C8H8Cl2O3	219.97	ESI -	[M-H] ⁻	1
446	Dichlobenil	1194-65-6	C7H3Cl2N C9H11Cl2FN2O2S	170.96	ESI +	[M+H] ⁺	5
447	Dichlofluanid	1085-98-9	2	331.96	ESI +	[M+NH4] ⁺	9
448	Dichlorprop	120-36-5	C9H8Cl2O3	233.99	ESI -	[M-H] ⁻	2
449	Dichlorvos	62-73-7	C4H7Cl2O4P	219.95	ESI +	[M+H] ⁺	6
450	Didazepam	2894-68-0	C16H12Cl2N2O	318.03	ESI +	[M+H] ⁺	5

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
451	Didlofenac	15307-86-5	C14H11Cl2NO2	295.02	ESI +	[M+H] ⁺	8
452	Dicoumarol	66-76-2	C19H12O6	336.06	ESI +	[M+H] ⁺	7
453	Didanosine	69655-05-6	C10H12N4O3	236.09	ESI -	[M-H] ⁻	5
454	Didesmethylamitriptyline	4444-42-2	C18H19N	249.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
455	Didesmethylsibutramine	84484-78-6	C15H22ClN	251.14	ESI +	[M+H] ⁺	6
456	Diethofencarb	87130-20-9	C14H21NO4	267.15	ESI +	[M+H] ⁺	6
457	Diethylthiophosphate (DEDTP)	298-06-6	C4H11O2PS2	185.99	ESI -	[M-H] ⁻	4
458	Diethylphosphate	598-02-7	C4H11O4P	154.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
459	Difenacoum	56073-07-5	C31H24O3	444.17	ESI +	[M+H] ⁺	10
460	Difenoconazole	119446-68-3	C19H17Cl2N3O3	405.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
461	Difethialone	104653-34-1	C31H23BrO2S	538.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
462	Diffubenzuron	35367-38-5	C14H9ClF2N2O2	310.03	ESI +	[M+H] ⁺	10
463	Diffufenican	83164-33-4	C19H11F5N2O2	394.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
464	Difunisal	22494-42-4	C13H8F2O3	250.04	ESI -	[M-H] ⁻	4
465	Digitoxigenin	143-62-4	C23H34O4	374.25	ESI +	[M+H] ⁺	5
466	Digitoxin	71-63-6	C41H64O13	764.43	ESI +	[M+Na] ⁺	3
467	Digoxigenin	1672-46-4	C23H34O5	390.24	ESI +	[M+H] ⁺	4
468	Digoxigenin monodigitoxoside	5352-63-6	C29H44O8	520.30	ESI +	[M+H] ⁺	10
469	Digoxigenine-bis-digitoxoside	5297-05-2	C35H54O11	650.37	ESI +	[M+H] ⁺	5
470	Digoxine	20830-75-5	C41H64O14	780.43	ESI +	[M+Na] ⁺	7
471	Dihexyverine	561-77-3	C20H35NO2	321.27	ESI +	[M+H] ⁺	5
472	Dihydralazine	484-23-1	C8H10N6	190.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
473	Dihydrocodeine	125-28-0	C18H23NO3	301.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
474	Dihydrocodeine-D3	not-known	C18H20NO3D3	304.19	ESI +	[M+H] ⁺	2
475	Dihydroergotamine	511-12-6	C33H37N5O5	583.28	ESI +	[M+H] ⁺	15
476	Diltiazem	42399-41-7	C22H26N2O4S	414.16	ESI +	[M+H] ⁺	9
477	Dimefuron	34205-21-5	C15H19ClN4O3	338.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
478	Dimethoate	60-51-5	C5H12NO3PS2	229.00	ESI +	[M+H] ⁺	5
479	Dimethomorph	110488-70-5	C21H22ClNO4	387.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
480	Dimethylthiophosphate (DMDTP)	756-80-9	C2H7O2PS2	157.96	ESI -	[M-H] ⁻	5
481	Dinocap	39300-45-3	C18H24N2O6	364.16	ESI +	[M+NH4] ⁺	6
482	Dinotefuran	165252-70-0	C7H14N4O3	202.11	ESI +	[M+H] ⁺	9
483	Dinoterb	1420-07-1	C10H12N2O5	240.07	ESI -	[M-H] ⁻	5
484	Diothiepin	113-53-1	C19H21NS	295.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
485	Dioxathion	78-34-2	C12H26O6P2S4	456.01	ESI +	[M+Na] ⁺	4
486	Diphacinone	82-66-6	C23H16O3	340.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
487	Diphenhydramine	58-73-1	C17H21NO	255.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
488	Diphenylamine	122-39-4	C12H11N	169.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
489	Diprophylline	479-18-5	C10H14N4O4	254.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
490	Dipyridamole	58-32-2	C24H40N8O4	504.32	ESI +	[M+H] ⁺	5
491	Disopyramide	3737-09-5	C21H29N3O	339.23	ESI +	[M+H] ⁺	5
492	Disulfirame	97-77-8	C10H20N2S4	296.05	ESI +	[M+H] ⁺	10
493	Disulfoton	298-04-4	C8H19O2PS3	274.03	ESI +	[M+H] ⁺	3
494	Diuron	330-54-1	C9H10Cl2N2O	232.02	ESI +	[M+H] ⁺	10
495	D-limonene	138-86-3	C10H16	136.13	ESI +	[M+Na] ⁺	3
496	DMPF (2,5-Dimethyl-4-(1-pyrrolidinyl)-3(2H)-furanone)	80873-59-2	C10H15NO2	181.11	ESI +	[M+H] ⁺	4
497	DMST	68840-71-9	C9H14N2O2S	214.08	ESI +	[M+H] ⁺	7
498	DOB	64638-07-9	C11H16BrNO2	273.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
499	Dodemorh	1593-77-7	C18H35NO	281.27	ESI +	[M+H] ⁺	5
500	Dodine	2439-10-3	C15H33N3O2	227.24	ESI +	[M+H] ⁺	5
501	DOM	15588-95-1	C12H19NO2	209.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
502	Dopamine	51-61-6	C8H11NO2	153.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
503	Doxepin	1668-19-5	C19H21NO	279.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
504	Doxylamine	469-21-6	C17H22N2O	270.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
505	DPP (Diphenylprolinol)	22348-32-9	C17H19NO	253.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
506	Droperidol	548-73-2	C22H22FN3O2	379.17	ESI +	[M+H] ⁺	4
507	Duloxetine	116539-59-4	C18H19NOS	297.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
508	Ecgonine methylester	7143-09-1	C10H17NO3	199.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
509	Ecgonine methylester-D3	136765-34-9	C10H14NO3D3	202.14	ESI +	[M+H] ⁺	2
510	Econazole	27220-47-9	C18H15Cl3N2O	380.02	ESI +	[M+H] ⁺	3
511	EDDP	30223-73-5	C20H23N	277.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
512	EDDP-D3	136765-23-6	C20H20ND3	280.20	ESI +	[M+H] ⁺	2
513	Edoxaban	480449-70-5	C24H30ClN7O4S	547.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
514	Efavirenz	154598-52-4	C14H9ClF3NO2	315.03	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
515	Emamectin	119791-41-2	C49H75NO13	885.52	ESI +	[M+H] ⁺	3
516	Embutramide	15687-14-6	C17H27NO3	293.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
517	Emtricitabine	143491-57-0	C8H10FN3O3S	247.04	ESI +	[M+H] ⁺	7
518	Enalapril	75847-73-3	C20H28N2O5	376.20	ESI +	[M+H] ⁺	15
519	Endosulfan-alcohol	2157-19-9	C9H8Cl6O2	357.87	ESI -	[M+2-H] ⁻	7
520	Endosulfan-alpha	959-98-8	C9H8Cl6O3S	403.82	ESI -	[M-H] ⁻	3
521	Endosulfan-beta	33213-65-9	C9H8Cl6O3S	403.82	ESI -	[M-H] ⁻	3
522	Endosulfan-ether	3369-52-6	C9H8Cl6O	339.85	ESI +	[M+Na] ⁺	8
523	Endosulfan-sulfate	1031-07-8	C9H8Cl6O4S	419.81	ESI -	[M+2-H] ⁻	2
524	Ephedrine	299-42-3	C10H15NO	165.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
525	Ephedrine-D3	285979-73-9	C10H12NOD3	168.13	ESI +	[M+H] ⁺	2

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
526	Eplerenone	107724-20-9	C24H30O6	414.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
527	Epoxiconazole	135319-73-2	C17H13ClFN3O	329.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
528	Erythrohydrobupropion	119802-88-5	C13H20ClNO	241.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
529	Erythromycine	114-07-8	C37H67NO13	733.46	ESI +	[M+H] ⁺	5
530	Eserine	57-47-6	C15H21N3O2	275.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
531	Esfenvalerate	66230-04-4	C25H22ClNO3	419.13	ESI +	[M+NH4] ⁺	4
532	Esmolol	81147-92-4	C16H25NO4	295.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
533	Estazolam	29975-16-4	C16H11ClN4	294.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
534	Etacrynic acid	58-54-8	C13H12Cl2O4	302.01	ESI +	[M+H] ⁺	9
535	Ethambutol	74-55-5	C10H24N2O2	204.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
536	Ethenzamide	938-73-8	C9H11NO2	165.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
537	Ethephon	16672-87-0	C2H6ClO3P	143.97	ESI -	[M-] ⁻	2
538	Ethidimuron	30043-49-3	C7H12N4O3S2	264.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
539	Ethiofencarb	29973-13-5	C11H15NO2S	225.08	ESI +	[M+H] ⁺	11
540	Ethiofencarb-sulfone	53380-23-7	C11H15NO4S	257.07	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
541	Ethiofencarb-sulfoxide	53380-22-6	C11H15NO3S	241.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
542	Ethion	563-12-2	C9H22O4P2S4	383.99	ESI +	[M+H] ⁺	11
543	Ethoheptazine	77-15-6	C16H23NO2	261.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
544	Ethoprophos	13194-48-4	C8H19O2PS2	242.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
545	Ethoxyquin	91-53-2	C14H19NO	217.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
546	Ethyl biscoumacetate	548-00-5	C22H16O8	408.08	ESI -	[M-] ⁻	13
547	Ethyl loflazepate	29177-84-2	C18H14ClFN2O3	360.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
548	Ethylene-thiouree	96-45-7	C3H8N2S	102.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
549	Ethylmorphine	76-58-4	C19H23NO3	313.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
550	Etidocaine	36637-18-0	C17H28N2O	276.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
551	Etifoxine	21715-46-8	C17H17ClN2O	300.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
552	Etilefrine	709-55-7	C10H15NO2	181.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
553	Etizolam	40054-69-1	C17H15ClN4S	342.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
554	Etodolac	41340-25-4	C17H21NO3	287.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
555	Etofenprox	80844-07-1	C25H28O3	376.20	ESI +	[M+NH4] ⁺	5
556	Etomidate	33125-97-2	C14H16N2O2	244.12	ESI +	[M+H] ⁺	6
557	Etoxazole	153233-91-1	C21H23F2NO2	359.17	ESI +	[M+H] ⁺	4
558	Everolimus	159351-69-6	C53H83NO14	957.58	ESI +	[M+Na] ⁺	15
559	Exemestane	107868-30-4	C20H24O2	296.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
560	Famotidine	76824-35-6	C8H15N7O2S3	337.04	ESI +	[M+H] ⁺	14
561	Febarbamate	13246-02-1	C20H27N3O6	405.19	ESI +	[M+H] ⁺	13
562	Felbamate	25451-15-4	C11H14N2O4	238.10	ESI +	[M+H] ⁺	15
563	Felodipine	72509-76-3	C18H19Cl2NO4	383.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
564	Fenamiphos	22224-92-6	C13H22NO3PS	303.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
565	Fenamiphos-sulfone	31972-44-8	C13H22NO5PS	335.10	ESI +	[M+H] ⁺	15
566	Fenamiphos-sulfoxyde	31972-43-7	C13H22NO4PS	319.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
567	Fenarimol	60168-88-9	C17H12Cl2N2O	330.03	ESI +	[M+H] ⁺	4
568	Fenazaquin	120928-09-8	C20H22N2O	306.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
569	Fenbuconazole	114369-43-6	C19H17ClN4	336.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
570	Fenbufen	36330-85-5	C16H14O3	254.09	ESI +	[M+H] ⁺	10
571	Fencamfamine	1209-98-9	C15H21N	215.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
572	Fenethyline	3736-08-1	C18H23N5O2	341.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
573	Fenhexamid	126833-17-8	C14H17Cl2NO2	301.06	ESI +	[M+H] ⁺	10
574	Fenitrothion	122-14-5	C9H12NO5PS	277.02	ESI +	[M+H] ⁺	5
575	Fenobucarb	3766-81-2	C12H17NO2	207.13	ESI +	[M+H] ⁺	11
576	Fenofibrate	49562-28-9	C20H21ClO4	360.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
577	Fenoterol	13392-18-2	C17H21NO4	303.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
578	Fenoverine	37561-27-6	C26H25N3O3S	459.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
579	Fenoxycarb	72490-01-8	C17H19NO4	301.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
580	Fenozolone	15302-16-6	C11H12N2O2	204.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
581	fenpropathrin	39515-41-8	C22H23NO3	349.17	ESI +	[M+H] ⁺	9
582	Fenpropimorph	67306-03-0	C20H33NO	303.26	ESI +	[M+H] ⁺	5
583	Fenproporex	15686-61-0	C12H16N2	188.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
584	Fenpyrazamine	473798-59-3	C17H21N3O2S	331.14	ESI +	[M+H] ⁺	10
585	Fenpyroximate	134098-61-6	C24H27N3O4	421.20	ESI +	[M+H] ⁺	6
586	Fentanyl	437-38-7	C22H28N2O	336.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
587	Fenthion	55-38-9	C10H15O3PS2	278.02	ESI +	[M+H] ⁺	5
588	Fenthion sulfone	3761-42-0	C10H15O5PS2	310.01	ESI +	[M+H] ⁺	11
589	Fenthion sulfoxide	3761-41-9	C10H15O4PS2	294.01	ESI +	[M+H] ⁺	5
590	Fentichlor	97-24-5	C12H8Cl2O2S	285.96	ESI -	[M-] ⁻	5
591	Fentin	76-87-9	C18H16OSn	368.02	ESI +	[M+H] ⁺	4
592	Fenuron	101-42-8	C9H12N2O	164.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
593	Fenvalerate	51630-58-1	C25H22ClNO3	419.13	ESI +	[M+NH4] ⁺	5
594	Finasteride	98319-26-7	C23H36N2O2	372.28	ESI +	[M+H] ⁺	5
595	Fipronil	120068-37-3	C12H4Cl2F6N4OS C12H4Cl2F6N4O2	435.94	ESI -	[M-] ⁻	5
596	Fipronil sulfone	120068-36-2	S	451.93	ESI -	[M-] ⁻	5
597	Flazasulfuron	104040-78-0	C13H12F3N5O5S	407.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
598	Flecainide	54143-55-4	C17H20F6N2O3	414.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
599	Floocumafen	90035-08-8	C33H25F3O4	542.17	ESI +	[M+H] ⁺	10
600	Floctafenin	23779-99-9	C20H17F3N2O4	408.11	ESI +	[M+H] ⁺	10

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
601	Flonicamid	158062-67-0	C9H8F3N3O	229.05	ESI +	[M+H]+	5
602	Florasulam	145701-23-1	C12H8F3N5O3S	359.03	ESI +	[M+H]+	10
603	Fluanisone	1480-19-9	C21H25FN2O2	356.19	ESI +	[M+H]+	4
604	Fluazinam	79622-59-6	C13H4Cl2F6N4O4	463.95	ESI -	[M-H]-	5
605	Flubendazole	31430-15-6	C16H12FN3O3	313.09	ESI +	[M+H]+	9
606	Flubromazepam	2647-50-9	C15H10BrFN2O	332.00	ESI +	[M+H]+	9
607	Flubromazolam	612526-40-6	C17H12BrFN4	370.02	ESI +	[M+H]+	5
608	Fluconazole	86386-73-4	C13H12F2N8O	306.10	ESI +	[M+H]+	7
609	Flucythrinate	70124-77-5	C26H23F2NO4	451.16	ESI +	[M+NH4]+	4
610	Flucytosine	2022-85-7	C4H4FN3O	129.03	ESI +	[M+H]+	4
611	Fludioxonil	131341-86-1	C12H8F2N2O2	248.04	ESI +	[M+NH4]+	11
612	Flufenoxuron	101463-69-8	C21H11ClF6N2O3	488.04	ESI +	[M+H]+	3
613	Fluindione	957-56-2	C15H9FO2	240.06	ESI +	[M+H]+	3
614	Flumazenil	78755-81-4	C15H14FN3O3	303.10	ESI +	[M+H]+	5
615	Flumethasone	2135-17-3	C22H28F2O5	410.19	ESI +	[M+H]+	5
616	Flunitrazepam	1622-62-4	C16H12FN3O3	313.09	ESI +	[M+H]+	5
617	Flunitrazepam-D7	1286448-08-5	C16H5FN3O3D7	320.13	ESI +	[M+H]+	2
618	Fluometuron	2164-17-2	C10H11F3N2O	232.08	ESI +	[M+H]+	9
619	Fluopyram	658066-35-4	C16H11ClF6N2O	396.05	ESI +	[M+H]+	5
620	Fluoxetine	54910-99-3	C17H18F3NO	309.13	ESI +	[M+H]+	2
621	Flupenthixol	2709-56-0	C23H25F3N2OS	434.16	ESI +	[M+H]+	5
622	Fluphenazine	69-23-8	C22H26F3N3OS	437.17	ESI +	[M+H]+	5
623	Fluquinconazole	136426-54-5	C16H8Cl2FN5O	375.01	ESI +	[M+H]+	5
624	Flurazepam	17617-23-1	C21H23ClFN3O	387.15	ESI +	[M+H]+	5
625	Flurochloridone	61213-25-0	C12H10Cl2F3NO	311.01	ESI +	[M+H]+	5
626	Fluroxypyr	69377-81-7	C7H5Cl2FN2O3	253.97	ESI +	[M+H]+	8
627	Fluroxypyr-1-methylheptylester	81406-37-3	C15H21Cl2FN2O3	366.09	ESI +	[M+H]+	5
628	Flutamone	96525-23-4	C18H14FN3O2	333.10	ESI +	[M+H]+	10
629	Flusilazole	85509-19-9	C16H15F2N3Si	315.10	ESI +	[M+H]+	5
630	Flutamide	13311-84-7	C11H11F3N2O3	276.07	ESI -	[M-H]-	5
631	Flutriafol	76674-21-0	C16H13F2N3O	301.10	ESI +	[M+H]+	5
632	Fluvalinate	69409-94-5	C26H22ClF3N2O3	502.13	ESI +	[M+H]+	14
633	Fluvoxamine	54739-18-3	C15H21F3N2O2	318.16	ESI +	[M+H]+	5
634	Folinic acid	58-05-9	C20H23N7O7	473.17	ESI +	[M+H]+	9
635	Folpet	133-07-3	C9H4Cl3NO2S	294.90	ESI +	[M+2+H]+	5
636	Fonofos	944-22-9	C10H15OPS2	246.03	ESI +	[M+H]+	5
637	Foramsulfuron	173159-57-4	C17H20N6O7S	452.11	ESI +	[M+H]+	10
638	Formetanate	22259-30-9	C11H15N3O2	221.12	ESI +	[M+H]+	5
639	Fosetyl-aluminium	39148-24-8	C2H7O3P	110.01	ESI +	[M+H]+	1
640	Fotemustine	92118-27-9	C9H19ClN3O5P	315.08	ESI +	[M+H]+	5
641	Furathiocarb	65907-30-4	C18H26N2O5S	382.16	ESI +	[M+H]+	5
642	Furosemide	54-31-9	C12H11ClN2O5S	330.01	ESI -	[M-H]-	5
643	Gabapentine	60142-96-3	C9H17NO2	171.13	ESI +	[M+H]+	5
644	Ganciclovir	82410-32-0	C9H13N5O4	255.10	ESI +	[M+H]+	8
645	Gemfibrozil	25812-30-0	C15H22O3	250.16	ESI +	[M+H]+	10
646	Geneserine salicylate	25573-43-7	C15H21N3O3	291.16	ESI +	[M+H]+	5
647	GHB	591-81-1	C4H8O3	104.05	ESI -	[M-H]-	2
648	Gitoxin	4562-36-1	C41H64O14	780.43	ESI +	[M+Na]+	5
649	Glafenine	3820-67-5	C19H17ClN2O4	372.09	ESI +	[M+H]+	10
650	Glibenclamide	10238-21-8	C23H28ClN3O5S	493.14	ESI +	[M+H]+	17
651	Glibomuride	28944-48-9	C18H26N2O4S	366.16	ESI +	[M+H]+	12
652	Gliclazide	21187-98-4	C15H21N3O3S	323.13	ESI +	[M+H]+	13
653	Glimepiride	93479-97-1	C24H34N4O5S	490.22	ESI +	[M+H]+	11
654	Glipizide	29094-61-9	C21H27N5O4S	445.18	ESI +	[M+H]+	12
655	Glyphosate	1071-83-6	C3H8NO5P	169.01	ESI +	[M+H]+	10
656	Griseofulvin	126-07-8	C17H17ClO6	352.07	ESI +	[M+H]+	5
657	Guanfacine	29110-47-2	C9H9Cl2N3O	245.01	ESI +	[M+H]+	5
658	Halofantrine	69756-53-2	C26H30Cl2F3NO	499.17	ESI +	[M+H]+	4
659	Haloperidol	52-86-8	C21H23ClFN2O2	375.14	ESI +	[M+H]+	4
660	Haman	486-84-0	C12H10N2	182.08	ESI +	[M+H]+	5
661	Hamine	442-51-3	C13H12N2O	212.09	ESI +	[M+H]+	8
662	Heptabarbital	509-86-4	C13H18N2O3	250.13	ESI -	[M-H]-	5
663	Heptachlor	76-44-8	C10H5Cl7	369.82	ESI -	[M-H]-	5
664	Heptachlor-endo	1024-57-3	C10H5Cl7O	385.82	ESI -	[M-H]-	5
665	Heptachlor-exo-epoxide	28044-83-9	C10H5Cl7O	385.82	ESI -	[M-H]-	5
666	Heptaminol	372-66-7	C8H19NO	145.15	ESI +	[M+H]+	5
667	Heptenophos	23560-59-0	C9H12ClO4P	250.02	ESI +	[M+H]+	10
668	Heroin	561-27-3	C21H23NO5	369.16	ESI +	[M+H]+	10
669	Hexaconazole	79983-71-4	C14H17Cl2N3O	313.07	ESI +	[M+H]+	5
670	Hexaflumuron	86479-06-3	C16H8Cl2F6N2O3	459.98	ESI -	[M-H]-	9
671	Hexazinone	51235-04-2	C12H20N4O2	252.16	ESI +	[M+H]+	8
672	Hexobarbital	56-29-1	C12H16N2O3	236.12	ESI -	[M-H]-	1
673	Hexythiazox	78587-05-0	C17H21ClN2O2S	352.10	ESI +	[M+H]+	5
674	Hydramethylnon	67485-29-4	C25H24F6N4	494.19	ESI +	[M+H]+	10
675	Hydrochlorothiazide	58-93-5	C7H8ClN3O4S2	296.96	ESI -	[M-H]-	5

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
676	Hydrocodone	125-29-1	C18H21NO3	299.15	ESI +	[M+H] ⁺	11
677	Hydrocortisone	50-03-3	C21H30O5	362.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
678	Hydroflumethiazide	135-09-1	C8H8F3N3O4S2	330.99	ESI -	[M-H] ⁻	5
679	Hydromorphone	466-99-9	C17H19NO3	285.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
680	Hydroquinidine	1435-55-8	C20H26N2O2	326.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
681	Hydroxylalprazolam	37115-43-8	C17H13ClN4O	324.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
682	Hydroxybupropion	92264-81-8	C13H18ClNO2	255.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
683	Hydroxychloroquine	118-42-3	C18H26ClN3O	335.18	ESI +	[M+H] ⁺	10
684	Hydroxythaloferadol	34104-67-1	C21H25ClFNO2	377.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
685	Hydroxyitraconazole	112559-91-8	C35H38Cl2N8O5	720.23	ESI +	[M+H] ⁺	7
686	Hydroxy-NTN (5-Hydroxy-Imidacloprid)	380912-09-4	C9H10ClN5O3	271.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
687	Hydroxytriazolam-D4	145225-01-0	C17H8Cl2N4O4	362.06	ESI +	[M+H] ⁺	2
688	Hydroxytryptophan	114-03-4	C11H12N2O3	220.08	ESI +	[M+H] ⁺	4
689	Hydroxyzine	68-88-2	C21H27ClN2O2	374.18	ESI +	[M+H] ⁺	3
690	Ibogaine	83-74-9	C20H26N2O	310.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
691	Ibuprofen	51146-56-6	C13H18O2	206.13	ESI -	[M-H] ⁻	7
692	Imazalil	73790-28-0	C14H14Cl2N2O	296.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
693	Imidacloprid	105827-78-9	C9H10ClN5O2	255.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
694	Imipramine	50-49-7	C19H24N2	280.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
695	IMPY	2814-20-2	C8H12N2O	152.09	ESI +	[M+H] ⁺	6
696	Indapamide	26807-65-8	C18H16ClN3O3S	365.06	ESI +	[M+H] ⁺	15
697	Indinavir	150378-17-9	C36H47N5O4	613.36	ESI +	[M+H] ⁺	15
698	Indomethacin	53-86-1	C19H16ClNO4	357.08	ESI +	[M+H] ⁺	19
699	Indoxacarb	173584-44-6	C22H17ClF3N3O7	527.07	ESI +	[M+H] ⁺	9
700	Ioxynil	1689-83-4	C7H3I2NO	370.83	ESI -	[M-H] ⁻	4
701	Iprodione	36734-19-7	C13H13Cl2N3O3	329.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
702	Iproniazide	54-92-2	C9H13N3O	179.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
703	Isaconazole	27523-40-6	C18H14Cl4N2O	413.99	ESI +	[M+H] ⁺	10
704	Iso LSD	2126-78-5	C20H25N3O	323.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
705	Isoniazide	54-85-3	C6H7N3O	137.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
706	Isophenphos	25311-71-1	C15H24NO4PS	345.12	ESI +	[M+H] ⁺	8
707	Isoprenaline	7683-59-2	C11H17NO3	211.12	ESI +	[M+H] ⁺	9
708	Isoprocab	2631-40-5	C11H15NO2	193.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
709	Isoproturon	34123-59-6	C12H18N2O	206.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
710	Isoxaben	82558-50-7	C18H24N2O4	332.17	ESI +	[M+H] ⁺	12
711	Isradipine	75695-93-1	C19H21N3O5	371.15	ESI +	[M+H] ⁺	14
712	Itraconazole	84625-61-6	C35H38Cl2N8O4	704.24	ESI +	[M+H] ⁺	5
713	Ivermectine	70288-86-7	C48H74O14	874.51	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
714	JWH-007	155471-10-6	C25H25NO	355.19	ESI +	[M+H] ⁺	4
715	JWH-015	155471-08-2	C23H21NO	327.16	ESI +	[M+H] ⁺	4
716	JWH-018	209414-07-3	C24H23NO	341.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
717	JWH-018 pentanoic acid	1254475-87-0	C24H21NO3	371.15	ESI +	[M+H] ⁺	9
718	JWH-019	209414-08-4	C25H25NO	355.19	ESI +	[M+H] ⁺	4
719	JWH-020	209414-09-5	C26H27NO	369.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
720	JWH-073	208987-48-8	C23H21NO	327.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
721	JWH-081	210179-46-7	C25H25NO2	371.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
722	JWH-122	619294-47-2	C25H25NO	355.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
723	JWH-203	864445-54-5	C21H22ClNO	339.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
724	JWH-210	824980-64-7	C26H27NO	369.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
725	JWH-250	864445-43-2	C22H25NO2	335.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
726	Kavain	3155-48-4	C14H14O3	230.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
727	Ketamine	6740-88-1	C13H16ClNO	237.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
728	Ketoconazole	65277-42-1	C26H28Cl2N4O4	530.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
729	Ketoprofen	22071-15-4	C16H14O3	254.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
730	Kresoxim-methyl	143390-89-0	C18H19NO4	313.13	ESI +	[M+H] ⁺	11
731	Labetalol	36894-69-6	C19H24N2O3	328.18	ESI +	[M+H] ⁺	10
732	L-abrine	526-31-8	C12H14N2O2	218.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
733	Lacidipine	103890-78-4	C26H33NO6	455.23	ESI +	[M+NH4] ⁺	15
734	Lacosamide	175481-36-4	C13H18N2O3	250.13	ESI +	[M+H] ⁺	6
735	Lambda-cyhalothrine	91465-08-6	C23H19ClF3NO3	449.10	ESI +	[M+NH4] ⁺	1
736	Lamivudine	134678-17-4	C8H11N3O3S	229.05	ESI +	[M+H] ⁺	6
737	Lamotrigine	84057-84-1	C9H7Cl2N5	255.01	ESI +	[M+H] ⁺	5
738	Lanatoside C	17575-22-3	C49H76O20	984.49	ESI -	[M-H] ⁻	6
739	Laudanosine	2688-77-9	C21H27NO4	357.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
740	Lenacil	2164-08-1	C13H18N2O2	234.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
741	Letrozole	112809-51-5	C17H11N5	285.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
742	Letrozole-D4	1133712-96-5	C17H7N5D4	289.13	ESI -	[M-H] ⁻	5
743	Leuprolide	53714-56-0	C59H84N16O12	1208.65	ESI +	[ESI] ⁺	9
744	Levallorphan	152-02-03	C19H25NO	283.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
745	Levamisole	14769-73-4	C11H12N2S	204.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
746	Levetiracetam	102767-28-2	C8H14N2O2	170.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
747	Levobunolol	47141-42-4	C17H25NO3	291.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
748	Levodopa	59-92-7	C9H11NO4	197.07	ESI +	[M+H] ⁺	9
749	Levomepromazine	60-99-1	C19H24N2OS	328.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
750	Lidocaine	137-58-6	C14H22N2O	234.17	ESI +	[M+H] ⁺	5

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
751	Limonin	1180-71-8	C26H30O8	470.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
752	Lindane	58-89-9	C6H8Cl6	287.86	ESI +	[M+H] ⁺	2
753	Linuron	330-55-2	C9H10Cl2N2O2	248.01	ESI +	[M+H] ⁺	5
754	Lisinopril	83915-83-7	C21H31N3O5	405.23	ESI +	[M+H] ⁺	10
755	Lisuride	18016-80-3	C20H26N4O	338.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
756	Lomefloxacin	98079-51-7	C17H19F2N3O3	351.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
757	Loperamide	53179-11-6	C29H33ClN2O2	476.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
758	Lopinavir	192725-17-0	C37H48N4O5	628.36	ESI +	[M+H] ⁺	15
759	Loprazolam	81197-73-7	C23H21ClN6O3	464.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
760	Loratadine	79794-75-5	C22H23ClN2O2	382.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
761	Lorazepam	846-49-1	C15H10Cl2N2O2	320.01	ESI +	[M+H] ⁺	5
762	Lormetazepam	848-75-9	C16H12Cl2N2O2	334.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
763	Loxapine	1977-10-2	C18H18ClN3O	327.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
764	LSD	50-37-3	C20H25N3O	323.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
765	Lufenuron	103055-07-8	C17H8Cl2F8N2O3	509.98	ESI -	[M-H] ⁻	9
766	Malaaxon	1634-78-2	C10H19O7PS	314.06	ESI +	[M+H] ⁺	6
767	Malathion	121-75-5	C10H19O6PS2	330.04	ESI +	[M+H] ⁺	12
768	Malathion monocarboxylic acid	35884-76-5	C8H15O6PS2	302.00	ESI +	[M+H] ⁺	7
769	Maprotiline	10262-69-8	C20H23N	277.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
770	Maraviroc	376348-85-1	C29H41F2N5O	513.33	ESI +	[M+H] ⁺	14
771	MBDB	103818-48-8	C12H17NO2	207.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
772	MCPA	94-74-6	C9H9ClO3	200.02	ESI -	[M-H] ⁻	3
773	MCPB	94-81-5	C11H13ClO3	228.06	ESI -	[M-H] ⁻	3
774	M-CPP (meta-Chlorophenylpiperazine)	6840-24-0	C10H13ClN2	196.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
775	MDA	4784-17-4	C10H13NO2	179.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
776	MDA-D5	136765-42-9	C10H8NO2D5	184.13	ESI +	[M+H] ⁺	2
777	MDAI	132741-81-2	C10H11NO2	177.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
778	MDEA	82801-81-8	C12H17NO2	207.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
779	MDEA-D5	160227-43-0	C12H12NO2D5	212.16	ESI +	[M+H] ⁺	2
780	MDMA	42542-10-9	C11H15NO2	193.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
781	MDMA-D5	136765-43-0	C11H10NO2D5	198.14	ESI +	[M+H] ⁺	2
782	MDPBP (3',4'-methylenedioxy- α -pyrrolidinobutiophenone)	784985-33-7	C15H19NO3	261.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
783	Mebutamate	64-55-1	C10H20N2O4	232.14	ESI +	[M+H] ⁺	6
784	Mecarbam	2595-54-2	C10H20NO5PS2	329.05	ESI +	[M+H] ⁺	6
785	Meclofenoxate	51-68-3	C12H16ClNO3	257.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
786	Meclonazepam	58662-84-3	C16H12ClN3O3	329.06	ESI +	[M+H] ⁺	10
787	Meclozine	569-65-3	C25H27ClN2	390.19	ESI +	[M+H] ⁺	4
788	Mecoprop	7085-19-0	C10H11ClO3	214.04	ESI -	[M-H] ⁻	3
789	Medazepam	2898-12-6	C16H15ClN2	270.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
790	Medifoxamine	32359-34-5	C16H19NO2	257.14	ESI +	[M+H] ⁺	6
791	Mefenorex	17243-57-1	C12H18ClN	211.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
792	Mefloquine	53230-10-7	C17H18F6N2O	378.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
793	Menadione	58-27-5	C11H8O2	172.05	ESI +	[M+H] ⁺	4
794	Mepanipyrin	110235-47-7	C14H13N3	223.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
795	Mephedrone	1189805-46-6	C11H15NO	177.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
796	Mephesine	59-47-2	C10H14O3	182.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
797	Mepherytoin	50-12-4	C12H14N2O2	218.11	ESI +	[M+H] ⁺	6
798	Mephospholan	950-10-7	C8H16NO3PS2	269.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
799	Mepiquat	15302-91-7	C7H16N	114.13	ESI +	[M+H] ⁺	1
800	Mepivacaine	22801-44-1	C15H22N2O	246.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
801	Meprobamate	57-53-4	C9H18N2O4	218.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
802	Mepyramine	91-84-9	C17H23N3O	285.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
803	Mequitazine	29216-28-2	C20H22N2S	322.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
804	Mescaline	54-04-6	C11H17NO3	211.12	ESI +	[M+H] ⁺	6
805	Mesoridazine	5588-33-0	C21H26N2OS2	386.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
806	Mesosulfuron-methyl	208465-21-8	C17H21N5O8S2	503.08	ESI +	[M+H] ⁺	12
807	Metalaxyl	57837-19-1	C15H21NO4	279.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
808	Metaldehyde	108-62-3	C8H16O4	176.10	ESI +	[M+NH4] ⁺	2
809	Metamitron	41394-05-2	C10H10N4O	202.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
810	Metazachlor	67129-08-2	C14H16ClN3O	277.10	ESI +	[M+H] ⁺	8
811	Metformin	657-24-9	C4H11N5	129.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
812	Methacrifos	62610-77-9	C7H13O5PS	240.02	ESI +	[M+H] ⁺	9
813	Methadone	76-99-3	C21H27NO	309.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
814	Methadone-D9	1435933-74-6	C21H18NOD9	318.27	ESI +	[M+H] ⁺	5
815	Methamidophos	10265-92-6	C2H8NO2PS	141.00	ESI +	[M+H] ⁺	5
816	Methamphetamine	537-46-2	C10H15N	149.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
817	Methamphetamine-D5	60124-88-1	C10H10ND5	154.15	ESI +	[M+H] ⁺	2
818	Methaqualone	72-44-6	C16H14N2O	250.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
819	Methoathinone	5650-44-2	C10H13NO	163.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
820	Methfuroxam	28730-17-8	C14H15NO2	229.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
821	Methidathion	950-37-8	C6H11N2O4PS3	301.96	ESI +	[M+NH4] ⁺	13
822	Methiocarb	2032-65-7	C11H15NO2S	225.08	ESI +	[M+H] ⁺	12
823	Methiocarb-sulfone	2179-25-1	C11H15NO4S	257.07	ESI +	[M+H] ⁺	11
824	Methiocarb-sulfoxide	2635-10-1	C11H15NO3S	241.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
825	Methiopropamine	801156-47-8	C8H13NS	155.08	ESI +	[M+H] ⁺	5

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
826	Methocarbamol	532-03-6	C11H15NO6	241.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
827	Methomyl	16752-77-5	C5H10N2O2S	162.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
828	Methomyl-oxime	13749-94-5	C3H7NOS	105.02	ESI +	[M+H] ⁺	4
829	Methotrexate	59-05-2	C20H22N8O5	454.17	ESI +	[M+H] ⁺	15
830	Methoxetamine	1239943-76-0	C15H21NO2	247.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
831	Methoxyfenozide	161050-58-4	C22H28N2O3	368.21	ESI +	[M+H] ⁺	7
832	Methoxyphenamine	93-30-1	C11H17NO	179.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
833	Methyl digitoxin	30685-43-9	C42H86O14	794.45	ESI +	[M+Na] ⁺	2
834	Methylclothiazide	135-07-9	C9H11Cl2N3O4S2	358.96	ESI -	[M-H] ⁻	5
835	Methylephedrine	17605-71-9	C11H17NO	179.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
836	Methylmorphine-D3	70420-71-2	C18H18NO3D3	302.17	ESI +	[M+H] ⁺	2
837	Methylone	186028-79-5	C11H13NO3	207.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
838	Methylphenidate	113-45-1	C14H19NO2	233.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
839	Methysticine	495-85-2	C15H14O5	274.08	ESI +	[M+H] ⁺	6
840	Metipranolol	22664-55-7	C17H27NO4	309.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
841	Metoclopramide	364-62-5	C14H22ClN3O2	299.14	ESI +	[M+H] ⁺	10
842	Metolachlor	51218-45-2	C15H22ClNO2	283.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
843	Metolcarb	1129-41-5	C9H11NO2	165.08	ESI +	[M+H] ⁺	9
844	Metopimazine	14008-44-7	C22H27N3O3S2	445.15	ESI +	[M+H] ⁺	8
845	Metoprolol	37350-58-6	C15H25NO3	267.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
846	Metoxuron	19937-59-8	C10H13ClN2O2	228.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
847	Metronidazole	443-48-1	C6H9N3O3	171.06	ESI +	[M+H] ⁺	2
848	Metsulfuron-methyl	74223-64-6	C14H15N5O6S	381.07	ESI +	[M+H] ⁺	11
849	Mevinphos	7786-34-7	C7H13O8P	224.04	ESI +	[M+H] ⁺	11
850	Mexiletine	31828-71-4	C11H17NO	179.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
851	Mezlocillin	51481-65-3	C21H25N5O8S2	539.11	ESI +	[M+H] ⁺	15
852	MHPC (Phenmediphan metabolite)	13683-89-1	C8H9NO3	167.06	ESI +	[M+H] ⁺	10
853	Mianserin	24219-97-4	C18H20N2	264.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
854	Mianserin-D3	81957-76-8	C18H17N2D3	267.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
855	Miconazole	22916-47-8	C18H14Cl4N2O	413.99	ESI +	[M+H] ⁺	4
856	Midazolam	59467-70-8	C18H13ClFN3	325.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
857	Milbemectin A3	51596-10-2	C31H44O7	528.31	ESI +	[M+Na] ⁺	1
858	Milbemectin A4	51596-11-3	C32H46O7	542.32	ESI +	[M+Na] ⁺	4
859	Milnacipran	92623-85-3	C15H22N2O	246.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
860	Mirinone	78415-72-2	C12H9N3O	211.07	ESI +	[M+NH4] ⁺	15
861	Minoxidil	38304-91-5	C9H15N5O	209.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
862	Mirtazapine	61337-67-5	C17H19N3	265.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
863	Mivacurium	106861-44-3	C58H80N2O14	1028.56	ESI +	[ES] ⁺	9
864	Moclobemide	71320-77-9	C13H17ClN2O2	268.10	ESI +	[M+H] ⁺	4
865	Molsidomine	25717-80-0	C9H14N4O4	242.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
866	Monocrotophos	6923-22-4	C7H14NO5P	223.06	ESI +	[M+H] ⁺	9
867	Monolinuron	1746-81-2	C9H11ClN2O2	214.05	ESI +	[M+H] ⁺	9
868	Monuron	150-68-5	C9H11ClN2O	198.06	ESI -	[M-H] ⁻	3
869	Morphine	57-27-2	C17H19NO3	285.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
870	Morphine-6-β-glucuronide	20290-10-2	C23H27NO9	461.17	ESI +	[M+H] ⁺	10
871	Morphine-D3	67293-88-3	C17H16NO3D3	288.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
872	Morpholin	110-91-8	C4H9NO	87.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
873	Moxisylyte	54-32-0	C16H25NO3	279.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
874	m-toluidine	108-44-1	C7H9N	107.07	ESI +	[M+H] ⁺	4
875	Myclobutanil	89671-89-0	C15H17ClN4	288.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
876	Mycophenolic acid	24280-93-1	C17H20O6	320.13	ESI +	[M+H] ⁺	15
877	N-acetyl-dapsone	565-20-8	C14H14N2O3S	290.07	ESI +	[M+H] ⁺	16
878	Nadolol	42200-33-9	C17H27NO4	309.19	ESI +	[M+H] ⁺	6
879	Nadoxolol	54063-51-3	C14H18N2O3	260.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
880	Naftidrofuryl	31329-57-4	C24H33NO3	383.25	ESI +	[M+H] ⁺	5
881	Nalbuphine	20594-83-6	C21H27NO4	357.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
882	Naled	300-76-5	C4H7Br2Cl2O4P	377.78	ESI +	[M+2+H] ⁺	15
883	Nalmefene	55096-26-9	C21H25NO3	339.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
884	Naloxone	465-65-6	C19H21NO4	327.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
885	Naloxone-D5	1261079-38-2	C19H16NO4D5	332.18	ESI +	[M+H] ⁺	2
886	Naltrexone	16590-41-3	C20H23NO4	341.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
887	Naltrexone-D3	1261080-26-5	C20H20NO4D3	344.18	ESI +	[M+H] ⁺	2
888	Naproxene	22204-53-1	C14H14O3	230.09	ESI +	[M+H] ⁺	11
889	Naringin	10236-47-2	C27H32O14	580.18	ESI -	[M-H] ⁻	5
890	N-desmethyloclobazam	22316-55-8	C15H11ClN2O2	286.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
891	Nebivolol	99200-09-6	C22H25F2NO4	405.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
892	Neburon	555-37-3	C12H16Cl2N2O	274.06	ESI +	[M+H] ⁺	10
893	Nefopam	13669-70-0	C17H19NO	253.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
894	Nelfinavir	159989-84-7	C32H45N3O4S	567.31	ESI +	[M+H] ⁺	14
895	Nevirapine	129618-40-2	C15H14N4O	266.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
896	Niaprazine	27367-90-4	C20H25FN4O	356.20	ESI +	[M+H] ⁺	4
897	Nicardipine	55985-32-5	C26H29N3O6	479.21	ESI +	[M+H] ⁺	13
898	Nicorandil	65141-46-0	C8H9N3O4	211.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
899	Nicotinic acid	59-67-6	C6H5NO2	123.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
900	Nifedipine	21829-25-4	C17H18N2O6	346.12	ESI +	[M+H] ⁺	15

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
901	Niflumic acid	4394-00-7	C13H9F3N2O2	282.06	ESI +	[M+H] ⁺	10
902	Nifoxipam	74723-10-7	C15H10FN3O4	315.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
903	Nimodipine	66085-59-4	C21H26N2O7	418.17	ESI +	[M+H] ⁺	11
904	Nitrazepam	146-22-5	C15H11N3O3	281.08	ESI +	[M+H] ⁺	8
905	Nivaquine	54-05-7	C18H26ClN3	319.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
906	Nomifensine	24526-64-5	C16H18N2	238.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
907	Noralfentanil	61086-18-8	C18H24N2O2	276.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
908	Norbuprenorphine	78715-23-8	C25H35NO4	413.26	ESI +	[M+H] ⁺	5
909	Nor-cisapride	202590-69-0	C14H20ClN3O3	313.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
910	Norclozapine	6104-71-8	C17H17ClN4	312.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
911	Norcocaine	18717-72-1	C16H18NO4	289.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
912	Nordiazepam	1088-11-5	C15H11ClN2O	270.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
913	Norephedrine	14838-15-4	C9H13NO	151.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
914	Norfenfuramine	1886-26-6	C10H12F3N	203.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
915	Norfentanyl	1609-66-1	C14H20N2O	232.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
916	Norfluoxetine	56161-73-0	C16H16F3NO	295.12	ESI +	[M+H] ⁺	2
917	Norflurazon	27314-13-2	C12H9ClF3N3O	303.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
918	Norketamine	35211-10-0	C12H14ClNO	223.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
919	Nor-LSD_Nor-iso-LSD	35779-43-2	C19H23N3O	309.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
920	Normorphine	466-97-7	C16H17NO3	271.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
921	Noroxycodone	57664-96-7	C17H19NO4	301.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
922	Noroxycodone-D3	1426174-79-9	C17H16NO4D3	304.15	ESI +	[M+H] ⁺	2
923	Norpseudoephedrine	37577-07-4	C9H13NO	151.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
924	Nortriptyline	72-69-5	C19H21N	263.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
925	Norverapamil	67018-85-3	C26H36N2O4	440.27	ESI +	[M+H] ⁺	9
926	Noscapine	128-62-1	C22H23NO7	413.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
927	Novaluron	116714-46-6	C17H9ClF8N2O4	492.01	ESI +	[M+H] ⁺	6
928	Nuarimol	63284-71-9	C17H12ClFN2O	314.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
929	O-CPP (O-Chlorophenylpiperazine)	39512-50-0	C10H13ClN2	196.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
930	Octen-3-ol	3391-86-4	C8H16O	128.12	ESI +	[M+H] ⁺	3
931	o-desmethyltramadol	73986-53-5	C15H23NO2	249.17	ESI +	[M+H] ⁺	4
932	Olanzapine	132539-06-1	C17H20N4S	312.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
933	Oleandrin	465-16-7	C32H48O9	576.33	ESI +	[M+H] ⁺	5
934	Omeprazole	73590-58-6	C17H19N3O3S	345.11	ESI +	[M+NH4] ⁺	3
935	Omethoate	1113-02-6	C5H12NO4PS	213.02	ESI +	[M+H] ⁺	5
936	Opipramol	315-72-0	C23H29N3O	363.23	ESI +	[M+H] ⁺	5
937	Omidazole	16773-42-5	C7H10ClN3O3	219.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
938	Oryzalin	19044-88-3	C12H18N4O6S	346.09	ESI -	[M-] ⁻	5
939	o-toluidine	95-53-4	C7H9N	107.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
940	Ouabaine	630-60-4	C29H44O12	584.28	ESI +	[M+H] ⁺	10
941	Oxadiazon	19666-30-9	C15H18Cl2N2O3	344.07	ESI +	[M+NH4] ⁺	9
942	Oxamyl	23135-22-0	C7H13N3O3S	219.07	ESI +	[M+NH4] ⁺	5
943	Oxazepam	604-75-1	C15H11ClN2O2	286.05	ESI +	[M+H] ⁺	7
944	Oxeladin	468-61-1	C20H33NO3	335.25	ESI +	[M+H] ⁺	5
945	Oxetorone	26020-55-3	C21H21NO2	319.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
946	Oxitropium	30266-75-0	C19H26NO4	332.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
947	Oxmemazine	3689-50-7	C18H22N2O2S	330.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
948	Oxprenolol	6452-71-7	C15H23NO3	265.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
949	Oxybutynin	5633-20-5	C22H31NO3	357.23	ESI +	[M+H] ⁺	5
950	Oxycodone	76-42-6	C18H21NO4	315.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
951	Oxycodone-D3	160227-46-3	C18H18NO4D3	318.17	ESI +	[M+H] ⁺	2
952	Oxydemeton-methyl	301-12-2	C8H15O4PS2	246.01	ESI +	[M+H] ⁺	10
953	Oxyphenbutazone	129-20-4	C19H20N2O3	324.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
954	Pancuronium	15500-66-0	C35H80N2O4	572.46	ESI +	[ESI] ⁺	9
955	Paracetamol	103-90-2	C8H9NO2	151.06	ESI +	[M+H] ⁺	6
956	Paraoxon ethyl	311-45-5	C10H14NO6P	275.06	ESI +	[M+H] ⁺	11
957	Paraoxon methyl	950-35-6	C8H10NO6P	247.02	ESI +	[M+H] ⁺	11
958	Parathion-ethyl	56-38-2	C10H14NO5PS	291.03	ESI +	[M+H] ⁺	2
959	Parathion-methyl	298-00-0	C8H10NO5PS	263.00	ESI +	[M+H] ⁺	3
960	Paroxetine	61869-08-7	C19H20FNO3	329.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
961	Patulin	149-29-1	C7H8O4	154.03	ESI +	[M+NH4] ⁺	5
962	PCEEA (N-(2-ethoxyethyl)-1-phenylcyclohexanamine)	1798021-89-2	C16H25NO	247.19	ESI +	[M+H] ⁺	6
963	PCMPA (N-(3-methoxypropyl)-1-phenyl-cyclohexanamine)	1934-63-0	C16H25NO	247.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
964	P-CPP (P-Chlorophenylpiperazine)	38212-33-8	C10H13ClN2	196.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
965	Penbutolol	36507-48-9	C18H26NO2	291.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
966	Penconazole	66246-88-6	C13H15Cl2N3	283.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
967	Pendimethalin	40487-42-1	C13H19N3O4	281.14	ESI +	[M+H] ⁺	6
968	Penfluridol	26864-56-2	C28H27ClF5NO	523.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
969	Pentazocine	359-83-1	C19H27NO	285.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
970	Pentdrone	879669-95-1	C12H17NO	191.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
971	Pentifylline	1028-33-7	C13H20N4O2	264.16	ESI +	[M+H] ⁺	4
972	Pentobarbital	76-74-4	C11H18N2O3	226.13	ESI -	[M-] ⁻	2
973	Pentoxifylline	6493-05-6	C13H18N4O3	278.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
974	Periciazine	2622-26-6	C21H23N3OS	365.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
975	Perindoprilate	95153-31-4	C17H28N2O5	340.20	ESI +	[M+H] ⁺	5

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
976	Perphenazine	58-39-9	C21H28ClN3OS	403.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
977	Pethidine	57-42-1	C15H21NO2	247.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
978	Phenacetin	62-44-2	C10H13NO2	179.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
979	Phencyclidine	77-10-1	C17H25N	243.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
980	Pheniramine	86-21-5	C16H20N2	240.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
981	Phenmediphan	13684-63-4	C16H16N2O4	300.11	ESI +	[M+NH4] ⁺	11
982	Phenobarbital	50-06-6	C12H12N2O3	232.08	ESI -	[M-H] ⁻	3
983	Phenothrin	26002-80-2	C23H28O3	350.19	ESI +	[M+H] ⁺	10
984	Phentemine	122-09-8	C10H15N	149.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
985	Phenyl-2-phenol	90-43-7	C12H10O	170.07	ESI -	[M-H] ⁻	3
986	Phenylbiguanide	102-02-3	C8H11N5	177.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
987	Phenylbutazone	50-33-9	C19H20N2O2	308.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
988	Phenylpropylamine	622-80-0	C9H13N	135.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
989	Phenyltoloxamine	92-12-6	C17H21NO	255.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
990	Phenysemicarbazide	103-03-7	C7H9N3O	151.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
991	Phenytoin	57-41-0	C15H12N2O2	252.09	ESI -	[M-H] ⁻	2
992	Phloroglucinol	108-73-6	C8H6O3	126.03	ESI +	[M+H] ⁺	3
993	Pholcodine	509-67-1	C23H30N2O4	398.22	ESI +	[M+H] ⁺	6
994	Phorate	298-02-2	C7H17O2PS3	260.01	ESI +	[M+H] ⁺	4
995	Phosalone	2310-17-0	C12H15ClNO4PS2	366.99	ESI +	[M+H] ⁺	10
996	Phosmet	732-11-6	C11H12NO4PS2	316.99	ESI +	[M+H] ⁺	14
997	Phosphamidon	13171-21-6	C10H10ClNO5P	299.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
998	Phoxime	14816-18-3	C12H15N2O3PS	298.05	ESI +	[M+H] ⁺	12
999	Phthalaldehyde	643-79-8	C8H6O2	134.04	ESI +	[M+H] ⁺	3
1000	Picloram	1918-02-1	C8H3Cl3N2O2	239.93	ESI +	[M+H] ⁺	5
1001	Pilocarpine	92-13-7	C11H16N2O2	208.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1002	Pimethixene	314-03-4	C19H19NS	293.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1003	Pimozide	2062-78-4	C28H29F2N3O	461.23	ESI +	[M+H] ⁺	5
1004	Pindolol	13523-86-9	C14H20N2O2	248.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1005	Pindone	83-26-1	C14H14O3	230.09	ESI -	[M-H] ⁻	5
1006	Pipamperone	1893-33-0	C21H30FN3O2	375.23	ESI +	[M+H] ⁺	5
1007	Piperacillin	61477-96-1	C23H27N5O7S	517.16	ESI +	[M+H] ⁺	19
1008	Piperonyl-butoxide	51-03-6	C19H30O5	338.21	ESI +	[M+NH4] ⁺	5
1009	Pipotiazine	39860-99-6	C24H33N3O3S2	475.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1010	Piracetam	7491-74-9	C6H10N2O2	142.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
1011	Pirbuterol	38677-81-5	C12H20N2O3	240.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
1012	Piretanide	55837-27-9	C17H18N2O5S	362.09	ESI +	[M+H] ⁺	10
1013	Pinbedil	3605-01-4	C16H18N4O2	298.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1014	Pirimiticarb	23103-98-2	C11H16N4O2	238.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1015	Pirimiticarb-desmethyl	30614-22-3	C10H16N4O2	224.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1016	Pirimiphos ethyl	23505-41-1	C13H24N3O3PS	333.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1017	Pirimiphos methyl	29232-93-7	C11H20N3O3PS	305.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
1018	Piroxicam	36322-90-4	C15H13N3O4S	331.06	ESI +	[M+H] ⁺	10
1019	PMA (p-methoxyamphetamine)	23239-32-9	C10H15NO	165.12	ESI +	[M+H] ⁺	6
1020	PMMA (para-Methoxy-N-methylamphetamine)	3398-88-3	C11H17NO	179.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1021	p-nitrophenol (PNP)	100-02-7	C6H5NO3	139.03	ESI -	[M-H] ⁻	3
1022	Posaconazole	171228-49-2	C37H42F2N8O4	700.33	ESI +	[M+H] ⁺	7
1023	Pravastatine	81131-70-6	C23H36O7	424.25	ESI -	[M-H] ⁻	5
1024	Prazepam	2955-38-6	C19H17ClN2O	324.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
1025	Prazosin	19216-56-9	C19H21N5O4	383.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1026	Prednisolone	50-24-8	C21H28O5	360.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
1027	Prednisone	53-03-2	C21H26O5	358.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1028	Pregabalin	148553-50-8	C8H17NO2	159.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1029	Prifinium	4630-95-9	C22H28N	306.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
1030	Primidone	125-33-7	C12H14N2O2	218.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
1031	Procainamide	59-06-9	C13H21N3O	235.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
1032	Procaine	59-46-1	C13H20N2O2	236.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1033	Procarbazine	671-16-9	C12H16N3O	221.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1034	Prochloraz	67747-09-5	C15H16Cl3N3O2	375.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
1035	Prochlorperazine	58-38-8	C20H24ClN3S	373.14	ESI +	[M+H] ⁺	10
1036	Procyclidine	77-37-2	C19H29NO	287.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
1037	Profenophos	41198-08-7	C11H15BrClO3PS	371.94	ESI +	[M+H] ⁺	5
1038	Proguanil	500-92-5	C11H16ClN5	253.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1039	Prolintane	493-92-5	C15H23N	217.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1040	Promecarb	2631-37-0	C12H17NO2	207.13	ESI +	[M+H] ⁺	11
1041	Promethazine	60-87-7	C17H20N2S	284.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1042	Propachlor	1918-16-7	C11H14ClNO	211.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
1043	Propafenone	54063-53-5	C21H27NO3	341.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1044	Propamocarb	24579-73-5	C9H20N2O2	188.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1045	Propaquizafop	111479-05-1	C22H22ClN3O5	443.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1046	Propargite	2312-35-8	C19H26O4S	350.16	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
1047	Propazine	139-40-2	C9H16ClN5	229.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1048	Propham	122-42-9	C10H13NO2	179.09	ESI +	[M+H] ⁺	4
1049	Propiconazole	60207-90-1	C15H17Cl2N3O2	341.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
1050	Propoxur	114-26-1	C11H15NO3	209.11	ESI +	[M+H] ⁺	6

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions	
1051	Propranolol	525-66-6	C16H21NO2	259.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1052	Propylene thiourea	2122-19-2	C4H8N2S	116.04	ESI +	[M+H] ⁺	4
1053	Proscillaridin	466-06-8	C30H42O8	530.29	ESI +	[M+H] ⁺	5
1054	Prosulfuron	94125-34-5	C15H16F3N5O4S	419.09	ESI +	[M+H] ⁺	10
1055	Prothioconazole	178928-70-6	C14H15Cl2N3OS	343.03	ESI +	[M+H] ⁺	10
1056	Prothioconazole-desthio	120983-84-4	C14H15Cl2N3O	311.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
1057	Prothiophos	34643-46-4	C11H15Cl2O2PS2	343.96	ESI +	[M+H] ⁺	5
1058	Protriptyline	438-80-8	C19H21N	263.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
1059	Proxyphylline	603-00-9	C10H14N4O3	238.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1060	Pseudoephedrine	90-82-4	C10H15NO	165.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1061	Psilocine	520-63-6	C12H18N2O	204.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1062	Psilocybine	520-52-5	C12H17N2O4P	284.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
1063	Putrescine	110-60-1	C4H12N2	88.10	ESI +	[M+H] ⁺	4
1064	PVP	14530-33-7	C15H21NO	231.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1065	Pymetrozine	123312-89-0	C10H11N5O	217.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
1066	Pyraclostrobrine	175013-18-0	C19H18ClN3O4	387.10	ESI +	[M+H] ⁺	9
1067	Pyrantel	15686-83-6	C11H14N2S	206.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
1068	Pyrazinamide	98-96-4	C5H5N3O	123.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
1069	Pyrazinoic acid	98-97-5	C5H4N2O2	124.03	ESI +	[M+H] ⁺	4
1070	Pyrazophos	13457-18-6	C14H20N3O5PS	373.09	ESI +	[M+H] ⁺	10
1071	Pyridaben	96489-71-3	C19H25ClN2OS	364.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1072	Pyridafenthion	119-12-0	C14H17N2O4PS	340.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
1073	Pyridate	55512-33-9	C19H23ClN2O2S	378.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1074	Pyridoxine	65-23-6	C8H11NO3	169.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
1075	Pyrifenoxy	88283-41-4	C14H12Cl2N2O	294.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
1076	Pyrimethanil	53112-28-0	C12H13N3	199.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1077	Pyriproxyfen	96737-68-1	C20H19NO3	321.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1078	Quazepam	36735-22-5	C17H11ClF4N2S	386.03	ESI -	[M-H] ⁻	5
1079	Quetiapine	111974-69-7	C21H25N3O2S	383.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
1080	Quinalphos	13593-03-8	C12H15N2O3PS	298.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
1081	Quinapril	85441-61-8	C25H30N2O5	438.22	ESI +	[M+H] ⁺	15
1082	Quinidine	56-54-2	C20H24N2O2	324.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1083	Quinine	130-95-0	C20H24N2O2	324.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1084	Quinmerac	90717-03-6	C11H8ClNO2	221.02	ESI +	[M+H] ⁺	5
1085	Quinoxifen	124495-18-7	C15H8Cl2FNO	307.00	ESI +	[M+H] ⁺	5
1086	Quinupramine	31721-17-2	C21H24N2	304.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
1087	Quizalofop ethyl	76578-14-8	C19H17ClN2O4	372.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
1088	Ramipril	87333-19-5	C23H32N2O5	416.23	ESI +	[M+H] ⁺	5
1089	Rangasil	31793-07-4	C13H14ClNO2	251.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
1090	Ranitidine	66357-35-5	C13H22N4O3S	314.14	ESI +	[M+H] ⁺	10
1091	Reserpine	50-55-5	C33H40N2O9	608.27	ESI +	[M+H] ⁺	5
1092	Retigabine	150812-12-7	C18H18FN3O2	303.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1093	Retrovirine	480-54-6	C18H25NO6	351.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
1094	Ribavirine	36791-04-5	C8H12N4O5	244.08	ESI +	[M+H] ⁺	3
1095	Riboflavin	83-88-5	C17H20N4O6	376.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1096	Rifabutin	72559-06-9	C46H82N4O11	846.44	ESI +	[M+H] ⁺	10
1097	Rilmendidine	54187-04-1	C10H16N2O	180.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1098	Risperidone	106266-06-2	C23H27FN4O2	410.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
1099	Ritalinic acid	19395-41-6	C13H17NO2	219.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1100	Ritodrine	26652-09-5	C17H21NO3	287.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1101	Ritonavir	155213-67-5	C37H48N6O5S2	720.31	ESI +	[M+H] ⁺	9
1102	Rivaroxaban	366789-02-8	C19H18ClN3O5S	435.07	ESI +	[M+H] ⁺	16
1103	Rocuronium	143558-00-3	C32H53N2O4	529.40	ESI +	[M+H] ⁺	5
1104	Ronnel	299-84-3	C8H8Cl3O3PS	319.90	ESI +	[M+H] ⁺	3
1105	Ropivacaine	84057-95-4	C17H26N2O	274.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1106	Ropivacaine Hydrochloride	98717-15-8	C17H26N2O	274.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1107	Rotenone	83-79-4	C23H22O6	394.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1108	Roxithromycin	80214-83-1	C41H76N2O15	836.52	ESI +	[M+H] ⁺	5
1109	Rufinamide	106308-44-5	C10H8F2N4O	238.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
1110	Salazopyrine	599-79-1	C18H14N4O5S	398.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
1111	Salbutamol	35763-26-9	C13H21NO3	239.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
1112	Salicylic acid	69-72-7	C7H6O3	138.03	ESI -	[M-H] ⁻	5
1113	Salmeterol	89365-50-4	C25H37NO4	415.27	ESI +	[M+H] ⁺	10
1114	Salvinorine A	83729-01-5	C23H28O8	432.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1115	Saquinavir	127779-20-8	C38H50N6O5	670.38	ESI +	[M+H] ⁺	15
1116	Scoparone	120-08-1	C11H10O4	206.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
1117	Scopolamine	51-34-3	C17H21NO4	303.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1118	Secobarbital	76-73-3	C12H18N2O3	238.13	ESI -	[M-H] ⁻	2
1119	Selegiline	14611-51-9	C13H17N	187.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1120	Setraline	79617-96-2	C17H17Cl2N	305.07	ESI +	[M+H] ⁺	6
1121	Sibutramine	106650-56-0	C17H26ClN	279.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1122	Sildenafil	139755-83-2	C22H30N6O4S	474.20	ESI +	[M+H] ⁺	10
1123	Simazine	122-34-9	C7H12ClN5	201.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
1124	Simvastatine	79902-63-9	C25H38O5	418.27	ESI +	[M+NH4] ⁺	15
1125	Sirolimus	53123-88-9	C51H79NO13	913.56	ESI +	[M+Na] ⁺	10

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions
1126 Sotalol	3930-20-9	C12H20N2O3S	272.12	ESI +	[M+H] ⁺	10
1127 Sotalol-D6	1246912-17-3	C12H14N2O3SD6	278.16	ESI +	[M+H] ⁺	10
1128 Sparteine	90-39-1	C15H26N2	234.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
1129 Spinetoram	187166-40-1	C42H89NO10	747.49	ESI +	[M+H] ⁺	9
1130 Spinosad	131929-80-7	C41H85NO10	731.46	ESI +	[M+H] ⁺	10
1131 Spirodiclofen	148477-71-8	C21H24Cl2O4	410.11	ESI +	[M+H] ⁺	10
1132 Spiromesifen	283594-90-1	C23H30O4	370.21	ESI +	[M+H] ⁺	12
1133 Spironolactone	52-01-7	C24H32O4S	416.20	ESI +	[M+NH4] ⁺	6
1134 Spirotetramat	203313-25-1	C21H27NO5	373.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
1135 Spirotetramat-cis-keto-hydroxy	1172134-11-0	C18H23NO4	317.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1136 Spirotetramat-enol	203312-38-3	C18H23NO3	301.17	ESI +	[M+H] ⁺	10
1137 Spirotetramat-enol-glucoside	1172614-86-6	C24H33NO8	463.22	ESI +	[M+H] ⁺	6
1138 Spirotetramat-mono-hydroxy	1172134-12-1	C18H25NO3	303.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1139 Spiroxamine	118134-30-8	C18H35NO2	297.27	ESI +	[M+H] ⁺	5
1140 Stiripentol	49763-96-4	C14H18O3	234.13	ESI -	[M-H] ⁻	1
1141 Strophanthidin	66-28-4	C23H32O6	404.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
1142 Strychnine	57-24-9	C21H22N2O2	334.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
1143 Sufentanyl	56030-54-7	C22H30N2O2S	388.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1144 Sulbactam	68373-14-8	C8H11NO5S	233.04	ESI -	[M-H] ⁻	5
1145 Sulbutiamine	3286-46-2	C32H46N8O6S2	702.30	ESI +	[M+H] ⁺	5
1146 Sulfadiazine	68-35-9	C10H10N4O2S	250.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
1147 Sulfadoxine	2447-57-6	C12H14N4O4S	310.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
1148 Sulfaguanidine	57-67-0	C7H10N4O2S	214.05	ESI +	[M+H] ⁺	11
1149 Sulfonidiazine	14759-06-9	C21H26N2O2S2	402.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1150 Sulfosulfuron	141776-32-1	C16H18N6O7S2	470.07	ESI +	[M+H] ⁺	14
1151 Sulfotep	3689-24-5	C8H20O6P2S2	322.02	ESI +	[M+H] ⁺	5
1152 Sulindac	38194-50-2	C20H17FO3S	356.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
1153 Sulpiride	15676-16-1	C15H23N3O4S	341.14	ESI +	[M+H] ⁺	7
1154 Sultopride	53583-79-2	C17H26N2O4S	354.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1155 Suriclone	53813-83-5	C20H20ClN5O3S2	477.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
1156 Tacrine	321-64-2	C13H14N2	198.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1157 Tacrolimus	104987-11-3	C44H80NO12	803.48	ESI +	[M+NH4] ⁺	15
1158 Tapendalol	175591-23-8	C14H23NO	221.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1159 Taurine	107-35-7	C2H7NO3S	125.01	ESI +	[M+H] ⁺	3
1160 Taurochenodeoxycholic acid	516-35-8	C26H45NO6S	499.30	ESI +	[M+NH4] ⁺	12
1161 Taurothiocholic acid	516-90-5	C26H45NO6S	483.30	ESI +	[M+NH4] ⁺	11
1162 Tauroursodeoxycholic acid	14605-22-2	C26H45NO6S	499.30	ESI -	[M-H] ⁻	8
1163 Tazobactam	89786-04-9	C10H12N4O5S	300.05	ESI +	[M+H] ⁺	11
1164 Tebuconazole	107534-96-3	C16H22ClN3O	307.15	ESI +	[M+H] ⁺	2
1165 Tebufenozide	112410-23-8	C22H28N2O2	352.22	ESI +	[M+H] ⁺	13
1166 Tebufenpyrad	119168-77-3	C18H24ClN3O	333.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1167 Tefubenzuron	83121-18-0	C14H8Cl2F4N2O2	379.97	ESI +	[M+H] ⁺	6
1168 Temazepam	846-50-4	C16H13ClN2O2	300.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
1169 Temephos	3383-96-8	C16H20O6P2S3	465.99	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
1170 Tenofovir	147127-20-6	C9H14N5O4P	287.08	ESI +	[M+H] ⁺	9
1171 Tenoxicam	59804-37-4	C13H11N3O4S2	337.02	ESI +	[M+H] ⁺	10
1172 Terbinafine	91161-71-6	C21H25N	291.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1173 Terbufos	13071-79-9	C9H21O2PS3	288.04	ESI +	[M+H] ⁺	2
1174 Terbutometon	33693-04-8	C10H18N5O	225.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1175 Terbutaline	23031-25-6	C12H19NO3	225.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1176 Terbutylazine	5915-41-3	C9H16ClN5	229.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1177 Terbutryn	886-50-0	C10H18N5S	241.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1178 Terfenadine	50679-08-8	C32H41NO2	471.31	ESI +	[M+H] ⁺	5
1179 Terfluzine	117-89-5	C21H24F3N3S	407.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1180 Tertatolol	83688-84-0	C16H25NO2S	295.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1181 Tetracaine	94-24-6	C15H24N2O2	264.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1182 Tetraconazole	112281-77-3	C13H11Cl2F4N3O	371.02	ESI +	[M+H] ⁺	4
1183 Tetrahydrozoline	84-22-0	C13H16N2	200.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1184 Tetrazepam	10379-14-3	C16H17ClN2O	288.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
1185 TFMPP	15532-75-9	C11H13F3N2	230.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
1186 THC	1972-08-3	C21H30O2	314.22	ESI +	[M+H] ⁺	5
1187 THC-COOH	56354-06-4	C21H28O4	344.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1188 Theobromine	83-67-0	C7H8N4O2	180.06	ESI +	[M+H] ⁺	3
1189 Theophylline	58-55-9	C7H8N4O2	180.06	ESI +	[M+H] ⁺	8
1190 Thiabendazole	148-79-8	C10H7N3S	201.04	ESI +	[M+H] ⁺	9
1191 Thiadoprid	111988-49-9	C10H9ClN4S	252.02	ESI +	[M+H] ⁺	5
1192 Thiametoxam	153719-23-4	C8H10ClN5O3S	291.02	ESI +	[M+H] ⁺	6
1193 Thiamphenicol	15318-45-3	C12H15Cl2NO5S	355.00	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
1194 Thiobencarb	28249-77-6	C12H16ClNOS	257.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
1195 Thiocholchicoside	602-41-5	C27H33NO10S	563.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1196 Thiocyclam	31895-21-3	C5H11NS3	181.01	ESI +	[M+H] ⁺	5
1197 Thiodicarb	59669-26-0	C10H18N4O4S3	354.05	ESI +	[M+H] ⁺	8
1198 Thiometon	640-15-3	C6H15O2PS3	246.00	ESI +	[M+H] ⁺	2
1199 Thiopental	76-75-5	C11H18N2O2S	242.11	ESI -	[M-H] ⁻	3
1200 Thiophanate-methyl	23564-05-8	C12H14N4O4S2	342.05	ESI +	[M+H] ⁺	15

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions
1201 Thioproperazine	316-81-4	C22H30N4O2S2	446.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1202 Thioridazine	50-52-2	C21H26N2S2	370.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1203 Thiram	137-26-8	C8H12N2S4	239.99	ESI +	[M+H] ⁺	4
1204 THPI	85-40-5	C8H9NO2	151.06	ESI +	[M+H] ⁺	3
1205 Threohydrobupropion	153385-82-3	C13H20ClNO	241.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1206 Tiagabine	145821-59-6	C20H25NO2S2	375.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1207 Tianeptine	68981-73-5	C21H25ClN2O4S	436.12	ESI +	[M+H] ⁺	10
1208 Tianeptine MC (5)	104732-22-1	C19H21ClN2O4S	408.09	ESI +	[M+H] ⁺	15
1209 Tiapride	51012-32-9	C15H24N2O4S	328.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1210 Ticlopidine	53885-35-1	C14H14ClNS	263.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
1211 Tiemonium	144-12-7	C18H24NO2S	318.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1212 Tienilic acid	40180-04-9	C13H8Cl2O4S	329.95	ESI +	[M+H] ⁺	11
1213 Timolol	91524-16-2	C13H24N4O3S	316.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1214 Tinidazole	19387-91-8	C8H13N3O4S	247.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
1215 Tiocolmarol	22619-35-8	C22H16Cl2O4S	446.01	ESI -	[M-H] ⁻	5
1216 Tipranavir	174484-41-4	C31H33F3N2O5S	602.21	ESI +	[M+H] ⁺	14
1217 Tolbutamide	64-77-7	C12H18N2O3S	270.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
1218 Tolmetin	26171-23-3	C15H15NO3	257.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1219 Tolonidine	4201-22-3	C10H12ClN3	209.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
1220 Toloxatone	29218-27-7	C11H13NO3	207.09	ESI +	[M+H] ⁺	3
1221 Topiramate	97240-79-4	C12H21NO8S	339.10	ESI +	[M+NH4] ⁺	17
1222 Topiramate-D12	1279037-95-4	C12H9NO8SD12	351.17	ESI +	[M+NH4] ⁺	12
1223 Tramadol	27203-92-5	C16H25NO2	263.19	ESI +	[M+H] ⁺	2
1224 Trans trans muconic acid	3588-17-8	C8H8O4	142.03	ESI -	[M-H] ⁻	2
1225 Trazodone	19794-93-5	C19H22ClN5O	371.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1226 Triadimefon	43121-43-3	C14H16ClN3O2	293.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
1227 Triadimenol	55219-85-3	C14H18ClN3O2	295.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1228 Triallate	2303-17-5	C10H16Cl3NOS	303.00	ESI +	[M+H] ⁺	5
1229 Triamterene	396-01-0	C12H11N7	253.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1230 Triazamate	112143-82-5	C13H22N4O3S	314.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1231 Triazolam	28911-01-5	C17H12Cl2N4	342.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
1232 Triazolam-D4	145225-04-3	C17H8Cl2N4D4	346.07	ESI +	[M+H] ⁺	2
1233 Trichlorfon	52-68-6	C4H8Cl3O4P	255.92	ESI +	[M+H] ⁺	10
1234 Triclopyr	55335-06-3	C7H4Cl3NO3	254.93	ESI +	[M+H] ⁺	7
1235 Tridemorphe	81412-43-3	C19H39NO	297.30	ESI +	[M+H] ⁺	5
1236 Trietazine	1912-26-1	C9H16ClN5	229.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1237 Trifloxystrobin	141517-21-7	C20H19F3N2O4	408.13	ESI +	[M+H] ⁺	7
1238 Triflumizole	99387-89-0	C15H15ClF3N3O	345.09	ESI +	[M+H] ⁺	6
1239 Triflumuron	64628-44-0	C15H10ClF3N2O3	358.03	ESI +	[M+H] ⁺	5
1240 Trifluorperidol	749-13-3	C22H23F4NO2	409.17	ESI +	[M+H] ⁺	4
1241 Triflupromazine	146-54-3	C18H19F3N2S	352.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1242 Trifluralin	1582-09-8	C13H16F3N3O4	335.11	ESI +	[M+H] ⁺	5
1243 Triflurosulfuron-methyl	126535-15-7	C17H19F3N8O6S	492.10	ESI +	[M+H] ⁺	12
1244 Trihexyphenidyl	144-11-6	C20H31NO	301.24	ESI +	[M+H] ⁺	5
1245 Trimebutine	39133-31-8	C22H29NO5	387.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1246 Trimetazidine	5011-34-7	C14H22N2O3	266.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1247 Trimethoprim	738-70-5	C14H18N4O3	290.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1248 Trimethoxybenzaldehyde	54061-90-4	C10H12O4	196.07	ESI +	[M+H] ⁺	5
1249 Trimethylaniline	1467-35-2	C9H13N	135.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
1250 Trimipramine	739-71-9	C20H26N2	294.21	ESI +	[M+H] ⁺	5
1251 Triprolidine	486-12-4	C19H22N2	278.18	ESI +	[M+H] ⁺	5
1252 Tropatepine	27574-24-9	C22H23NS	333.16	ESI +	[M+H] ⁺	5
1253 Uridine	58-96-8	C9H12N2O6	244.07	ESI +	[M+H] ⁺	8
1254 Valone	83-28-3	C14H14O3	230.09	ESI -	[M-H] ⁻	5
1255 Valpromide	2430-27-5	C8H17NO	143.13	ESI +	[M+H] ⁺	5
1256 Vamidothion	2275-23-2	C8H18NO4PS2	287.04	ESI +	[M+H] ⁺	10
1257 Vecuronium	50700-72-6	C34H57N2O4	557.43	ESI +	[ESI] ⁺	9
1258 Venlafaxine	93413-89-5	C17H27NO2	277.20	ESI +	[M+H] ⁺	5
1259 Veralipride	68644-81-3	C17H25N3O5S	383.15	ESI +	[M+H] ⁺	5
1260 Verapamil	52-53-9	C27H38N2O4	454.28	ESI +	[M+H] ⁺	5
1261 Veratridine	71-82-5	C36H51NO11	673.35	ESI +	[M+H] ⁺	5
1262 Vigabatrin	60643-86-9	C8H11NO2	129.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
1263 Viloxazine	46817-91-8	C13H19NO3	237.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1264 Vinbumine	4880-88-0	C19H22N2O	294.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
1265 Vincamine	1617-90-9	C21H28N2O3	354.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
1266 Vincristine	57-22-7	C46H58N4O10	824.40	ESI +	[M+H] ⁺	20
1267 Vinylbital	2430-49-1	C11H16N2O3	224.12	ESI -	[M-H] ⁻	4
1268 Voriconazole	137234-62-9	C18H14F3N5O	349.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
1269 Warfarin	81-81-2	C19H16O4	308.10	ESI +	[M+H] ⁺	10
1270 Xipamide	14293-44-8	C15H15ClN2O4S	354.04	ESI -	[M-H] ⁻	15
1271 Yangonin	500-62-9	C15H14O4	258.09	ESI +	[M+H] ⁺	5
1272 Yohimbine	146-48-5	C21H28N2O3	354.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
1273 Zidovudine	30516-87-1	C10H13N5O4	267.10	ESI +	[M+H] ⁺	8
1274 Zipeprol	34758-83-3	C23H32N2O3	384.24	ESI +	[M+H] ⁺	5
1275 Zolazepam	31352-82-6	C15H15FN4O	286.12	ESI +	[M+H] ⁺	5

Compound	CAS	Formula	M	Mode	Ion	MRM Transitions
1276 Zolpidem	82626-48-0	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	307.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
1277 Zonisamide	68291-97-4	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃ S	212.03	ESI +	[M+H] ⁺	15
1278 Zopiclone	43200-80-2	C ₁₇ H ₁₇ CIN ₆ O ₃	388.11	ESI +	[M+H] ⁺	11
1279 Zopiclone-D ₄	1435933-78-0	C ₁₇ H ₁₃ CIN ₆ O ₃	392.13	ESI +	[M+H] ⁺	2
1280 Zuclopenthixol	53772-83-1	C ₂₂ H ₂₅ CIN ₂ O ₅	400.14	ESI +	[M+H] ⁺	5

■ Conclusions

The Forensic & Toxicology method package provides the tools for method development for both unknown screening and targeted screening workflows.

■ References

1. Sauvage, F.L., Gaulier, J.M., Lachatre, G., Marquet, P (2008) Pitfalls and Prevention Strategies for Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in the Selected Reaction–Monitoring Mode for Drug Analysis, *Clinical Chemistry*, 54:9, 1519–1527

Final Edition: April, 2017



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu.
The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

© Shimadzu Corporation, 2017

II) Méthodes développées avec une préparation manuelle d'échantillon

Sur la base d'une extraction manuelle à l'aide des sels QuEChERS, nous avons d'abord testé 2 approches de screening différentes :

- Une approche combinant une acquisition en mode GUS et la recherche ciblée d'une vingtaine de molécules couramment rencontrées en toxicologie clinique, avec possibilité de quantifier ces dernières en cas de détection
- Une approche ciblée pour un panel d'une centaine de molécules et permettant leur quantification en cas de détection.

Dans une troisième étude, nous avons testé l'approche « micro QuEChERS » sur un panel de molécules de la classe des stupéfiants.

1) Evaluation de la méthode combinant GUS et MRM

Dans cette étude, nous avons testé la capacité de la méthode GUS à détecter des molécules médicamenteuses usuellement observées lorsque des demandes de screening parviennent au laboratoire. Afin de pouvoir également les quantifier, des transitions MRM ont été ajoutées à la méthode d'acquisition. 23 molécules ont été considérées : des anxiolytiques, des antidépresseurs, des neuroleptiques, des antiépileptiques, des antalgiques et des anti-inflammatoires.

Des échantillons sanguins ont été préparés à 2 niveaux de concentrations : une concentration thérapeutique et une concentration réputée toxique.

Les extraits ont été préparés par la méthode QuEChERS décrite précédemment (voir VIII Choix des méthodes d'extraction).

Lors de l'acquisition spectrale, trois spectres de masse complets pour les 3 énergies de collision (± 10 , 35, 55V) (voir VII Création des méthodes d'acquisition) étaient obtenus. Ces spectres ainsi que les temps de rétention obtenus lors de l'analyse permettaient d'identifier les composés, par comparaison à la bibliothèque de référence.

Parmi les 23 molécules, 4 n'ont pas été détectées à la plus faible concentration en acquisition GUS. Même à une concentration élevée (500 $\mu\text{g/L}$), cette méthode GUS ne permettait pas de mettre en évidence l'oxazépam, par exemple.

Les performances quantitatives étaient excellentes, les fortes concentrations entraînant toutefois une saturation du signal nécessitant une dilution des échantillons.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un poster présenté lors du congrès la Société Américaine de Spectrométrie de Masse (American Society of Mass Spectrometry) en 2016. Le contenu de ce poster est présenté dans les pages suivantes.

1. Introduction

Forensic toxicological sample measurement can take two paths commonly referred to as targeted and untargeted analysis. Targeted approaches on triple quadrupole platforms are well established with MRM/SRM detection and quantitation for pre-determined lists of compounds. For untargeted analysis, general unknown screening (GUS) acquires full scan MS data to trigger MS/MS spectra at a broad range of collision energies above a predefined threshold. This work describes the application of a nominal mass library acquired with certified reference materials to screen and identify forensic toxicology samples in a routine clinical laboratory. The LC-MS/MS method was designed to acquire MRM and scanning data with polarity switching in a single data file. The MRM data was used to provide quantitative results on commonly encountered target compounds and full scan data to help confirm identification.

2. Methods and Materials

Whole blood samples were spiked with a panel of the most commonly detected compounds reported in toxicological screening. Among them included: psychoactive drugs (antidepressants, anxiolytic drugs, antipsychotics), analgesic, antipyretics and anti-inflammatory agents, antiepileptics. These samples were prepared by QuEChERS method with the inclusion of ten internal standard compounds for quality control purposes. Data acquisition was set to pos/neg Q3 scan with data dependant MS/MS in addition to MRM for a panel of commonly encountered compounds.

Liquid chromatography			Mass spectrometry	
UHPLC	Nexera LC system		LC-MS/MS	LCMS-8060
Analytical column	Restek Raptor Biphenyl 2.7µm 100 x 2.1mm C18		Ionisation mode	Heated ESI
Column temp.	50°C		Scan speed	30,000 u/sec
Injection cycle	5 µL injection volume		Polarity switching time	5 msec
Flow rate	0.3 mL/min		MRM Dwell time	5 msec
Solvent A	Water + 2mM ammonium formate + 0.002% formic acid		Pause time	3 msec
Solvent B	Methanol + 2mM ammonium formate + 0.002% formic acid		Interface temp.	300°C
Binary Gradient	Time (mins)	%B	Heating block	400°C
	1.00	5	Desolvation line	250°C
	2.00	40	Heating gas	10 L/min
	10.50	100	Drying gas	10 L/min
	13.00	100	Nebulising gas	3 L/min
	13.01	5	CID gas pressure	250kPa
	17.00	Stop	Interface voltage	4 kV
	11-14.2	0.5 mL/min		
LC-MS/MS method set up for simultaneous full scan and MRM data with polarity switching				
Type	Event	Polarity	Name m/z	Time (0-13mins)
Q3 Scan	1	+	Mass range 100-1000	
Product Ion Scan	2	+	> CE: -10, 30.00-1000.00	
Product Ion Scan	3	+	> CE: -35, 30.00-1000.00	
Product Ion Scan	4	+	> CE: -50, 30.00-1000.00	
Q3 Scan	5	-	Mass range 100-1000	
Product Ion Scan	6	-	> CE: 10, 30.00-1000.00	
Product Ion Scan	7	-	> CE: 35, 30.00-1000.00	
Product Ion Scan	8	-	> CE: 50, 30.00-1000.00	
MRM	9	-	Metformin 130.10>71.10, 130.10>60.05, 130.10>85.05	
MRM	10	+	Paracetamol 152.05>110.10, 152.05>85.05, 152.05>83.10	
MRM	11	+	Levetiracetam 171.10>126.10, 171.10>154.10, 171.10>89.10	
MRM	12	+	Codeine 300.15>152.10, 300.15> 215.15, 300.15>165.15	

Table 1. LC-MS/MS data acquisition conditions. The method included full scan and MRM data acquisition in both positive and negative ion mode. Full scan data was acquired with three collision energies to generate a broad range of fragment ions (events 1-8; polarity switching time 5msecs). MRM data was acquired for targeted analysis (events 10-35) and each MRM event contained two reference ions. 10 internal standard compounds were also included in the method.

2-2. Spectral Library >1200 compounds

Each library spectrum was acquired by authentic standard flow injection at collision energies 10-55V. Compounds that ionised efficiently in more than one adduct state were saved resulting in 1476 Library entries from 1207 compounds (1278 positive mode, 229 negative mode). Spectral Library information was registered for three collision energies corresponding to CE 10, 35 and 55V. Optimised MRM transitions were also determined for all compounds together with retention time and peak area data ratio of response between quantifier and qualifier transitions. RT analysis included internal standard compounds for relative RT calculation. Compound information was populated including: CAS number, formula, synonyms,.

Library data base										
Compound	CAS	CAS	Ion	Precursor ion	Product ion	Pre-bias	CE	Pre-Bias	RT (min)	Note 1
				Q1 m/z	Q3 m/z	Q1		Q3		
Ibuprofen	51146-56-6	C13H18O2	[M-H]-	205.10	161.20	22.00	10.00	16.00	7.70	
Ibuprofen	51146-56-6	C13H18O2	[M-H]-	205.10	146.30	10.00	19.00	18.00	7.70	
Ibuprofen	51146-56-6	C13H18O2	[M-H]-	205.10	159.10	10.00	13.00	15.00	7.70	
Ibuprofen	51146-56-6	C13H18O2	[M-H]-	205.10	131.00	10.00	17.00	12.00	7.70	
Ibuprofen	51146-56-6	C13H18O2	[M-H]-	205.10	113.00	14.00	26.00	10.00	7.70	
Levetiracetam	102767-28-2	C8H14N2O2	[M+H]+	171.11	126.10	-20.00	-15.00	-20.00	3.48	
Levetiracetam	102767-28-2	C8H14N2O2	[M+H]+	171.11	154.10	-19.00	-12.00	-23.00	3.48	
Levetiracetam	102767-28-2	C8H14N2O2	[M+H]+	171.11	69.10	-19.00	-28.00	-23.00	3.48	
Levomopromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	100.15	-12.00	-21.00	-22.00	7.83	
Levomopromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	58.05	-12.00	-36.00	-10.00	7.83	
Levomopromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	242.05	-12.00	-22.00	-16.00	7.83	
Levomopromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	167.10	-12.00	-61.00	-17.00	7.83	
Levomopromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	210.10	-12.00	-33.00	-21.00	7.83	

Table 2. The spectral library data base included full scan spectrum at three defined collision energies and optimized MRM transitions for multi-targeted screening and quantitation. Expected retention times correspond to the retention on a Biphenyl phase.

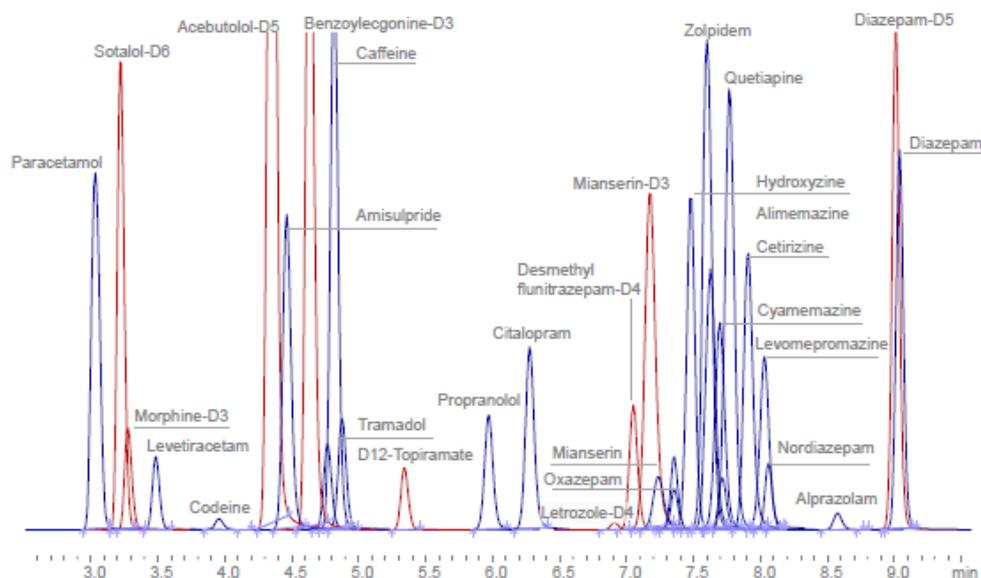


Figure 1. A whole blood sample was spiked with a panel of drugs which are commonly encountered in routine forensic toxicology and extracted using a QuEChERS method. The triple quadrupole mass spectrometer acquired full scan and MRM data throughout the analysis switching polarity with a speed of 5msecs. MRM chromatograms for the panel of drugs (blue MRM chromatograms) and associated stable isotope labelled internal standards (highlighted in red) are shown above.

3. Results

3-1. Library searching

Library searches were performed on spiked blood at low and high concentrations. Each collision energy acquired was searched against a library with search parameters set to search with same precursor ion and collision energy.

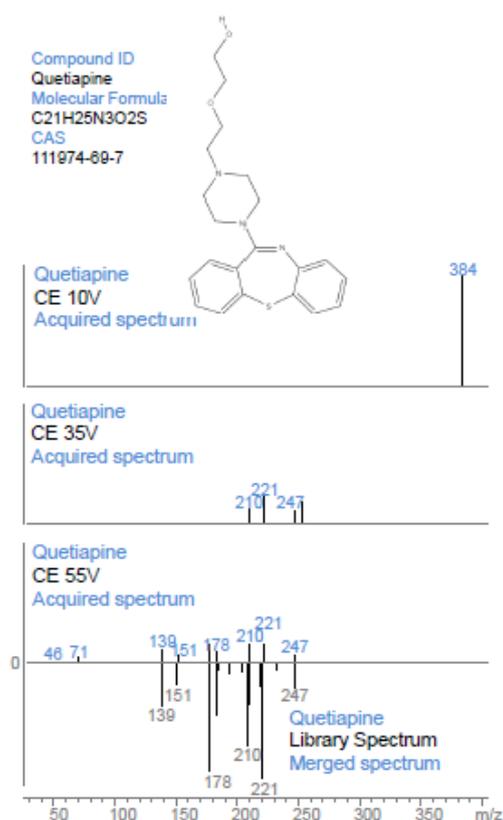


Figure 2. Intensity triggered product ion spectrum for quetiapine spiked into a whole blood sample at a high level toxicological sample (corresponding to a concentration of 0.5mg/L). Product ion spectra are shown for each of the three collision energies (10, 35 and 55V) together with a merged spectrum and library spectrum (CE10-55V).

There are 4 spectral library databases;
Positive ion | Merged Spectra
Positive ion | 3 collision energies
Negative ion | Merged Spectra
Negative ion | 3 collision energies
Libraries can be searched individually or collectively in automated search routines.

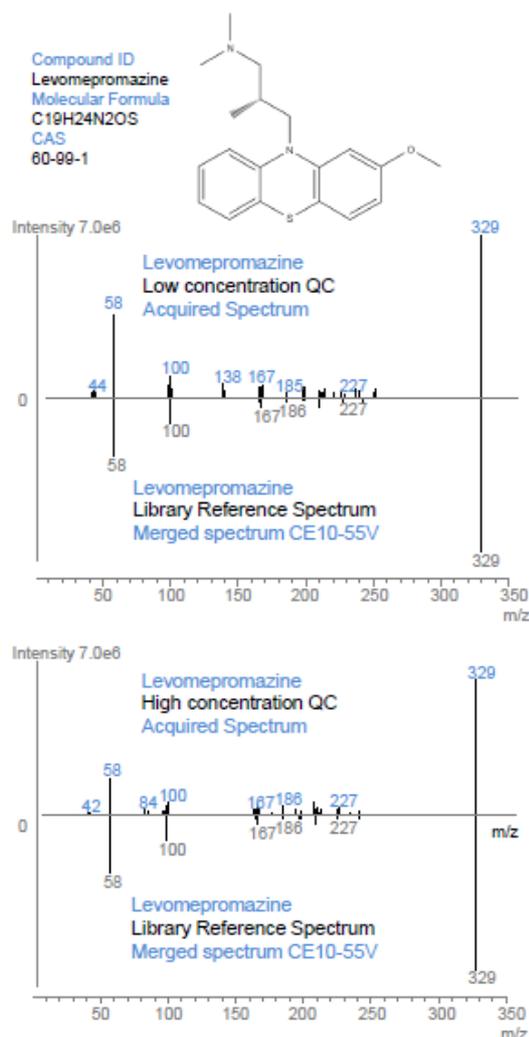


Figure 3. Merged product ion spectra (CE 10-55V) for levomepromazine spiked into whole blood at a low concentration QC (100ug/L) and a high concentration QC (500ug/L). Both spectra result in a high library match score despite the difference in concentration levels.

2-2. Quantitation

The method was designed to deliver robust quantitation data together with higher confidence in compound identification using threshold triggered product ion spectra.

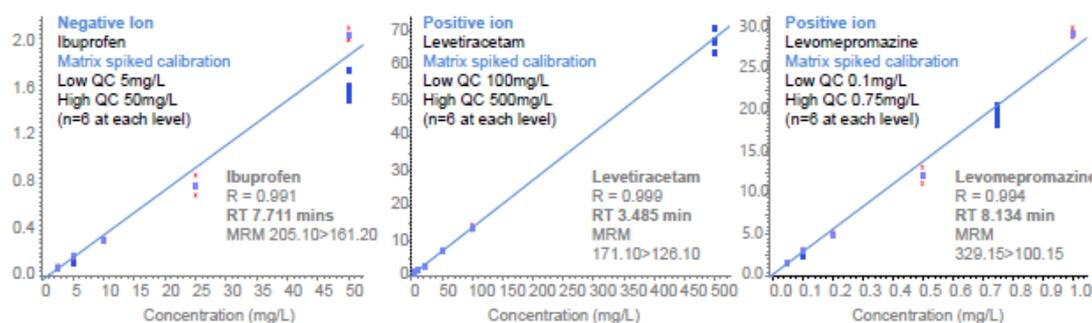


Figure 4. Calibration curve data for ibuprofen (negative ion mode, calibration range 2-50mg/L), levetiracetam (positive ion mode, calibration range 5-500mg/L) and levomepromazine (positive ion mode, calibration range 0.05-1.0mg/L) spiked into whole blood and extracted using QuEChERS.

Compound	RT (min)	Low (mg/L) Therapeutic	CV (area)	Library Hit	High (mg/L) Toxic	CV (area)	Library Hit	Cal range (mg/L)	R2
Metformin	1.03	1.0	1.0		5.0	5.4	1	1 - 10	0.985
Paracetamol	3.05	10.0	2.8	1	100.0	2.7	Sat ⁺	5 - 50	0.973
Levetiracetam	3.49	10.0	6.6	1	50.0	3.6	Sat ⁺	5 - 150	0.997
Codeine	4.02	0.0	1.6	1	0.1	5.6	1	0.0125 - 0.375	0.999
Amisulpride	4.53	0.1	1.2	1	0.5	4.1	1	0.05 - 1	0.992
Tramadol	4.95	0.1	2.4	1	1.0	5.9	1	0.05 - 1	0.994
Metoprolol	4.84	0.1	5.2	1	0.5	4.5	1	0.05 - 1	0.998
Caffeine	4.82	5.0	5.0	1	15.0	2.8	1	2.5 - 50	0.998
Propranolol	6.06	0.1	5.0	1	0.5	5.4	1	0.05 - 1	0.999
Citalopram	6.37	0.1	2.2	1	0.5	8.0	1	0.05 - 1	0.997
Mianserin	7.34	0.1	1.6	1	0.5	4.2	1	0.025 - 0.5	0.994
Hydroxyzine	7.56	0.1	1.4	1	0.2	4.9	1	0.025 - 0.5	0.994
Oxazepam	7.36	0.2	5.4		0.5	4.5		0.1 - 2	0.994
Alimemazine	7.73	0.1	2.9	1	0.5	4.8	1	0.05 - 1	0.999
Zolpidem	7.64	0.1	2.2	1	0.5	4.6	1	0.05 - 1	0.998
Quetiapine	7.84	0.1	1.8	1	0.5	13.7	1	0.05 - 1	0.997
Cyamemazine	7.79	0.1	2.8	1	0.5	3.8	1	0.05 - 1	0.996
Ibuprofen	7.71	5.0	6.4		50.0	5.8	1	2.5 - 50	0.98
Levomepromazine	8.13	0.1	3.2	1	0.5	4.7	1	0.05 - 1	0.988
Cetirizine	7.92	0.1	1.8	1	0.2	5.8	1	0.025 - 0.5	0.998
Nordiazepam	8.06	0.2	2.1	1	0.5	3.5	1	0.1 - 2	0.995
Alprazolam	8.57	0.0	2.2		0.1	5.0	1	0.005 - 0.1	0.993
Diazepam	9.04	0.2	1.2	1	0.5	4.4	1	0.1 - 2	0.997

Table 3. Reproducibility for 2 quality control levels spiked into blood (low and high level at mg/L concentrations; n=5 for each level) for a panel of drug compounds.

4. Conclusions

Screening by GUS successfully identified spiked compounds at therapeutic and toxic concentrations using generic LC and MS conditions with few exceptions.

This combined screening and MRM approach has been used, not only screen but also to quantify samples for toxicological screening and reduce false reporting by confirming compound identification using spectral based library searching.

Future work will aim to validate a larger panel of compounds and determine which compounds are suitable for routine GUS forensic and toxicological screening.

Disclaimer: The Shimadzu LCMS-8060 is intended for Research Use Only (RUO). Not for use in diagnostic procedures.

2) Evaluation de la méthode MTS

Dans cette étude, une méthode MTS comprenant 32 étalons internes deutérés et 90 composés dont des benzodiazépines, des dérivés de la cocaïne (C), des dérivés amphétaminiques (A), des opioïdes (O) et des anti-psychotiques a été développée. Cette méthode a été comparée à deux méthodes MRM validées sur un système LC-MS/MS (modèle 8050) de Shimadzu, accréditées selon la norme 15189 et utilisées en routine dans le laboratoire du CHU de Limoges : une dédiée à la quantification des « CAO » et une dédiée à la quantification des benzodiazépines.

24 échantillons sanguins issus de l'activité de routine ont été extraits à l'aide de sels QuEChERS et analysés à la fois sur le système LC-MS/MS modèle 8060 (méthode MTS) et le système LC-MS/MS modèle 8050 (méthodes MRM validées).

Dans les 24 échantillons de patients, 54 molécules ont été détectées. En terme de quantification, la méthode MTS développée sur le 8060 présentait des résultats tout à fait comparables à ceux de chacune des 2 méthodes de référence.

Ces travaux ont fait l'objet d'une note d'application qui est présentée dans les pages suivantes. Ils ont également fait l'objet :

- d'un poster à l'ASMS (2016)
- d'un poster à l'ASMS (2017)
- d'un poster à l'International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IADTMC 2017)
- d'une présentation orale au congrès de toxicologie du CHU de Liège.
- d'un article dans LCGC The column (Mars 2018)

Application News

LCMS No.MXX

Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Targeted screening with Library Searching of drugs of abuse by MTS measuring cocaine and related stimulants, amphetamines, opioids & benzodiazepines

Alan J. Barnes¹, Tiphaine Robin², Neil Loftus¹, Pierre Marquet², Souleiman El Balkhi², Sylvain Dulaurent², Franck Saint-Marcoux²

¹Shimadzu Corporation, Manchester, UK; ²CHU Limoges, France

Abstract

A multi-residue assay was developed measuring 90 drugs of abuse in addition to deuterated internal standards (32 compounds). Compounds measured included benzodiazepines, cocaine and related stimulants, amphetamines and opioids; in addition antipsychotic compounds were screened for also. The Multi-Targeted Screening (MTS) method was developed using the Shimadzu Forensic & Toxicology method package containing over 1200 compounds.

Blood samples were prepared by QuEChERS and measured by MTS using a Shimadzu LCMS-8060 and results compared to validated MRM analysis from a Shimadzu LCMS-8050. MTS operates by acquiring data with 2 MRMs per compound with the addition of threshold triggered product ion scan MS/MS at three different collision energies. Each product ion spectrum is then combined into a single merged spectrum for automated library searching.

There are 2 clear advantages of acquiring MRM triggered product ion spectrum data, the first is the higher confidence in compound identification as a result of library searching and the second is the quantitative data is near identical to a conventional 2 MRM method. This approach was evaluated in a routine clinical toxicology laboratory to detect and identify compounds in unknown samples.

Keywords: Spectral Library; Reduced false negative reporting; Toxicological screening; LCMS-8060; higher specificity

Introduction

In forensic and toxicological environments, the increased use of both illicit and legalised recreational drugs has created a considerable challenge in sample measurement and LC-MS/MS analysis. Increasing the scope and context of the assay also increases the complexity of the assay and may compromise the likelihood of false positive and false negative reporting in routine clinical toxicology. To minimize the possibility of false defect reporting without compromising the accuracy, precision and limits of detection, methods were developed to combine the sensitivity of MRM detection with the identification power of a full scan product ion spectrum. The method has the capability of simultaneously using both precursor and product ion information enabling precise, accurate quantitation and library searchable compound identification. In a similar approach to previously published methodologies⁸, threshold triggered product ion scan events were included at three collision energies (10, 35 and 55V) to create an absolute intensity merged spectrum representing all three collision energies.

In this study, the method was designed not only to reduce false defect reporting by using product ion scan library matching but also considered the needs of a routine clinical toxicology and forensic laboratory by taking into account sample preparation and component separation across a diverse chemical space.

To develop a generic sample preparation method in clinical toxicology analysis, QuEChERS (an acronym for "quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe") were used. QuEChERS are widely used in other application fields most notably food safety and pesticide analysis, however, few studies have used this approach in clinical toxicology. The method requires an initial extraction of the blood sample with acetonitrile, followed by liquid-liquid partitioning using salts such as MgSO₄/NaCl/NaOAc. Component separation was also optimized with a view to developing a single method capable of resolving targets in four panels of compounds normally measured in separate assays; these included cocaine and related stimulants, amphetamines, opioids and benzodiazepines in addition to complementary deuterated internal standard compounds for select compounds. To quantify and identify detect targets in the four test panels MS/MS methods were developed using

To test the viability of this approach and to quantify and identify targets in the four test panels, the MRM triggered product ion spectrum acquisition method was applied to a series of patient blood samples and compared against a validated LC-MS/MS method using 2 MRM's for each target compound.

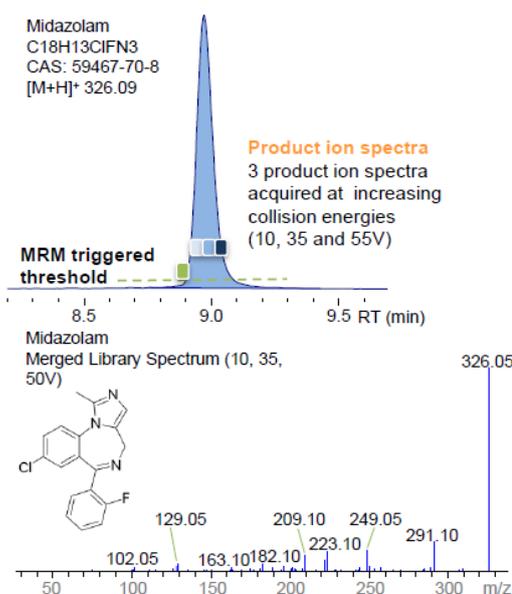


Figure 1 MRM threshold triggered product ion scans acquired at low, medium and high collision energies (corresponding to 10, 35 and 55V) are merged together to create a library searchable spectrum for midazolam. This approach increases the fragment ion information for each target and helps reduce false defect reporting.

■ Experimental

Patient blood samples were analysed from a diverse range of backgrounds commonly encountered in a routine pathology laboratory including emergency overdose, routine drug testing, driving under the influence of drugs (DUID) and samples provided by patients undergoing psychiatric treatment. All blood samples were extracted using an established QuEChERS based method^{2,3}.

100µL whole blood sample was added to 200 µL acetonitrile containing internal standard compounds. Samples were vortexed for ~5 seconds then incubated at room temperature for 10 min. 40mg of QuEChERS salts were added, samples were then vortexed for ~5 seconds. Samples were then centrifuged (16,000g, 10min); 50µL of supernatant was removed and added to 150 µL mobile phase A. Calibration curves were prepared in the range 5 to 2000 µg/L for benzodiazepines, and 5 to 500 µg/L for cocaine and related stimulants, amphetamines and opioids.

Data was acquired to monitor a predefined MRM transition for each compound. Once the MRM signal was above a set threshold intensity of 10,000 counts, a series of alternating product ion scans were acquired at three collision energies (10, 35, 55V) with an automatic exclusion for 3 seconds after 2 consecutive MS/MS scans. Product ion spectrum data from each collision energy was merged together to create a fragment

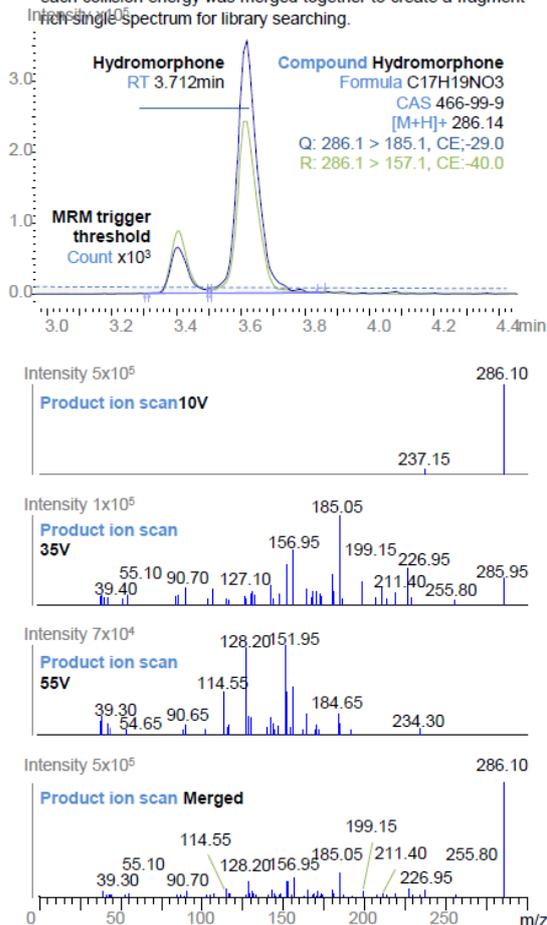


Figure 2. MS/MS acquisition data for hydromorphone. Above a predefined MRM intensity threshold, product ion scans are triggered acquiring scan data at different collision energies (10, 35 and 55V). For library based identification, the product ion scans from each collision energy are merged together.

Table 1. LC acquisition parameters

Liquid chromatography		
UHPLC	Nexera LC system	
Analytical column	Restek Raptor Biphenyl (2.7µm 100 x 2.1mm)	
Column temperature	40°C	
Flow rate	0.3 mL/minute	
Solvent A	2 mmol/L ammonium formate and 0.002% formic acid	
Solvent B	2 mmol/L ammonium formate and 0.002% formic acid in methanol	
Binary Gradient	Time (mins)	%B
	1.0	5
	2.0	40
	10.5	100
	13.5	100
	13.51	5
	17.0	Stop
Column conditioning	11-16.2 min	0.5 mL/min
Injection volume	5 µL	

Table 2. LC-MS/MS method used to acquire a library searchable data

LC-MS/MS Mass spectrometry	MRM Spectrum mode generating library searchable spectra
Target number of compounds	122 (including 32 ISTDs)
Pause time/dwell time	1 msec./3 msec.
Ionisation mode	ESI +/-
Polarity switching time	5 msec
Interface temperature	300°C
Heat block temperature	400°C
Desolvation line temperature	250°C
Nebulising gas	3 L/min
Heating gas	10 L/min
Drying gas	10 L/min

Table 3. In the MS/MS method, each target compound combined MRM and product ion scan acquisition's. The MRM threshold trigger was set to an intensity of 10,000 counts, above this threshold product ion scan data was acquired. As one example, MS/MS acquisition parameters for hydromorphone and morphine-6-glucuronide are shown below.

MS/MS method		
Acquisition time	2.962-4.462 (mins)	
Compound name	Hydromorphone	
MS/MS acquisition mode	Event	Acquisition parameters
MRM	36	
Channel 1		CE:-29.0, 286.15>185.10
Channel 2		CE:-40.0, 286.15>157.10
Product Ion Scan	37	CE:-10.0, 30.00:291.50
Product Ion Scan	38	CE:-35.0, 30.00:291.50
Product Ion Scan	39	CE:-55.0, 30.00:291.50
Acquisition time	2.971-4.471 (mins)	
Compound name	Morphine	
MS/MS acquisition mode	Event	Acquisition parameters
MRM	40	
Channel 1		CE:-31.0, 286.15>185.10
Channel 2		CE:-45.0, 286.15>157.10
Product Ion Scan	41	CE:-10.0, 30.00:467.20
Product Ion Scan	42	CE:-35.0, 30.00:467.20
Product Ion Scan	43	CE:-55.0, 30.00:467.20

Table 4. CAO compound summary: Library hit, accuracy and R² for calibration standard 100 µg/L.

Compound	Library Hit	SI score	RT (min)	Accuracy (%)	R ²
Ecgonine methylester	Ecgonine methylester	77	1.06	102.7	0.9995
Norephedrine	Norephedrine	48	3.25	107.2	0.9967
Norpseudoephedrine	Norephedrine	81	3.32	98.2	0.9999
Anhydroecgonine methyl ester	Anhydroecgonine methyl ester	32	3.40	97.6	0.9925
Morphine	Morphine	74	3.41	102.3	0.9989
Ephedrine	Ephedrine	71	3.51	109.9	0.9992
Pseudoephedrine	Pseudoephedrine	80	3.58	95.8	0.9997
Hydromorphone	Hydromorphone	85	3.62	97.0	0.9956
Methiopropamine	Methiopropamine	82	3.68	103.2	0.9998
Amphetamine	Phenylpropylamine	82	3.70	100.1	0.9993
Methcathinone	Methcathinone	93	3.71	93.3	0.9995
Noroxycodone	Noroxycodone	73	3.93	120.5	0.9949
Methamphetamine	Methamphetamine	79	3.96	94.8	0.9981
MDA	MDA	76	3.98	110.3	0.9975
Naloxone	Naloxone	61	3.98	115.0	0.9960
Dihydrocodeine	Dihydrocodeine	76	4.09	110.9	0.9957
Naltrexone	Naltrexone	77	4.11	99.8	0.9973
Ritalinic acid	Ritalinic acid	84	4.21	98.2	0.9990
Codeine	Codeine	90	4.11	114.3	0.9948
Pholcodine	Pholcodine	80	4.47	98.4	0.9940
Oxycodone	Oxycodone	71	4.20	108.1	0.9988
MDMA	MDMA	89	4.24	92.2	0.9927
6-MAM	6-MAM	81	4.24	98.4	0.9972
Mephedrone	Mephedrone	84	4.43	89.5	0.9989
BDB	BDB	82	4.45	104.0	0.9983
Norfenfluramine	Norfenfluramine	94	4.51	93.9	0.9990
MDEA	MDEA	96	4.55	102.3	0.9987
Benzoyllecgonine	Benzoyllecgonine	94	4.64	99.1	0.9985
Hydrocodone	Hydrocodone	75	4.52	112.0	0.9919
MBDB	MBDB	97	4.74	96.4	0.9995
Ethylmorphine	Ethylmorphine	93	4.71	104.6	0.9998
4-MTA	4-MTA	84	4.89	101.2	0.9980
M-CPP (meta-Chlorophenylpiperazine)	M-CPP (meta-Chlorophenylpiperazine)	86	4.89	99.0	0.9969
2-CB	2-CB	42	5.03	103.9	0.9993
Methylphenidate	Methylphenidate	45	5.20	89.2	0.9977
Cocaine	Cocaine	93	5.53	97.4	0.9997
2-CI	2-CI	83	5.53	91.9	0.9989
3,4-Methylenedioxypropylvalerone	3,4-Methylenedioxypropylvalerone	92	5.81	89.7	0.9983
Cocaethylene	Cocaethylene	96	6.11	98.3	0.9998
Dextromethorphan	Dextromethorphan	90	7.35	92.9	0.9897
EDDP	EDDP	88	7.66	97.1	0.9990
Methadone	Methadone	90	8.32	100.4	0.9999

Table 5. Benzodiazepine compound summary: Library hit, accuracy and R² for calibration standard 100 µg/L.

Compound	Library Hit	SI score	RT (min)	Accuracy (%)	R ²
7-aminonitrazepam	7-aminonitrazepam	96	5.27	95.3	0.9969
7-aminoclonazepam	7-aminoclonazepam	79	5.32	103.8	0.9986
7-aminoflunitrazepam	7-aminoflunitrazepam	95	5.99	99.8	0.9989
3-Hydroxybromazepam	3-Hydroxybromazepam	54	6.19	103.1	0.9994
Zopiclone	Zopiclone	75	6.72	107.6	0.9992
Desmethyflunitrazepam	Desmethyflunitrazepam	58	7.16	112.9	0.9988
Bromazepam	Bromazepam	68	7.19	105.1	0.9969
Flurazepam	Flurazepam	85	7.22	87.7	0.9974
N-desmethyloclobazam	N-desmethyloclobazam	63	7.25	108.3	0.9972
Lorazepam	Lorazepam	70	7.26	100.0	0.9997
3-hydroxy-flunitrazepam	3-hydroxy-flunitrazepam	61	7.41	118.8	0.9943
Oxazepam	Oxazepam	63	7.44	102.9	0.9941
Clonazepam	Clonazepam	62	7.46	92.2	0.9943
2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	89	7.47	112.4	0.9961
Nitrazepam	Nitrazepam	81	7.49	102.9	0.9996
Zolpidem	Zolpidem	87	7.56	93.9	0.9990
Desalkylflurazepam	Desalkylflurazepam	63	7.65	112.3	0.9852
Hydroxalprazolam	Hydroxalprazolam	83	7.85	86.1	0.9985
Chlordiazepoxide	Chlordiazepoxide	70	7.94	102.5	0.9993
4-hydroxymidazolam	4-hydroxymidazolam	64	8.07	91.3	0.9973
1-hydroxymidazolam	1-hydroxymidazolam	88	8.07	89.1	0.9967
Clobazam	Clobazam	87	8.11	100.6	0.9990
Nordiazepam	Nordiazepam	79	8.13	112.4	0.9951
Flunitrazepam	Flunitrazepam	83	8.23	100.7	0.9991
Lormetazepam	Lormetazepam	80	8.25	97.3	0.9953
Estazolam	Estazolam	88	8.30	104.3	0.9992
Triazolam	Triazolam	85	8.33	99.1	0.9994
Temazepam	Temazepam	76	8.40	104.5	0.9998
Ethyl loflazepate	Ethyl loflazepate	86	8.49	100.3	0.9994
Alprazolam	Alprazolam	97	8.53	112.1	0.9972
Midazolam	Midazolam	96	8.94	94.2	0.9973
Diazepam	Diazepam	92	9.07	96.1	0.9993
Clotiazepam	Clotiazepam	94	9.49	90.5	0.9959
Tetrazepam	Tetrazepam	90	9.62	90.0	0.9992
Loprazolam	Loprazolam	76	9.68	97.3	0.9987

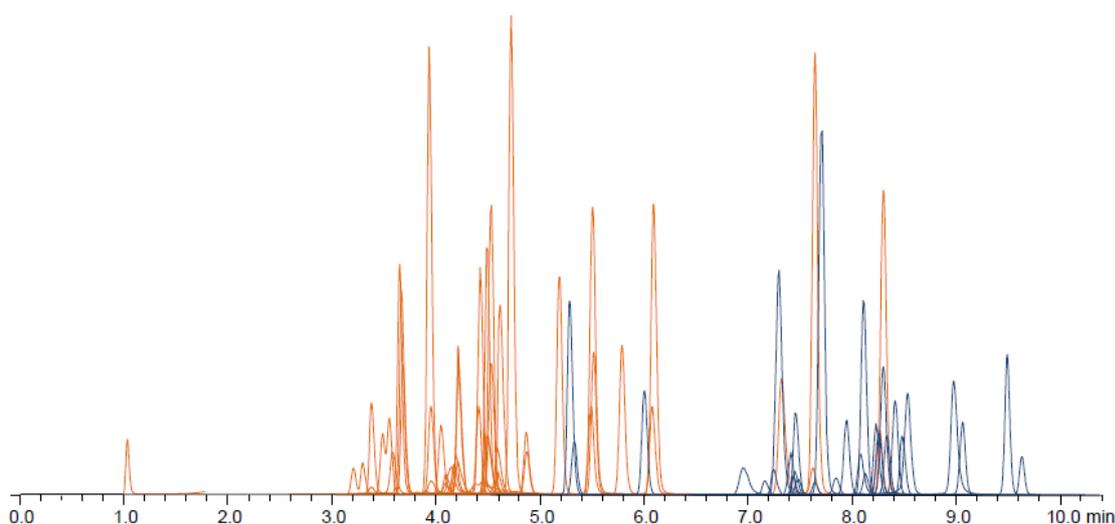


Figure 3. MRM chromatograms for 35 Benzodiazepines (blue trace) separated in under 10min (Table 4 lists each benzodiazepine in the test panel). The mobile phase composition was based on a previously published method with the aim of accommodating a broad chemical space for both positive and negative modes of ionisation⁴ (the orange trace includes the CAO compounds by way of a comparison).

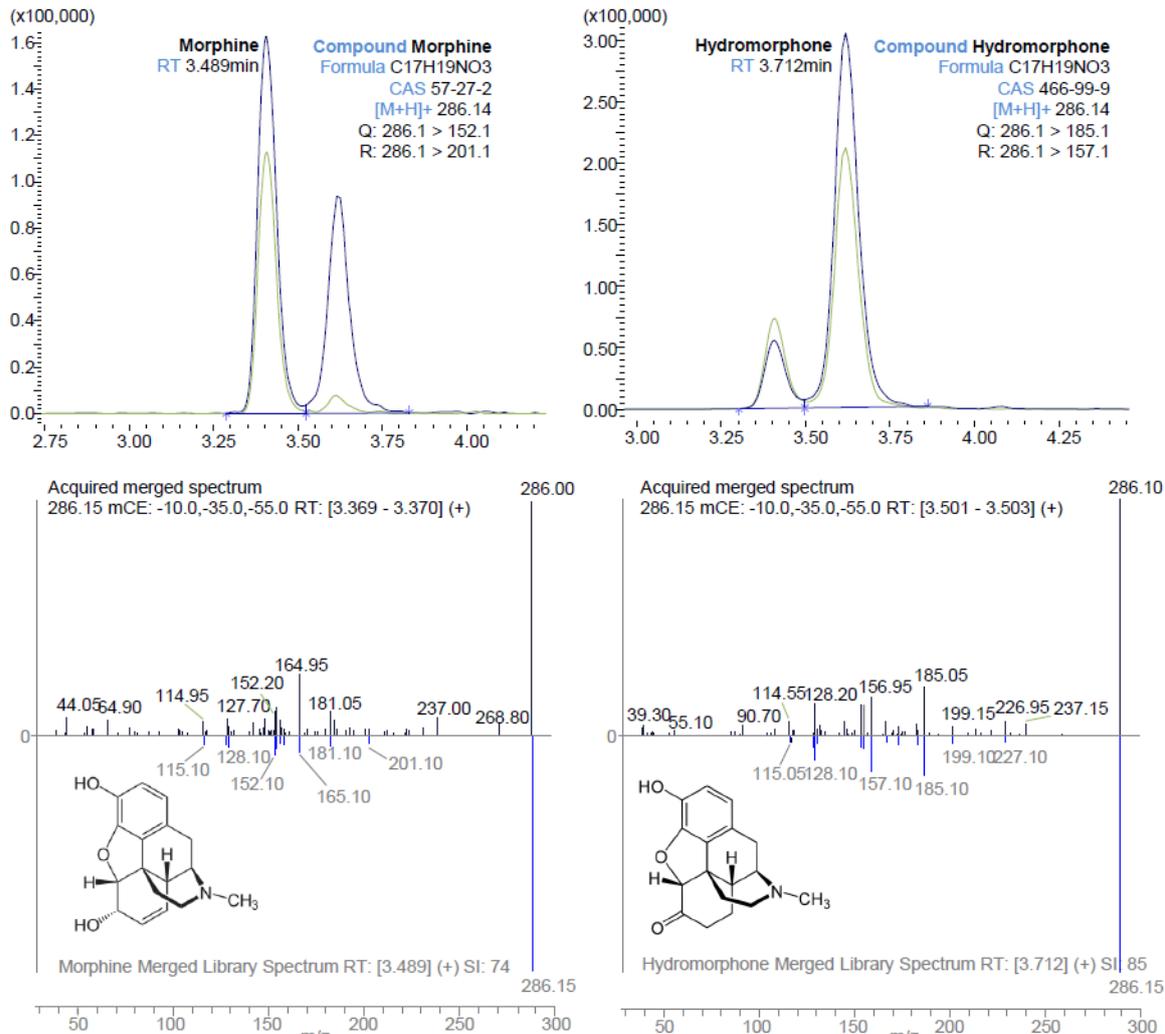


Figure 4. MRM triggered product ion scan MS/MS data for morphine and hydromorphone extracted from blood samples using a QuEChERS extraction protocol. The identification of isobaric compounds such as morphine and hydromorphone in blood samples was confirmed by matching acquired product ion spectrum data with a reference library generated using certified materials.

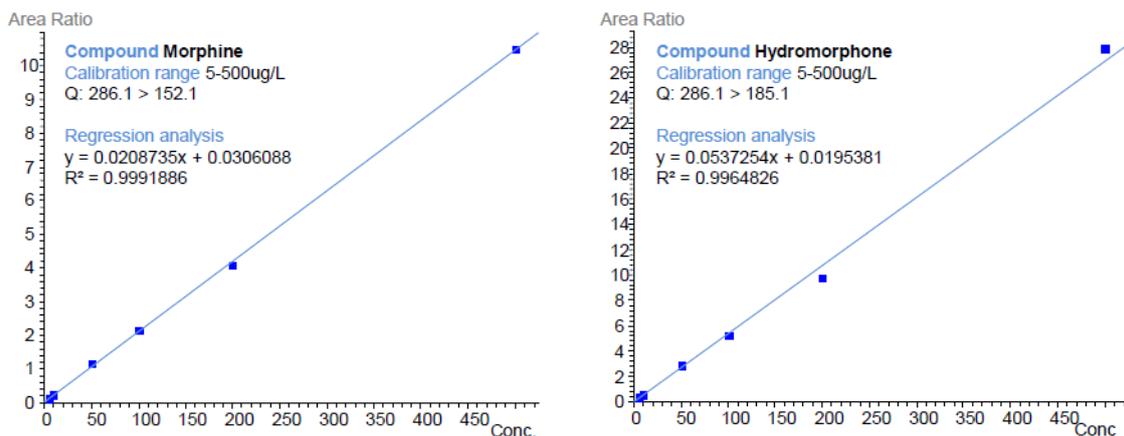


Figure 5. Calibration curve data for morphine and hydromorphone extracted from blood samples (calibration range 5-500ug/L). As the MS/MS method uses MRM triggered product ion scans the quantifier ion was used to generate the calibration curve for target compounds.

Method performance

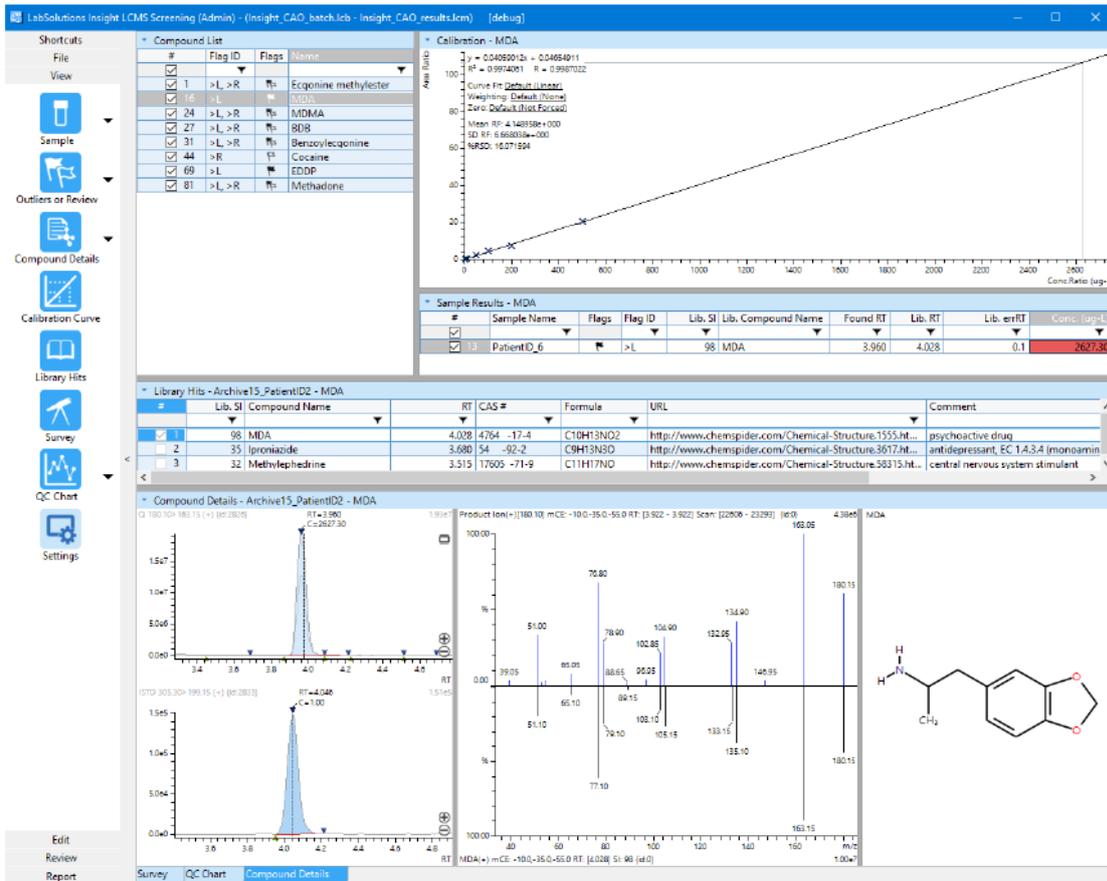


Figure 6. Insight software helps to accelerate data review-by-exception, in this case a reporting flag was enabled to filter drug concentration when measured above a set value. MDA was identified by matching the merged product ion scan data and retention time with a reference library of spectra and retention times (similarity score of 98; retention time variance of 0.1minute compared with the reference library).

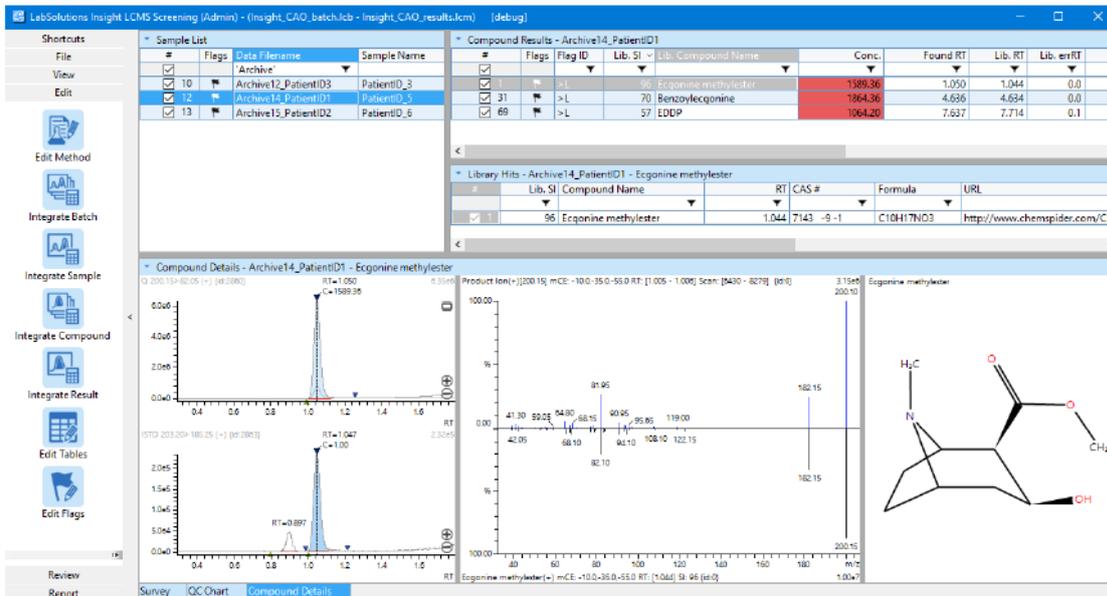


Figure 7. To help differing needs in data review the data browser can be simply changed to show or hide alternative data views. In this blood sample, egongine methylester resulted in a similarity score of 96 with the reference library.

■ Comparison with conventional MRM

methods

In Figure 9, 24 patient blood samples were analysed by both MS/MS methods. For a number of patient samples more than one target compound was measured resulting in 54 sample points in the regression analysis. Regression analysis shows a close agreement between both methods (slope=0.9996; regression coefficient $r^2 > 0.99$).

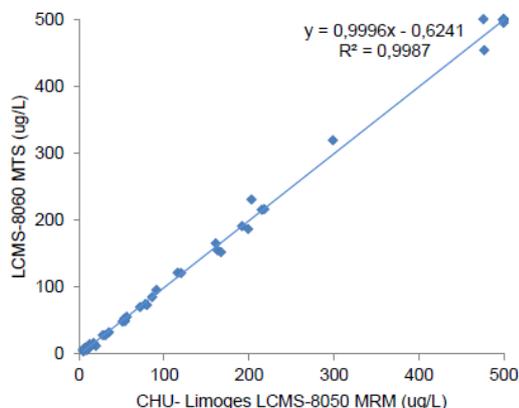


Figure 8. Regression analysis comparing the results from 24 patient blood samples acquired using the LCMS-8060 MTS method with library searching to a conventional LCMS-8050 MRM method. (Results reported from compounds with complementary ISTD compounds using internal standard calibration curve).

■ Conclusions

A generic method was developed for clinical toxicology and forensic analysis using a QuEChERS sample preparation method, a single LC analysis and an MRM triggered product ion spectrum acquisition method. The method was designed to meet the needs of a routine clinical toxicology and forensic laboratory by delivering a single approach to the analysis of a diverse range of target panels which is not only cost effective but also helps to reduce false defect reporting. By combining product ion scan data and MRM data acquisition, the MS/MS method results in higher confidence in compound identification as a result of library searching with robust quantitative data. Library identification added increased confidence to compound identification in situations where reference ion ratios were outside method tolerances or if concentrations measured were below or above LLOQ or ULOQ.

When the same samples were analysed by different methods (a conventional 2 MRM quantitative method compared to the MRM triggered product ion scan approach) the quantitative results were near identical (24 patient blood samples, 54 drug target compounds in total; regression analysis resulted in a slope=0.9996; regression coefficient $r^2 > 0.99$).

This was implemented successfully to enable screening and quantitation by MTS for a broadly targeted drugs of abuse panel of compounds. Library identification added increased confidence to compound identification in situations where reference ion ratios were outside method tolerances or if concentrations measured were below or above LLOQ or ULOQ.

■ References

1. Sauvage, F.L., Gaulier, J.M., Lachatre, G., Marquet, P. (2008) Pitfalls and Prevention Strategies for Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in the Selected Reaction–Monitoring Mode for Drug Analysis, *Clinical Chemistry*, 54:9, 1519–1527
2. Ponceleta L., El Bakhia, S., Dulaurenta, S., Saint-Marcoux, F. (2016) QuEChERS sample preparation prior to LC–MS/MS determination of benzodiazepines, *Toxicologie Analytique et Clinique*, 28(3), 201–210
3. Dulaurent, S., El Bakhia, S., Poncelet, L., Gaulier, J.M., Marquet, P., Saint-Marcoux, F. (2016) QuEChERS sample preparation prior to LC–MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(5), 1467–1474
4. Marquet, P., Venisse, M., Lacassie, É., Lachâtre, G. (2000) In-source ID mass spectral libraries for the “general unknown” screening of drugs and toxicants, *Analysis*, (28), 925–934
5. Dalsgaard, P.W., Rasmussen, B.S., Muller, I.B., Linnet, K. (2012) Toxicological screening of basic drugs in whole blood using UPLC–TOF–MS, *Drug Test. Analysis*, 4, 313–319
6. Sauvage, F.L., Saint-Marcoux, F., Duret, B., Deporte, D., Lachatre, G., Marquet, P. (2006) Screening of Drugs and Toxic Compounds with Liquid Chromatography–Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry, *Clinical Chemistry*, 52:9, 1735–1742

3) Application du kit micro-QuEChERS à l'analyse de produits stupéfiants

Dans cette étude nous avons testé et appliqué la méthode d'extraction du kit micro-QuEChERS à l'analyse de 44 molécules parmi des dérivés de la cocaïne, des amphétamines et des opiacés. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de la méthode de référence utilisée en routine au CHU de Limoges (extraction par les sels QuEChERS, analyse avec un LC-MS/MS 8050) (26).

18 échantillons de patients (14 urines, 4 salives) ont été analysés par les deux procédures. 76 composés ont été détectés et quantifiés. La régression linéaire rapportait des résultats satisfaisants avec un $R^2 > 0.98$.

La répétabilité a été évaluée à l'aide de deux contrôles qualité (une concentration faible et une concentration intermédiaire) préparés dans le sang. Le coefficient de variation et la précision étaient similaires entre les deux méthodes.

Le kit micro-QuEChERS permet d'éviter l'étape manuelle d'ajout des sels et donc de diminuer le temps dédié à l'extraction.

Ces travaux ont été présentés sous la forme d'un poster :

- au congrès de l'ASMS en 2019.
- A l'European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT 2019)
- A Forum labo (2019)
- A Euromedlab (2019)

Les pages suivantes rapportent le contenu de ce poster.

1. Introduction

Extraction procedures using QuEChERS consist of manually adding salts to the analyzed matrix, previously mixed in a polar solvent (acetonitrile, ACN). This approach is largely employed for pesticides residues but also for multiples classes of drugs.

In this study, we explored the performance of a QuEChERS extraction based on a **new pre-packed kit containing 100 mg of salts** (Micro Volume QuEChERS; MVQ) and compared it to a previously validated procedure, routinely used in a clinical lab [1].

The example of an LC-MS method for the analysis of 44 **Drugs Of Abuse** (DOA) using this new device is presented.

2. Methods and materials

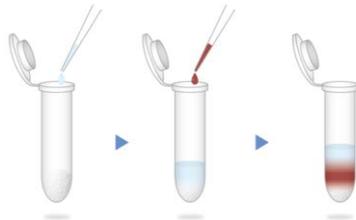
PRE-PACKED QuEChERS SALTS

QuEChERS tube : ready to use



The tube contains QuEChERS salts *previously weight* :
80 mg magnesium sulfate (MgSO₄)
40 mg sodium acetate (CH₃COONa)

Step 1



1. Add in the tube :
 - 300 µL ACN
 - 200 µL water
2. Add sample :
 - 100 µL (whole blood,...)

Step 2



Mix the solution with a vortex

Step 3



- Centrifuge the solution at room temperature (10 000 rpm, 10 min)
- 3 *slayers* must be obtained :
- ACN
 - Whole blood
 - water

Step 4



Transfert the supernatant into a LCMS vial

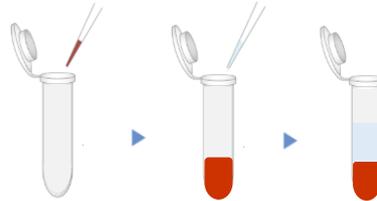
LC-MS/MS analysis



Sample preparation < 30 min

MANUAL PROCEDURE

Step 1



1. Add the sample
 - 100 µL (whole blood)
2. Add in the tube :
 - 200 µL ACN at -20°C

Step 2



Mix the solution with a vortex

Step 3



Let the tube at -20°C during 10 min

Step 4 :

Add *manually* 40 mg QuEChERS salts

Step 5



- Centrifuge the solution at room temperature (10 000 rpm, 10 min)
- 2 *slayers* must be obtained :
- ACN
 - Whole blood

Step 6



Transfert the supernatant into a LCMS vial

LC-MS/MS analysis [1]



Sample preparation < 45 min

3. Application to patients samples

The two procedures were applied to 18 **real samples** (14 urines and 4 oral fluids) from patients **tested for DOA consumption**.

79 molecules were detected by the two procedures : 6-acetylmorphine (2), amphetamine (1), anhydroecgonine methyl ester (1), benzoylecgonine (12), cocaethylene (4), cocaine (9), dihydrocodeine (3), EDDP (4), ecgonine methylester (11), hydrocodone (2), hydromorphone (4), MDA (3), MDMA (4), methadone (4), methamphetamine (1), methylmorphine (5), morphine (7), norbuprenorphine (2).

A regression analysis for concentrations measured from 3 to 500 µg/L (LOQ and ULOQ of the method, respectively) reported a R² greater than 0.98.

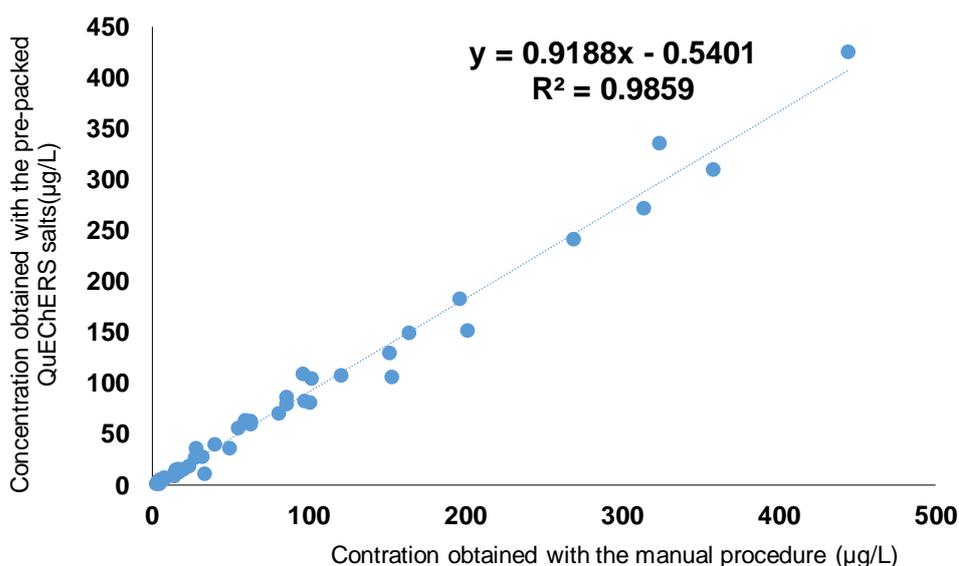


Figure 2 : Real samples with the pre-packed QuEChERS salts and the manual procedure.

4. Application to Internal quality controls (IQC)

Repeatability (n=6) was explored using 2 different whole blood IQC containing **16 molecules** at **low concentration** (QC A) and **intermediate concentration** (QC B). Similar CV and accuracy were obtained for the 2 procedures.

			Manual Extraction		Pre-packed QuEChERS	
		Reference interval	CV	Accuracy	CV	Accuracy
Amphetamine	QC A	18.88 - 28.32	5.0	107.8	1.8	93.0
	QC B	55.52 - 83.28	5.2	104.5	3.1	91.9
Methamphetamine	QC A	19.04 - 28.56	2.9	111.7	2.4	93.6
	QC B	56.80 - 85.20	2.6	109.4	2.8	92.9
MDA	QC A	18.32 - 27.48	12.0	113.4	3.2	99.9
	QC B	56.00 - 84.00	4.7	106.1	3.5	91.0
MDEA	QC A	18.88 - 28.32	5.0	108.7	2.6	89.2
	QC B	55.76 - 83.64	2.8	105.2	2.8	87.0
MDMA	QC A	19.44 - 29.16	2.5	116.8	2.5	96.4
	QC B	55.76 - 83.64	0.9	116.4	1.8	93.3
Mephedrone	QC A	16.96 - 25.44	9.7	99.1	3.0	74.8
	QC B	46.24 - 69.36	6.6	99.9	2.7	75.7
Cocaine	QC A	11.68 - 17.52	1.6	102.1	1.4	95.0
	QC B	59.96 - 85.44	2.6	103.4	3.0	90.7
Benzoylecgonine	QC A	22.88 - 34.32	2.1	124.3	2.6	98.8
	QC B	93.60 - 140.40	2.4	118.0	3.6	95.0
Ecgoninmethylester	QC A	12.72 - 19.08	3.0	122.9	5.5	100.7
	QC B	45.60 - 68.40	1.8	121.4	3.1	96.6
Cocaethylene	QC A	10.72 - 16.08	1.6	104.4	2.8	98.7
	QC B	52.72 - 79.08	1.7	102.2	3.0	92.3
Morphine	QC A	7.76 - 11.64	9.8	139.4	5.2	100.7
	QC B	56.32 - 84.48	2.5	115.6	8.6	87.8
Codeine	QC A	7.52 - 11.28	4.2	113.0	10.9	97.3
	QC B	53.12 - 79.68	2.6	115.4	4.5	96.8
Dihydrocodeine	QC A	19.2 - 28.8	3.7	107.6	4.8	95.1
	QC B	54.00 - 81.00	2.5	110.5	3.9	95.2
6-MAM	QC A	8.08 - 12.12	6.6	118.6	4.1	91.9
	QC B	30.48 - 45.72	6.1	137.0	4.0	89.4
Oxycodone	QC A	16.56 - 24.84	3.0	100.1	2.7	96.7
	QC B	57.28 - 85.92	0.9	102.2	3.9	90.0
Pholcodine	QC A	17.44 - 26.16	15.5	123.4	3.1	97.3
	QC B	50.32 - 75.48	9.0	128.0	4.4	90.5
Min-Max CV			0.9 -15.5		1.4 -10.9	
Mean accuracy				112.8		93.0

Table 1 : Repeatability study for the two procedures

Conclusion

Using the example of the preparation of samples for measurements of DOA, this preliminary study suggests that the MVQ kit has the same performance as the manual sample preparations based on QuEChERS salts. It **avoids weighing the salts** and having to put them into tubes, which obviously **shortens the time required for extraction** and **reduces possible human errors**.

Reference

1. Dulaurent S et al. Anal Bioanal Chem 2016

III) Méthodes d'extraction automatisées

1) Evaluation de la méthode MRM-Spectrum mode : application à un panel de substances illicites

L'objectif de ces travaux était à la fois de développer une méthode d'extraction automatisée avec le CLAM-2000 et de tester la capacité du MRM-Spectrum mode à détecter et quantifier un panel de molécules de la classe des stupéfiants.

De multiples méthodes de LC-MS/MS pour rechercher et identifier des molécules classées comme stupéfiants ont été reportées (27-35). Pour ces méthodes, les préparations d'échantillons peuvent être basées sur une extraction liquide/liquide, une extraction en phase solide (on-line ou off-line), une précipitation de protéines ou une extraction par les sels QuEChERS. Ces méthodes permettent d'obtenir une bonne sensibilité et des extraits « propres » mais elles nécessitent toutes de multiples étapes manuelles.

Intuitivement, on comprend que l'élimination de ces étapes manuelles et l'automatisation complète du procédé de préparation des échantillons puisse être un réel progrès. Diverses méthodes d'extraction en partie automatisées ont été proposées, mais celles-ci nécessitent toujours, au moins, un transfert manuel de l'extrait vers l'auto-sampler de la LC-MS (15-18). C'est dans ce contexte que nous avons développé un procédé entièrement automatisé avec le CLAM-2000. Le protocole d'extraction est celui décrit dans le paragraphe VIII « Choix des méthodes d'extraction ».

Concernant les méthodes d'acquisition, celles proposées pour l'analyse des stupéfiants sont généralement basées sur des méthodes MRM « classiques » avec le suivi de 2 ou 3 transitions par molécule. Des méthodes MTS ont également été proposées. Si ces deux types d'approches ont permis de développer des méthodes aux performances tout à fait acceptables, il est apparu évident que le mode d'acquisition MRM-SpM permettrait de faire un bond important en terme de spécificité, puisque, comme nous l'avons décrit plus haut (partie 2, paragraphe VII), ce dernier donne une information spectrale très riche (multiples transitions par molécule) acquise à des énergies de collision optimisées pour chaque transition, tout en conservant la possibilité de quantifier les molécules.

Concrètement, ces travaux ont consisté à valider une méthode de recherche et dosage de 42 molécules dans le plasma.

Pour l'extraction et les paramètres de séparation chromatographique, nous avons utilisé les conditions que nous avons optimisées à l'aide du mélange de référence de 23 molécules.

Une fois la vérification faite que ces conditions soient adéquates pour l'analyse du panel de stupéfiants à étudier, la méthode a été entièrement validée selon les recommandations de la norme ISO 15189. Pour chacun des composés, tous les critères d'acceptation ont été atteints avec, notamment, des limites de quantification de 1 ou 5 ng/mL.

Une étude de robustesse a été réalisée pour évaluer le temps pendant lequel une droite de calibration pourrait être utilisée pour assurer une quantification acceptable. Autrement dit, nous voulions estimer la fréquence nécessaire de calibration du système. Dans le cas d'un screening de plus de 200 composés, il paraît difficile voire impossible de réaliser une droite de calibration journalière pour l'ensemble des composés. Il est donc intéressant d'avoir une

méthode suffisamment robuste pour permettre l'utilisation d'anciennes droites de calibration, acquises tout le long de la vie du système.

Pour se faire, deux contrôles qualité comprenant chacun les 42 molécules à analyser ont été quantifiés avec 12 droites de calibration préparées jusqu'à un 1 mois avant leur analyse. Le biais et le coefficient de variation obtenus pour chacune étaient inférieurs à 20%, quel que soit le délai écoulé entre la préparation de l'échantillon et l'acquisition de la droite de calibration. Ce résultat suggérait qu'une analyse puisse être réalisée en urgence sans calibration systématique du système.

Nous avons également analysé des contrôles qualité préparés à des concentrations correspondant aux limites de quantification. Chaque composé était systématiquement détecté et classé comme « Hit 1 » avec un score de similitude (SS) supérieur à 80 ; la molécule classée en « Hit 2 » ayant généralement un score beaucoup plus faible. Ainsi, la spécificité était significativement meilleure que celle obtenue avec les modes d'acquisition classiques.

Les bonnes performances globales de la méthode ont été confirmées par l'analyse de 43 échantillons issus de patients qui ont été à la fois quantifiés avec la nouvelle procédure et avec la méthode utilisée en routine au CHU de Limoges (extraction par les sels QuEChERS et analyse avec une méthode MRM « classique »). Dans cette étude, 76 molécules ont été détectées à la fois par la nouvelle procédure et la méthode de référence du laboratoire. D'autre part, les concentrations mesurées étaient tout à fait comparables.

Ces premiers travaux ont montré que le MRM-SpM permet d'augmenter la spécificité tout en conservant les capacités de détection et de quantification des méthodes MRM « classiques ».

Ces travaux ont également démontré la capacité du CLAM-2000 à proposer des méthodes entièrement automatisées. L'intégration de ce dernier permettait ici de diminuer significativement le temps nécessaire à la préparation des échantillons sanguins pour l'analyse des stupéfiants : 45min (extraction par les sels QuEChERS) vs 9 min (extraction par le CLAM-2000). L'ensemble de la procédure présentait également une excellente robustesse et ne nécessitait pas une calibration systématique pour pouvoir quantifier un composé avec une précision acceptable. Ce dernier point paraissait très intéressant dans le cadre d'une utilisation d'un couple CLAM-2000 / 8060 dans un laboratoire fonctionnant 24/24 7-7.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication, présentée ci-dessous, dans *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2018).

Ils ont également fait l'objet :

- D'une note d'application Shimadzu
- D'un poster au congrès de l'ASMS 2018
- D'un article dans *Magazine Chromatography today* (Juin 2017)



Fully automated sample preparation procedure to measure drugs of abuse in plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Tiphaine Robin¹ · Alan Barnes² · Sylvain Dulaurent¹ · Neil Loftus² · Sigrid Baumgarten³ · Stéphane Moreau³ · Pierre Marquet¹ · Souleiman El Balkhi¹ · Franck Saint-Marcoux¹

Received: 21 February 2018 / Revised: 4 May 2018 / Accepted: 24 May 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

For the analysis of drugs and pharmaceutical compounds in biological matrices, extraction procedures are typically used for LC-MS/MS analysis often requiring manual steps in sample preparation. In this study, we report a fully automated extraction method carried out by a programmable liquid handler directly coupled to an LC-MS/MS system for the determination of 42 components (illicit drugs and/or metabolites) (plus 20 deuterated internal standards). The acquisition was performed in positive ionization mode with up to 15 MRM transitions per compound, each with optimized collision energy (MRM spectrum mode) to enable qualitative library searching in addition to quantitation. After placing the sample tube into the system, no further intervention was necessary: automated preparation used 50 μ L of blood or plasma with 3 μ L of extracted sample injected for analysis. The method was validated according to the requirements of ISO 15189. The limit of detection and quantification was 1–5 ng/mL depending on the compound. Stability experiments found that historic calibration curve data files could accurately quantify for up to 1 month with less than 20% uncertainty. Comparison to a QuEChERS method was made using patient samples providing a regression correlation $R^2 = 0.98$ between the two methods. This approach was successfully designed to support parallel sample preparation and analysis therefore significantly increasing sample throughput and reduced cycle times.

Keywords Liquid chromatography · Mass spectrometry · Automated sample preparation · Drugs of abuse

Abbreviations

DOA	Drugs of abuse
IS	Internal standard
LLOD	Lower limit of detection
LLOQ	Lower limit of quantitation
MRM	Multiple reaction monitoring
ULOQ	Upper limit of quantitation
RT	Retention time

Introduction

Opiates, amphetamines (including analogues), and cocaine are widely used drugs of abuse (DOA) and many laboratories have developed LC-MS/MS procedures to identify and quantify these compounds [1–9]. Such measurements are needed in multiple contexts within clinical and forensic toxicology (suspicion of overdose, monitoring of addicts, driving under the influence of drugs (DUID), doping control, and abstinence).

To prepare biological samples prior to DOA detection, the following approaches are currently used: liquid-liquid extraction [1], protein precipitation [9], off-line solid-phase extraction [3, 6], on-line solid-phase extraction (2D chromatography) [4, 5, 10], and “QuEChERS extraction” (which consists of adding salts to a matrix that is previously mixed in a polar solvent) [7, 8]. Whichever the approach, multiple manual steps are still necessary to prepare a sample. Intuitively, progress would come from eliminating these manual steps and fully automating the process. The diverse approaches of automation of LC-MS/MS analyses have been extensively reviewed by Vogeser and

✉ Franck Saint-Marcoux
franck.saint-marcoux@unilim.fr

¹ Department of Pharmacology and Toxicology, Limoges University Hospital, 2 avenue Martin-Luther King, 87042 Limoges, France

² Shimadzu Corporation, Manchester M17 1GP, UK

³ Shimadzu Europa GmbH, Albert-Hahn-Straße 6, 47269 Duisburg, Germany

Kirchhoof [11]. Many of these automated methods involve bespoke configuration of liquid handling components and cannot be considered commercially available solutions except to highly experienced method development chemists. Furthermore, the automated liquid handling systems are configured to prepare extracts onto a secondary sample carrier which is then manually transferred onto the autosampler of the LC-system. An example of an off-line automated method is by Bjork et al. in which 31 illicit and medicinal drugs and metabolites were quantified from whole blood [12].

Mass spectrometry acquisition methods are generally based on multiple reaction monitoring (MRM). Conventional MRM methods with 2–3 fragment ion transitions per compound are considered the gold standard producing good specificity and sensitivity [14, 15]. An alternative approach is the multiple targeted screening (MTS) method: only when a specific ion reaches a predefined threshold, this MRM triggers MS/MS product ion scans at different collision energies to enable confirmation of the compound identification using library spectra. However, this approach does not optimize the collision energies for each compound. Furthermore, these methods do not eliminate false positive or false negative results. Therefore, a better approach, such as providing a higher number of MRM transitions for each compound, has significant benefits because each transition has optimized collision energies for each ion. Ion intensities from each transition are used to construct an MRM spectrum that can be used to search against registered library spectra.

Here, we present a fully automated sample preparation procedure to measure a panel of DOA using multiple optimized MRM transitions and acquired by MRM spectrum mode.

Material and methods

Chemicals and reagents

Table 1 reports the 42 compounds analyzed in the present study. Norfenfluramine and meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier France). 4-Methylthioamphetamine (4-MTA), benzodioxolylbutanamine (BDB), dextromethorphan, 2-methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butane (MBDB), norpseudoephedrine, pholcodine, dihydrocodeine D₃, 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) D₅, 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2-CI), and buprenorphine were supplied by Lipomed (Arllesheim, Switzerland). 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV), 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2-CB), 6-monoacetylmorphine (6-MAM), ritalinic acid, amphetamine, anhydroecgonine methylester, cocaethylene, cocaine, dihydrocodeine, ecgonine methylester, EDDP, ethylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine

(MDEA), MDMA, methadone, methamphetamine, methiopropamine, methylmorphine, methylphenidate, morphine, naloxone, naltrexone, norbuprenorphine, noroxycodone, oxycodone, mephedrone, 6-monoacetylmorphine D₃, amphetamine D₅, benzoylecgonine D₃, ecgonine methylester D₃, ephedrine D₃, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) D₅, MDEA D₅, naloxone D₅, naltrexone D₃, noroxycodone D₃, and oxycodone D₃ were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Benzoylecgonine, MDA, norephedrine, methcathinone, cocaethylene D₃, cocaine D₃, methylmorphine D₃, and morphine D₃ were supplied by LGC Standards Molsheim, France. Methanol was purchased from Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France). Formic acid, ammonium formate, and acetonitrile were purchased from Biosolve (Dieuze, France). Pure water was obtained using a Millipore Direct Q purification system (Saint Quentin en Yvelines, France).

Sample preparation

The extraction procedure was performed by an automated sample preparation system: the CLAM-2000 (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) coupled to an LC-MS/MS system (see below). Briefly, once the plasma or whole blood sample was loaded onto the automated system, no further human intervention was required. The plasma sample could be either contained in an EDTA tube (5 or 7 mL) that was centrifuged or in a secondary tube. The whole blood samples were contained in EDTA tubes (5 or 7 mL).

The sample was automatically delivered to a tube containing a filter, to which reagents were added, mixed, and then filtered. Precisely, 100 µL of acetonitrile was added to a polytetrafluoroethylene (PTFE) filter vial (0.45 µm pore size) previously conditioned with 20 µL methanol. Then, 50 µL of plasma (or whole blood) and 10 µL of isotopically labeled internal standards (IS 0.2 µg/mL in acetonitrile) were added. The mixture was agitated for 120 s (1900 rpm) then filtered by application of vacuum pressure (−60 to −65 kPa) for 120 s into a collection vial. Finally, 3 µL of the extract was injected into the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS conditions

The chromatographic system consisted of two Shimadzu LC-30 AD pumps (Nexera X2), a CTO 20 AC oven, and a SIL-30 AC-MP autosampler (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France). Chromatographic separation was performed in a Raptor biphenyl, 2.7 µm (100 × 2.1 mm I.D.) column (Restek, Lisses, France), using a gradient of (A) ammonium formate 2 mM/0.002% formic acid buffer, and (B) methanol ammonium formate 2 mM/0.002% formic acid buffer as mobile phase at a flow-rate of 0.3 mL/min (0.6 mL/min 11–16.2 min to accelerate column conditioning and equilibration), as follows: 0.00–1.00 min, 5% (B); 1.00–2.00 min, 5 to 40% (B); 2.00–

Table 1 MRM transitions, retention times, and the total number of MRM transitions measured using MRM spectrum mode during the acquisition for 42 compounds and their 20 internal standard compounds

Compounds	Precursor ion		Product ion						Retention time (min)	Number total of MRM transitions
	<i>m/z</i>	Q1 pre-bias (V)	Quantitation			Reference				
			<i>m/z</i>	Collision energy (eV)	Q3 pre-bias (V)	<i>m/z</i>	Collision energy (eV)	Q3 pre-bias (V)		
2-CI	308.00	-11.0	290.85	-14.0	-13.0	275.85	-24.0	-29.0	5.03	15
2C-B	260.05	-10.0	242.90	-12.0	-11.0	227.85	-22.0	-23.0	4.58	15
3,4-Methylenedioxypropylvalerone	276.15	-10.0	126.10	-14.0	-12.0	175.00	-12.0	-17.0	5.18	15
4-MTA	182.10	-12.0	117.10	-21.0	-11.0	165.05	-12.0	-10.0	4.45	15
6-acetylmorphine	328.35	-12.0	164.95	-39.0	-16.0	211.00	-27.0	-21.0	3.57	15
6-acetylmorphine-D3	331.35	-24.0	165.15	-43.0	-17.0	211.10	-27.0	-21.0	3.61	2
Amphetamine	136.10	-10.0	91.00	-22.0	-17.0	119.05	-15.0	-20.0	3.42	8
Amphetamine-D5	141.10	-15.0	93.10	-18.0	-17.0	124.15	-14.0	-13.0	3.42	2
Anhydroecgonine methyl ester	182.10	-12.0	118.00	-23.0	-11.0	91.05	-29.0	-20.0	3.17	15
BDB	194.10	-13.0	135.00	-20.0	-13.0	177.05	-12.0	-17.0	4.06	8
Benzoyllecgonine	290.15	-11.0	168.05	-10.0	-16.0	77.00	-29.0	-13.0	4.57	15
Benzoyllecgonine-D3	293.15	-14.0	171.20	-20.0	-17.0	77.05	-56.0	-13.0	4.57	2
Buprenorphine	468.30	-16.0	54.95	-52.0	-20.0	396.00	-41.0	-26.0	7.31	15
Buprenorphine-D4	472.30	-13.0	59.10	-50.0	-22.0	88.10	-50.0	-16.0	7.13	2
Cocaehtylene	318.15	-20.0	196.00	-10.0	-20.0	76.95	-32.0	-30.0	5.49	15
Cocaehtylene-D3	321.15	-12.0	199.25	-21.0	-22.0	85.20	-32.0	-16.0	5.49	2
Cocaine	304.15	-11.0	182.00	-10.0	-20.0	76.95	-30.0	-29.0	4.94	15
Cocaine-D3	307.15	-22.0	185.15	-19.0	-20.0	85.25	-31.0	-15.0	4.94	2
Codeine	300.15	-11.0	215.00	-25.0	-22.0	151.95	-62.0	-28.0	3.56	15
Codeine-D3	303.15	-14.0	215.25	-26.0	-20.0	181.20	-37.0	-17.0	3.58	2
Dextromethorphan	272.20	-10.0	171.00	-20.0	-17.0	215.05	-12.0	-14.0	6.43	15
Dihydrocodeine	302.20	-11.0	198.95	-33.0	-19.0	127.95	-64.0	-23.0	3.51	15
Dihydrocodeine-D3	305.20	-15.0	199.15	-35.0	-21.0	128.30	-55.0	-25.0	3.56	2
Ecgonine methylester	200.15	-12.0	182.05	-18.0	-18.0	82.05	-26.0	-13.0	0.97	15
Ecgonine methylester-D3	203.15	-14.0	185.25	-18.0	-13.0	85.20	-26.0	-30.0	0.97	2
EDDP	278.20	-10.0	234.00	-17.0	-20.0	249.05	-13.0	-16.0	6.96	15
EDDP-D3	281.20	-19.0	234.30	-31.0	-16.0	249.35	-25.0	-17.0	6.95	2
Ephedrine-D3	169.15	-17.0	151.25	-14.0	-16.0	91.20	-33.0	-17.0	3.28	2
Ethylmorphine	314.20	-12.0	152.00	-65.0	-14.0	165.00	-42.0	-16.0	4.04	15
Hydrocodone	300.15	-11.0	198.95	-31.0	-20.0	127.90	-59.0	-22.0	3.82	15
Hydromorphone	286.15	-10.0	185.00	-30.0	-19.0	157.00	-42.0	-15.0	3.24	15
MBDB	208.15	-20.0	134.95	-6.0	-20.0	50.95	-60.0	-19.0	4.28	9
m-CPP	197.10	-12.0	118.10	-34.0	-11.0	154.00	-20.0	-15.0	4.38	15
MDA	180.10	-12.0	105.05	-21.0	-22.0	163.05	-13.0	-16.0	3.66	15
MDA-D5	185.10	-13.0	110.15	-22.0	-11.0	168.15	-13.0	-18.0	3.64	2
MDEA	208.15	-11.0	163.00	-13.0	-15.0	105.00	-25.0	-10.0	4.11	11
MDEA-D5	213.15	-23.0	163.15	-14.0	-30.0	105.20	-28.0	-18.0	4.10	2
MDMA	194.10	-13.0	163.05	-15.0	-28.0	105.05	-25.0	-18.0	3.84	12
MDMA-D5	199.10	-21.0	165.15	-15.0	-18.0	107.15	-25.0	-11.0	3.83	2
Mephedrone	178.10	-13.0	145.05	-20.0	-14.0	160.05	-15.0	-10.0	3.99	15
Methadone	310.20	-18.0	310.20	-8.0	-21.0	76.95	-30.0	-13.0	7.60	14
Methadone-D9	319.20	-20.0	268.25	-20.0	-20.0	105.05	-25.0	-20.0	7.60	2
Methamphetamine	150.15	-10.0	91.00	-22.0	-20.0	119.05	-16.0	-21.0	3.63	8
Methcathinone	164.10	-30.0	131.05	-21.0	-23.0	146.05	-16.0	-30.0	3.43	13

Table 1 (continued)

Compounds	Precursor ion		Product ion						Retention time (min)	Number total of MRM transitions
	<i>m/z</i>	Q1 pre-bias (V)	Quantitation			Reference				
			<i>m/z</i>	Collision energy (eV)	Q3 pre-bias (V)	<i>m/z</i>	Collision energy (eV)	Q3 pre-bias (V)		
Methiopropamine	156.10	-11.0	97.00	-23.0	-10.0	58.00	-12.0	-23.0	3.39	15
Methylphenidate	234.15	-20.0	84.00	-8.0	-20.0	91.0	-46.0	-17.0	4.71	7
Morphine	286.15	-10.0	152.00	-60.0	-15.0	201.00	-27.0	-20.0	3.11	15
Morphine-D3	289.15	-14.0	152.10	-59.0	-26.0	201.15	-26.0	-21.0	3.13	2
Naloxone	328.15	-12.0	310.00	-21.0	-21.0	212.00	-39.0	-22.0	3.64	14
Naloxone-D5	333.15	-12.0	315.20	-20.0	-22.0	258.10	-29.0	-27.0	3.60	2
Naltrexone	342.15	-12.0	324.05	-22.0	-15.0	270.05	-28.0	-28.0	3.75	14
Naltrexone-D3	345.15	-16.0	327.15	-22.0	-23.0	270.15	-28.0	-29.0	3.76	2
Norbuprenorphine	414.25	-28.0	54.90	-63.0	-24.0	83.05	-50.0	-14.0	5.50	15
Norephedrine	152.10	-10.0	134.05	-15.0	-13.0	115.05	-25.0	-11.0	3.02	11
Norfenfluramine	204.10	-14.0	159.00	-20.0	-15.0	109.05	-40.0	-18.0	4.16	15
Noroxycodone	302.15	-11.0	199.00	-37.0	-20.0	196.95	-26.0	-20.0	3.51	15
Noroxycodone-D3	305.15	-22.0	287.15	-17.0	-20.0	190.10	-25.0	-20.0	3.56	2
Norpseudoephedrine	152.10	-10.0	134.05	-15.0	-13.0	115.05	-25.0	-11.0	3.12	11
Oxycodone	316.15	-12.0	298.00	-20.0	-20.0	240.95	-29.0	-24.0	3.74	14
Oxycodone-D3	319.15	-23.0	301.10	-19.0	-21	259.10	-26.0	-27.0	3.73	2
Pholcodine	399.25	-14.0	114.05	-36.0	-11.0	381.05	-25.0	-18.0	3.20	5
Ritalinic acid	220.15	-14.0	84.10	-22.0	-14.0	56.05	-44.0	-22.0	4.14	10

Quantitative data was measured using quantifier ion and reference ion with ion ratio percentage tolerance of 20%. Additional MRM transitions were used for library identification

10.50 min, 40 to 100% (B); 10.50–11.00 min, 100% (B); 11.01–13.50 min, 100% (B); 13.50–13.51, 100 to 5% (B); 13.51–18 min, 5% (B). Oven temperature was set at 40 °C.

LC-MS/MS analysis was performed on an LCMS-8060 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) used in positive electrospray ionization mode. The interface parameters and common settings were as follows: interface voltage: 1.5 kV; nebulizing gas flow: 3 L/min; heating gas flow: 10 L/min; interface temperature: 300 °C; desolvation line (DL) temperature: 250 °C; heat block temperature: 400 °C; drying gas flow: 10 L/min, collision gas pressure 250 kPa.

Acquisition by MRM Spectrum mode

All compounds were measured by scheduled MRM, with up to 15 transitions per compound throughout the entire scheduled window using 1 ms pause time and 3 to 10 ms dwell time. The number of data points measured over a chromatographic peak was greater than 10 for all compounds. All transitions were collision energy optimized from authentic standard flow injection analysis. Column separated analyses were integrated and chromatographic peak apex intensity used to extract ion intensities for construction of an MRM Spectrum. Sample

MRM spectra were searched against in-house library spectra. Library spectra were registered from fully optimized MRM data which were chromatographically separated using authentic standards. The screening library contained over 1000 registered compounds including compound class information, retention time, and additional meta-data (formula, structure, CAS number). Library searching was restricted to matches within ± 0.5 min of the measured compound. Library search result score was generated by measuring the difference of intensity for a spectral peak at a given *m/z* value; the smaller this difference, the greater the match enabling a similarity index (SI) score to be generated using LabSolutions Insight Screening software (version 3.1, Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France).

Validation procedure

The laboratory of Pharmacology-toxicology of the Limoges University Hospital works toward accreditation by the International Standards Organization (ISO) 15189 standard (accreditation number: 8-2607). According to this accreditation, the validation protocol and the set of acceptance criteria were as follows:

- The intra-assay precision and accuracy ($n = 6$) and the inter-assay and accuracy ($n = 6$) were assessed at lower limit of quantitation (LLOQ; 1 or 2.5 or 5, depending on the compound), 50, and upper limit of quantitation (ULOQ 500 ng/mL) after complete extraction procedure and analysis of six different spiked plasma samples (compound-free human plasma) for each level. To assess the inter-assay precision and accuracy, a set of calibrating samples was analyzed each day for 6 days. The LLOQ was defined as the lowest concentration of compound that could be measured with both an intra-assay and inter-assay precision (CV%) and an accuracy (bias) less than 15%.
- Calibration standards were prepared by automatically adding appropriate working standard solutions to 100 μ L of plasma prior to extraction in order to obtain concentrations ranging from 1 to 500 ng/mL for all compounds (6 levels, 1 or 2.5 or 5 depending on the compound, 10, 50, 100, 200, and 500 ng/mL). Calibration graphs of the compounds of interest-to-internal standard peak-area ratios of the quantification transition versus expected compounds of interest concentration were constructed using a quadratic with $1/x$ or $1/x^2$ weighting regression analysis.
- Recoveries were determined at two concentration levels (LLOQ and 500 ng/mL) by measuring analyte/internal standard peak area ratios and comparing values obtained after extraction of pre-spiked plasma samples ($n = 6$) to blank plasma spiked at the correct concentration after automated sample preparation ($n = 3$).
- The effect of dilution was investigated using samples manually spiked at 150% of ULOQ then re-analyzed after two-, four-, and ten-fold dilutions. Precision CV and bias were set less than 15% to successfully validate.
- The absence of carryover was checked.
- Matrix agreement was tested for whole blood: the intra-assay precision and accuracy were assessed by preparing six replicates at LLOQ and at 500 ng/mL in whole blood from six different individuals and calculated with a calibration standard prepared in plasma. Precision CV and bias were set less than 15% to successfully validate.
- Matrix effects were evaluated in whole blood and plasma, for the 42 molecules. As previously published [8], six different whole blood and plasma samples were tested. In each case, potential ion suppression or enhancement was tested by checking average peak intensity was within 15% for the molecule of interest within matrix (whole blood or plasma spiked at 50 ng/mL) compared to that obtained from Milli Q water/acetonitrile (1/2).
- A robustness study was performed to evaluate how long acceptable quantitative accuracy could be provided by historic calibration curve data files. Freshly prepared quality control samples (5 and 50 ng/mL) were quantified

with freshly prepared calibration standards over a 4-week period. Control sample data was first processed using calibration standards prepared on the same day as control samples and then re-processed using historic calibration standard data files from up to 4 weeks old ($n = 12$).

Application of the whole procedure to real samples

The whole automated sample preparation and LC-MS/MS analysis was tested with 43 patient samples (plasma or whole blood) comparing quantitative results from the developed method and compared to a pre-existing validated method using an LCMS-8050 system, using QuEChERS salts extraction method, routinely used in our lab [8]. The developed method was measured by MRM spectrum mode, whereas the LCMS-8050 system measured samples using a conventional MRM method. Patient blood or plasma samples were obtained from a diverse range of backgrounds commonly encountered in the laboratory including routine drug testing, DUID, or emergency overdose.

Results

Automated sample preparation was performed in 8 min followed by chromatographic separation of the DOA in about 9 min (with an additional 9 min for column wash and equilibration) with retention time from 0.97 min for ecgonine methylester to 7.9 min for methadone. About 26 min were needed to obtain the first result and then, extraction and separation were performed in parallel with the system producing a result every 18 min. Mobile phase composition was based on a previously published method with the aim of accommodating a broad chemical space for both positive and negative modes of ionization separating over 1000 compounds registered to the compound library [16]. A typical extracted ion chromatogram for a plasma spiked at 100 ng/mL is presented in Fig. 1. This work is part of a larger screening study in which the gradient and mobile phase were optimized for additional compound classes such as benzodiazepines, cannabinoids, and barbiturates (data not shown). These compounds are later eluting and require acquisition in both positive and negative ion modes necessitating only a small amount of formic acid additive to enhance peak shape but not suppress ionization in negative mode. In the screening workflow, it is anticipated that patient samples should only be analyzed once for speed and efficiency in emergency situations. Although better separation and sensitivity could be achieved with bespoke methods for different compound classes, in toxicological screening workflows frequently patient samples exceed ULOQ hence the upper calibration level set to 500 μ g/L. Careful consideration was made in the compounds selected for this validated

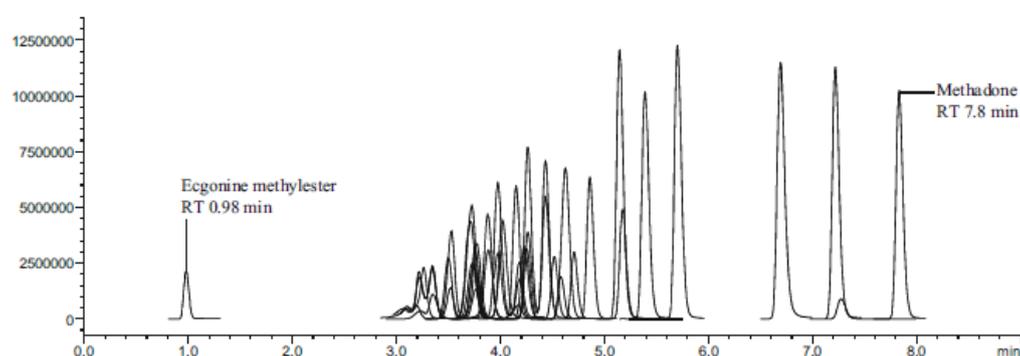


Fig. 1 TIC of 42 compounds quantified by MRM spectrum mode; calibration standard spiked concentration at 100 ng/mL measured in whole blood

method to ensure retention time separation of potentially interfering compounds such as morphine (RT 3.11 min) and hydromorphone (RT 3.24 min). Library identification through coelution interference was not affected for the compounds included in this work. Over 200 commonly encountered illicit and medical compounds tested in blood, plasma, and urine using an in-house spectral library contacting over 1000 entries from chromatographically separated compounds (data not shown). Study design was a key element in this work to avoid scenarios coelution and interference. Selectivity and specificity of the method was developed during both MRM optimisation and chromatographic separation. MRM optimisation was performed for each compound by flow injection analysis with up to 15 transitions selected per compound with optimized bias voltage for Q1 and Q3 and collision energy for each transition. Compounds were separated chromatographically and transitions experiencing interference from coeluting compounds or matrix effects were removed from the method file. Some compounds experienced very high sensitivity on the LC-MS/MS system so, in order to quantify successfully, quantifier and reference ions were carefully selected and in some cases collision energy de-optimized by -5 V in order to reduce signal intensity.

Table 1 summarizes the results of the optimization of MRM transitions acquisition. Up to 15 MRM transitions were obtained for a targeted compound. Each transition had an optimized collision energy and the MRM spectrum was extracted averaging ten points from the peak apex. All transitions were scanned for 0.5 min around the expected retention time of each compound (schedule MRM), except for norephedrine and norpseudoephedrine (1 min) and pholcodine (0.8 min). MRM spectrum mode was used for reliable compound identification as opposed to the more conventional method of ion ratios, typically using 20% tolerance. This provided greater confidence at LLOQ levels where ion ratio levels can become less reliable. Codeine, for example, is typically measured using the

reference ion m/z 300.15 $>$ 165.00; however, in this work, this transition fell outside of the 20% tolerance at 5 ng/mL; however, accuracy and precision data of the quantifier ion (m/z 300.15 $>$ 151.95) enabled LLOQ of 2.5 ng/mL. The similarity index score for codeine at 5 ng/mL was 95 with the next possible library identification being hydrocodone with a score of 62. Preliminary data analysis found similarity index scores lower than 80 which indicated false positive identification of a compound. Processing parameters for this method therefore set SI 80 as a threshold below which identification would be invalid. In this work, the first reference ion was still used in the conventional manner from which 20% tolerance was required with all MRM transitions used for library identification.

The results of the validation study are summarized in Table 2. Acceptance criteria were obtained for all explored parameters. Concerning the intra-assay and the inter-assay precision and accuracy, the CV values were less than 15%, except for benzoylecgonine, cocaethylene, EDDP, and naltrexone for which values less than 20% were reported at the LLOQ. Using quadratic models, due to the large range of concentration (LLOQ to 500 ng/mL), with a $1/x$ or $1/x^2$ weighting regression, the correlation coefficients of the calibration curves were higher than 0.99 for all the compounds. Depending on the molecule, the lower limit of detection (LLOD) and the LLOQ were set at 1, 2.5, or 5 ng/mL. The LLOD is defined by accuracy within 80–120% and repeat analysis CV $<$ 20% according to EMA guidelines (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev 1). Among the 42 compounds, matrix effect was negligible except for EME. For this compound, the mean ion suppression effect was 16.4% (CV = 12%) in blood and 15.7% (CV = 9.7%) in plasma. Dilution tests also reported satisfactory results (accuracy and CV less than 15%); though most analytes showed a bias around -10% for the tenfold dilution test.

Figure 2 demonstrates virtually no loss in sensitivity by acquiring data in MRM spectrum mode compared to

Table 2 Clinical validation results for quantitation of 42 compounds

Compound	Associated internal standard	LLOQ (ng/mL)	SI (LLOQ)	Recovery (%) (%CV)		Intra-assay accuracy (%) (%CV)	
				LLOQ (n = 6)	500 ng/mL (n = 6)	LLOQ (n = 6)	50 ng/mL (n = 6)
2-Cl	Cocaine-D3	2.5	85	103.1 (4.2)	112.5 (3.1)	102.2 (6.3)	95.5 (3.4)
2C-B	Cocaine-D3	2.5	89	112.0 (11.7)	111.8 (3.2)	93.7 (8.4)	86.0 (2.2)
3,4-Methylenedioxypropylvalerone	Cocaine-D3	1	98	92.3 (10.7)	106.8 (2.9)	103.8 (3.5)	101.5 (2.0)
4-MTA	Cocaine-D3	2.5	96	111.6 (6.7)	106.6 (2.3)	94.8 (6.3)	88.5 (3.1)
6-acetylmorphine	6-acetylmorphine-D3	5	94	93.4 (9.8)	91.4 (4.4)	95.6 (9.7)	99.1 (4.1)
Amphetamine	Amphetamine-D5	5	90	95.6 (9.4)	102.8 (2.1)	104.7 (8.9)	112.0 (4.2)
Anhydroecgonine methyl ester	Morphine-D3	5	94	114.5 (10.4)	110.6 (8.7)	114.0 (2.8)	107.4 (7.0)
BDB	MDEA-D5	5	95	77.1 (12.2)	100.9 (0.9)	93.6 (9.0)	96.7 (2.1)
Benzylecgonine	Benzylecgonine-D3	1	94	103.7 (2.1)	105.8 (3.0)	117.5 (3.5)	85.7 (0.7)
Buprenorphine	Buprenorphine-D4	2.5	96	106.5 (13.4)	107.5 (1.8)	95.4 (10.6)	101.8 (5.0)
Cocathylene	Cocathylene-D3	1	96	92.4 (7.1)	95.1 (2.4)	116.0 (1.4)	87.4 (0.8)
Cocaine	Cocaine-D3	1	96	83.8 (0.3)	99.5 (2.4)	100.7 (3.0)	92.7 (1.2)
Codeine	Codeine-D3	2.5	96	99.9 (12.4)	96.9 (7.2)	104.5 (8.3)	87.0 (1.3)
Dextromethorphan	Cocaine-D3	1	97	94.8 (6.1)	107.3 (2.6)	106.0 (4.5)	103.7 (2.1)
Dihydrocodeine	Dihydrocodeine-D3	2.5	93	105.8 (6.0)	108.9 (8.1)	94.9 (8.7)	98.9 (2.3)
Egonine methyl ester	Egonine	1	93	89.6 (11.2)	110.6 (1.5)	104.8 (8.9)	90.5 (1.1)
EDDP	EDDP-D3	1	92	102.8 (1.5)	91.1 (2.6)	117.2 (4.3)	85.8 (1.3)
Ethylmorphine	MDEA-D5	2.5	91	78.2 (16.4)	81.5 (5.1)	82.7 (11.2)	90.7 (2.8)
Hydrocodone	MDMA-D5	1	88	78.3 (3.1)	78.2 (4.2)	115.0 (5.8)	85.5 (3.6)
Hydromorphone	Morphine-D3	5	96	84.3 (15.0)	84.1 (4.2)	89.1 (4.1)	91.7 (1.5)
MBDB	Benzylecgonine-D3	1	97	71.5 (6.2)	87.0 (3.6)	103.1 (5.0)	90.3 (1.5)
m-CPP	Benzylecgonine-D3	2.5	93	101.1 (6.9)	96.0 (2.3)	84.8 (7.6)	90.8 (3.0)
MDA	MDA-D5	5	91	79.4 (1.5)	97.3 (5.8)	94.3 (10)	101.7 (3.9)
MDEA	MDEA-D5	1	91	77.3 (12.0)	87.8 (3.7)	112.1 (3.7)	88.2 (3.2)
MDMA	MDMA-D5	5	81	81.8 (6.5)	78.7 (6.2)	103.7 (3.2)	103.6 (2.3)
Mephedrone	MDEA-D5	1	86	73.8 (19.6)	87.3 (5.1)	106.9 (7.7)	94.8 (4.1)
Methadone	Methadone-D9	1	98	83.9 (4.1)	89.4 (3.4)	105.1 (7.0)	93.6 (0.8)
Methamphetamine	Dihydrocodeine-D3	1	93	92.3 (17.0)	114.0 (3.3)	106.0 (8.0)	109.7 (2.0)
Methcathinone	Amphetamine-D5	2.5	97	80.1 (15.0)	85.7 (8.4)	84.1 (3.5)	99.4 (1.5)
Methiopropamine	Amphetamine-D5	2.5	95	94.2 (17.0)	103.1 (6.9)	90.1 (5.3)	101.6 (4.3)
Methylphenidate	Cocaine-D3	1	99	81.3 (4.4)	90.7 (0.9)	101.8 (3.7)	89.6 (2.2)
Morphine	Morphine-D3	5	95	65.8 (12.7)	77.9 (9.6)	88.9 (10.2)	94.0 (2.8)
Naloxone	Naloxone-D5	2.5	92	103.4 (4.4)	102.6 (10.3)	88.9 (10.2)	94.0 (2.8)
Naltrexone	Naltrexone-D3	1	91	95.9 (13.9)	85.8 (1.8)	115.9 (6.3)	86.9 (2.0)
Norbuprenorphine	Buprenorphine-D4	5	86	81.4 (12.3)	88.9 (8.7)	100.2 (14.9)	93.2 (9.5)
Norephedrine	Ephedrine-D3	5	98	109.7 (12.4)	101.2 (14.3)	90.4 (12.2)	87.6 (2.4)
Norfenfluramine	MDEA-D5	1	83	72.8 (16.9)	90.4 (3.3)	105.8 (5.6)	86.7 (3.4)
Noroxycodone	Noroxycodone-D3	2.5	80	109.3 (8.0)	106.2 (4.4)	104.5 (14.5)	86.9 (5.0)
Norpseudoephedrine	Ephedrine-D3	5	91	90.2 (4.2)	92.8 (6.9)	94.6 (9.7)	89.8 (8.4)

Table 2 (continued)

Compound	Associated internal standard	LLOQ (ng/mL)	SI (LLOQ)	Recovery (%) (%CV)		Intra-assay accuracy (%) (%CV)	
				LLOQ (n = 6)	500 ng/mL (n = 6)	LLOQ (n = 6)	500 ng/mL (n = 6)
Oxycodone	Oxycodone-D3	1	96	85.8 (9.8)	105.2 (6.6)	86.7 (5.1)	92.3 (2.0)
Pholcodine	Morphine-D3	2.5	98	69.7 (14.3)	102.5 (4.2)	105.8 (5.9)	92.1 (4.5)
Ritalinic acid	MDEA-D5	5	96	99.6 (11.2)	103.9 (4.7)	93.2 (2.9)	103.3 (2.0)
Compound	Intra-assay accuracy (%) (%CV)		Inter-assay accuracy (%) (%CV)		Dilution test (%) (%CV)		
	500 ng/mL (n = 6)	LOQ (n = 6)	50 ng/mL (n = 6)	500 ng/mL (n = 6)	(1.5*ULOQ)/10 (n = 3)	(1.5*ULOQ)/4 (n = 3)	
2-Cl	88.4 (0.9)	99.9 (4.0)	102.7 (5.3)	105.2 (6.6)	88.6 (9.6)	108.2 (1.7)	
2C-B	94.3 (0.6)	102.7 (7.6)	96.9 (3.9)	102.5 (4.2)	85.4 (5.0)	104.1 (4.1)	
3,4-Methylenedioxypropylvalerone	85.3 (0.9)	113.6 (6.7)	102.5 (4.5)	103.9 (4.7)	89.9 (11.1)	113.3 (0.7)	
4-MTA	92.6 (1.2)	109.3 (9.6)	102.6 (6.6)	106.1 (4.2)	94.9 (3.2)	103.9 (3.9)	
6-acetyl morphine	86.8 (2.8)	96.0 (7.4)	97.8 (5.2)	107.8 (9.9)	90.9 (14.2)	112.2 (2.0)	
Amphetamine	85.3 (0.7)	103.8 (9.1)	96.1 (6.0)	104.6 (5.3)	89.0 (10.4)	107.3 (5.6)	
Anhydroecgonine methyl ester	104.2 (3.8)	93.7 (5.6)	97.0 (2.0)	108.9 (7.5)	91.2 (1.2)	111.2 (5.0)	
BDB	95.1 (1.0)	101.3 (8.8)	99.6 (2.3)	107.5 (10.2)	89.4 (6.2)	104.5 (3.1)	
Benzylecgonine	86.0 (1.4)	113.9 (7.6)	96.4 (2.2)	101.5 (4.1)	87.9 (7.7)	111.2 (3.0)	
Buprenorphine	104.7 (3.4)	107.2 (9.0)	97.0 (3.2)	104.1 (10)	85.7 (5.9)	110.5 (5.0)	
Cocaehtylene	86.7 (0.8)	115.1 (7.8)	94.3 (3.1)	104.2 (7.0)	86.9 (1.6)	110.0 (4.1)	
Cocaine	87.3 (0.6)	99.7 (5.1)	100.2 (3.0)	95.1 (5.8)	85.8 (3.1)	108.9 (3.6)	
Codeine	89.7 (6.1)	100.5 (13.9)	95.7 (8.0)	99.0 (10.1)	89.0 (1.3)	106.2 (4.8)	
Dextromethorphan	89.1 (1.9)	106.3 (6.3)	107.6 (5.0)	103.7 (7.2)	88.2 (11.9)	114.2 (5.0)	
Dihydrocodeine	86.4 (2.8)	101.1 (9.3)	95.6 (5.1)	104.5 (7.7)	88.1 (7.4)	111.0 (5.7)	
Egonine methyl/ester	92.1 (6.6)	108.6 (16.1)	97.5 (5.2)	103.5 (6.5)	89.5 (2.8)	112.4 (5.5)	
EDDP	86.1 (2.5)	113.0 (12.4)	97.0 (4.3)	100.4 (5.9)	85.4 (8.6)	109.1 (3.4)	
Ethylmorphine	85.5 (1.7)	102.4 (13.3)	98.8 (8.8)	98.9 (3.5)	85.9 (4.3)	104.8 (1.1)	
Hydrocodone	89.0 (2.5)	109.5 (12.8)	98.2 (3.8)	102.6 (8.8)	85.9 (3.6)	108.7 (6.6)	
Hydromorphone	85.6 (1.7)	103.6 (11.4)	92.6 (5.1)	110.3 (5.4)	91.0 (4.9)	104.4 (5.6)	
MBDB	85.1 (1.4)	103.5 (9.9)	100.2 (2.6)	95.9 (4.1)	89.2 (7.2)	114.8 (2.6)	
m-CPP	86.8 (2.8)	112.6 (6.8)	94.6 (6.0)	105.7 (6.9)	89.9 (13.5)	113.3 (1.4)	
MDA	86.0 (3.4)	90.2 (6.6)	95.3 (3.6)	101.7 (9.5)	87.9 (5.7)	105.7 (7.5)	
MDEA	88.3 (1.4)	112.9 (7.6)	97.6 (2.6)	103.3 (5.4)	86.0 (6.4)	105.6 (3.5)	
MDMA	85.6 (1.2)	91.4 (7.8)	99.6 (4.1)	103.9 (7.3)	85.1 (2.1)	112.1 (5.5)	

Table 2 (continued)

Compound	Intra-assay accuracy (%) (%CV)		Inter-assay accuracy (%) (%CV)		Dilution test (%) (%CV)	
	500 ng/mL (n = 6)	50 ng/mL (n = 6)	500 ng/mL (n = 6)	50 ng/mL (n = 6)	(1.5*ULOQ)/10 (n = 3)	(1.5*ULOQ)/4 (n = 3)
Mephedrone	85.8 (2.8)	104.2 (9.2)	99.9 (3.5)	100.4 (1.9)	109.2 (2.2)	102.4 (2.7)
Methadone	85.5 (0.4)	106.2 (7.7)	101.7 (3.2)	103.6 (8.3)	111.3 (2.2)	103.4 (3.5)
Methamphetamine	86.2 (1.7)	111.7 (11.4)	99.4 (6.3)	101.7 (6.8)	114.5 (5.7)	107.1 (2.1)
Methcathinone	87.3 (5.5)	102.1 (6.0)	96.4 (8.4)	105.4 (6.5)	101.8 (6.3)	99.2 (6.9)
Methiopropamine	87.5 (3.1)	110.3 (7.9)	92.4 (3.8)	95.8 (6.2)	106.6 (5.9)	104.7 (4.9)
Methylphenidate	85.6 (3.3)	103.0 (6.3)	99.6 (5.0)	98.4 (8.4)	112.5 (4.1)	90.5 (2.2)
Morphine	87.3 (2.2)	102.7 (12.5)	98.0 (4.7)	107.1 (9.3)	110.5 (3.1)	100.6 (5.9)
Naloxone	87.3 (2.2)	102.7 (12.5)	98.0 (4.7)	107.1 (9.3)	108.3 (4.9)	101.2 (8.0)
Naltrexone	88.7 (1.5)	119.9 (5.4)	93.4 (4.6)	100.7 (8.4)	102.7 (0.6)	97.9 (1.6)
Norbuprenorphine	100.1 (2.9)	96.1 (10.7)	92.9 (6.6)	98.0 (3.8)	92.7 (9.4)	89.6 (7.6)
Norephedrine	89.4 (2.6)	100.0 (13.9)	99.7 (11.1)	108.0 (13.9)	104.1 (5.4)	101.3 (5.3)
Norfenfluramine	85.7 (2.4)	110.5 (8.1)	97.6 (3.0)	104.3 (6.3)	106.7 (3.3)	102.0 (4.0)
Noroxycodone	85.1 (2.2)	104.1 (13.4)	93.7 (4.6)	103.9 (11.2)	112.2 (1.7)	107.0 (5.0)
Norpseudoephedrine	96.8 (7.4)	101.1 (15.2)	101.2 (6.5)	107.6 (10.8)	110.9 (5.3)	98.5 (4.3)
Oxycodone	85.6 (4.5)	113.2 (6.7)	98.1 (5.0)	102.7 (5.1)	108.3 (6.8)	104.6 (1.1)
Pholcodine	91.7 (4.9)	104.3 (9.0)	93.8 (6.2)	108.6 (6.5)	105.6 (3.3)	96.0 (5.3)
Ritalinic acid	90.3 (2.6)	97.2 (9.5)	99.1 (3.4)	106.0 (5.2)	112.6 (2.3)	110.5 (3.8)

Percentage recovery from automated sample preparation in plasma. Inter- and intra-assay average accuracy and precision for were within acceptable tolerances of 85–115% and better than 15% coefficient of variation (CV)

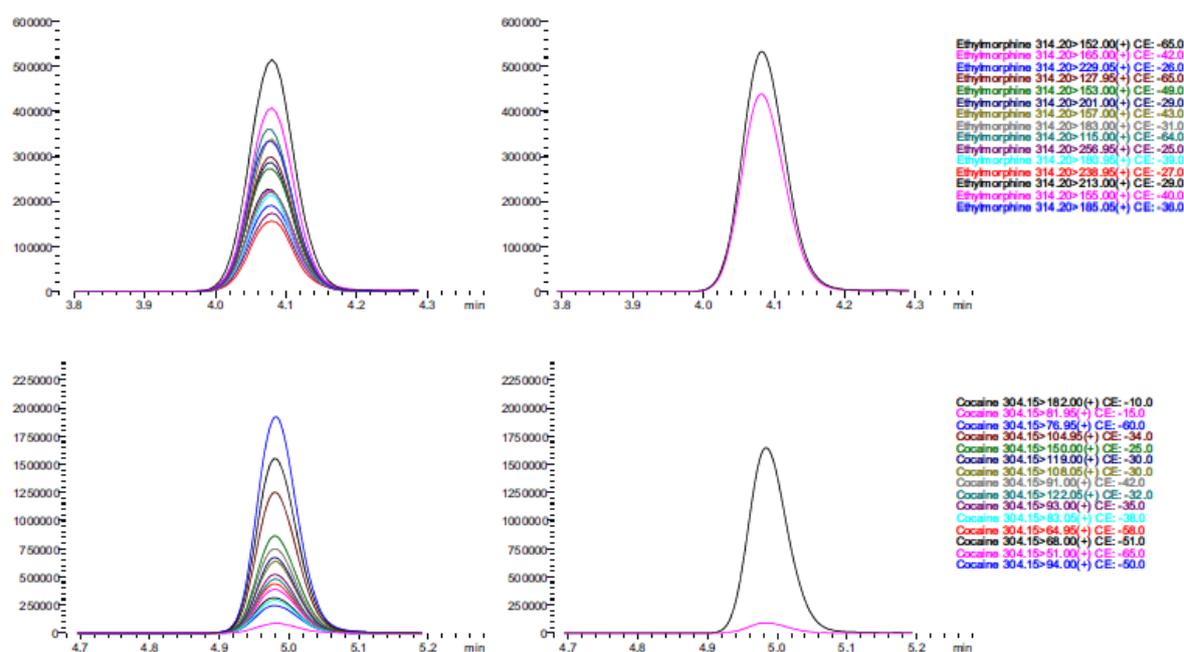


Fig. 2 Comparison between acquisition by MRM spectrum mode and standard 2 MRM of whole blood calibration standard concentration 100 ng/mL; a ethylmorphine and b cocaine, demonstrate comparable sensitivity between the two different modes of acquisition

conventional 2 MRM per compound. The dwell time and pause time for data acquisition were typically 3 and 1 ms meaning maximum sample loop time was less than 1 s even at the most intense region of overlapping compound elution (3.41 min). At this time point, 220 MRM were measured simultaneously, but still achieved an average of 20 data points measured across a peak. Library identification achieved reliable SI scoring over 80 for all compounds at LLOQ always achieving number 1 hit in a spectral library containing over 1000 compounds with number 2 typically scoring very low SI score (Fig. 3).

Quantification of quality control samples (5 and 50 ng/mL) with 12 historic calibration curves acquired up to 1 month before their injection produced accuracy variation between 85 and 115% for 93% of the molecules at 50 ng/mL and 84% at 5 ng/mL (maximum CV value was 13.0% for the control at 5 ng/mL and 14.9% at 50 ng/mL). Accuracy within 85–115% was obtained for the quantification of the control samples with calibration curves acquired up to 1 month after the injection of the controls. Within-batch maximum CV was 13.4% for the control at 5 ng/mL ($n = 12$) and 14.2% at 50 ng/mL ($n = 12$) demonstrating system stability over a 2-month period.

Biological samples from 43 patients were analyzed using both the newly developed procedure and that routinely used in the lab. Nineteen different compounds were detected in these patient samples (opiates, cocaine derivatives, and amphetamines) corresponding to a total of 76

data points in a regression analysis. When a compound was positively detected with the validated reference procedure, the sample was also analyzed on the new system using the MRM spectrum mode method. A global agreement in terms of quantitation of these compounds was observed as illustrated in Fig. 4. We observed four cases with significant differences ($> \pm 2SD$): 1 for benzoylecgonine (but there was a good agreement between the 2 methods in 11 other cases for this molecule), 1 for methylmorphine (good agreement for 5 other cases), and 2 for ecgonine methylester (good agreement for 12 other cases).

Discussion

We report the first fully automated LC-MS/MS analysis method for the detection and determination of DOA in blood with the inclusion of library identification using MRM spectrum mode. There have been numerous published methods for assaying DOA by LC-MS/MS in biological matrices; however, these have been based on a variety of sample preparation/pre-treatment methods [1–9]. They are based on LLE extraction methods [1], protein precipitation [9], off-line SPE methods [3, 6], or on-line SPE methods [4, 5, 9]. These methods provide good sensitivity and clean extracts but require many manual steps. On-line methods typically measure plasma or serum necessitating sample centrifugation prior to

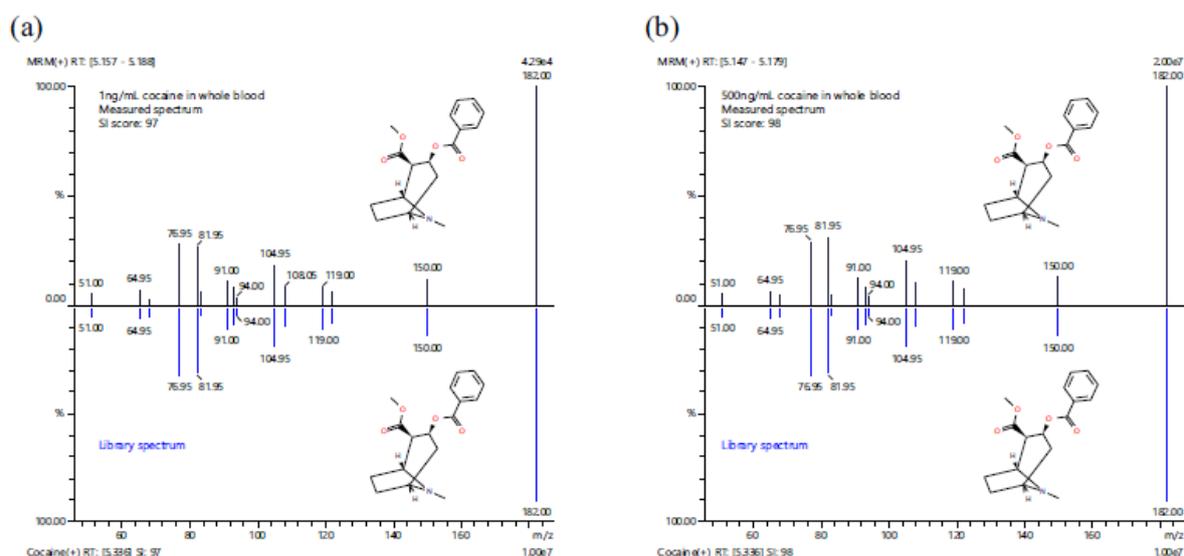


Fig. 3 Comparison of Library identification of cocaine measured in whole blood at a LLOQ (1 ng/mL) and b ULOQ (500 ng/mL)

analysis and have longer analytical run times compared to off-line prepared samples. More recently, extraction with QuEChERS salts has been proposed [7, 8, 13, 17, 18]. QuEChERS, an acronym for “quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe” was first coined by Anastassiades et al. for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables [17]. This QuEChERS salt approach is significantly faster than other approaches but still requires manual steps. The implementation of automation for all or part of the analysis process eliminates technical errors made by manual preparation and saves time in the laboratory enabling technicians to perform other manual tasks while the system performs the

analysis automatically. In the present study, we have developed a method to quantify illicit drugs in plasma where no human intervention was necessary when the primary tube was loaded on board the system. Sample preparation was synchronized with the LC-MS/MS system resulting in no time being lost while maintaining the ability to prepare the sample on-line and direct injection immediately after preparation.

We used a novel spectral acquisition method that allows to reconstruct a spectrum containing all the specific transitions of a molecule. Unlike other previously published approaches where two or three collision energies were applied to all molecules in a method using product ion scanning, we have optimized

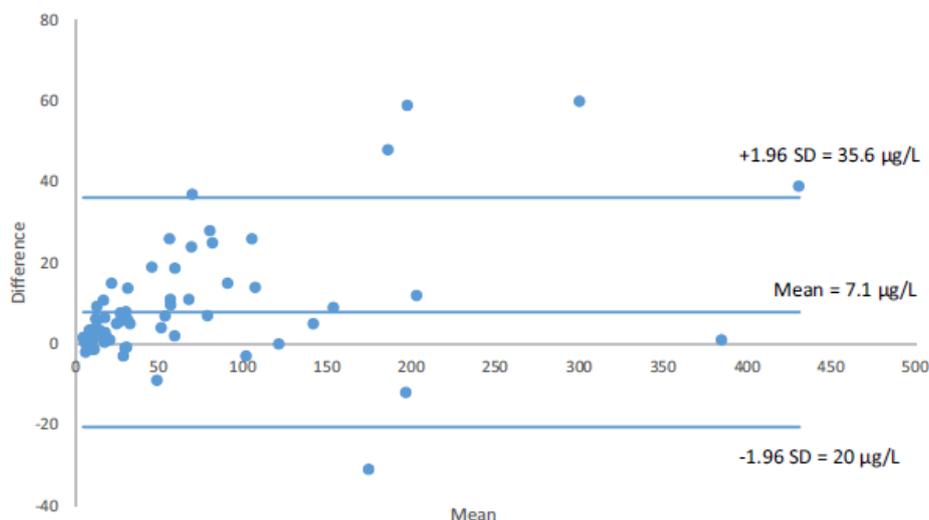


Fig. 4 Bland-Altman plot comparing the results of a pre-existing validated method based on QuEChERS prepared samples (a) and the developed approach with a fully automated sample preparation (b) in 43 patients samples. Difference is (a, b); Mean is (a, b)/2

collision energy for up to 15 transitions from a molecule. This approach makes it possible to obtain extremely specific and rich spectral information. Furthermore, no threshold triggering was applied, so all MRMs were measured during the entire scheduled acquisition period therefore meaning even at very low signal intensities an MRM Spectrum could be generated. By using very fast dwell and pause times, the burden of measuring additional MRM transitions did not alter the sensitivity compared to the standard 2–3 transition approach.

According to the requirements of ISO 15189 accreditation, we validated the specificity, sensitivity, and robustness of this method for the analysis of 42 DOA and we compared its performance with that of another accredited method used in the laboratory, in a panel of samples obtained from patients. Investigation in to the system stability and robustness by repeat calibration curve analysis demonstrated excellent reproducibility. With inclusion of spiked deuterated standards in unknown samples for quality control purposes, we estimated our results could be quantified with a reasonable uncertainty using a calibration curve dating up to 1 month. In the case of emergency patient sample analysis, quantifying a concentration from an unknown sample to this level of accuracy with such speed may mean that lifesaving treatment might be administered within a time frame not normally possible with conventional sample treatment and analysis. In the case that compounds are detected in an unknown sample that require freshly prepared calibration curve standards, new calibration samples would be prepared accordingly akin to standard workflows.

Conclusion

We completed drugs of abuse analysis using a LC-MS/MS coupled to an automated sample preparation system. The results showed the capability of this solution with good accuracy and precision regardless of hydrophilicity-hydrophobicity of the compounds. The accuracy and reproducibility support the feasibility of an integrated and automated system for LC-MS/MS analysis. The simplicity of operation and the minimal user involvement in the sample preparation process will help transform high throughput laboratories by the combined automated preparation and analysis process enabling time previously spent on sample preparation to be used more efficiently.

Compliance with ethical standards

The study has been carried out using biological samples of the biobank “CRBioLim” of the CHU of Limoges, authorized by regulatory authorities (French Ministry of Research and Regional Health Agency) and ethical committee “CPP SOOM 4” with the reference AC 2016-2748, according to the French regulation. All the samples stored in “CRBioLim” have been given by patients who did not oppose to the use of these samples for the development of an analytical method, as

allowed by the French regulation (mainly the law on bioethics n° 2004-800 of August 6, 2004).

Conflict of interest Author, Tiphaine Robin, is funded 50% by CIFRE and 50% by Shimadzu Corporation. All authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Cailleux A, Le Bouil A, Auger B, Bonsergent G, Turcant A, Allain P. Determination of opiates and cocaine and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 1999;23:620–4.
- Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;713:91–109.
- Soriano T, Jurado C, Menendez M, Repetto M. Improved solid phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. *J Anal Toxicol*. 2001;25:137–43.
- De Jager AD, Bailey NL. Online extraction LC–MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone. *J Chromatogr B*. 2011;879:2642–52.
- Saussereau E, Lacroix C, Gaulier JM, Gouille JP. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *J Chromatogr B*. 2012;885–886:17.
- Imbert L, Dulaurent S, Mercierolle M, Morichon J, Lachâtre G, Gaulier JM. Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic Sci Int*. 2014;234:132–8.
- Anzillotti L, Odoardi S, Strano-Rossi S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC–MS/MS. *Forensic Sci Int*. 2014;243:99–106.
- Dulaurent S, El Balkhi S, Poncelet L, Gaulier JM, Marquet P, Saint-Marcoux F. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408:1467–74.
- Wissenbach DK, Meyer MR, Remane D, Philipp AA, Weber AA, Maurer HH. Drug of abuse screening in urine as part of metabolite-based LC-MS screening concept. *Anal Bioanal Chem*. 2011;400:89–100.
- Bourgogne E, Grivet C, Varesio E, Hopfgartner G. Generic on-line solid phase extraction sample preparation strategies for the analysis of drugs in biological matrices by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 Jan;102:290–8.
- Vogeser M, Kirchhoff F. Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. *Clin Biochem*. 2011;44:4–13.
- Bjork, et al. Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405:2607–17.
- Poncelet L, El Bakhi S, Dulaurent S, Saint-Marcoux F. QuEChERS sample preparation prior to LC–MS/MS determination of benzodiazepines. *Toxicol Anal Clin*. 2016;28:201–10.
- Sauvage FL, Gaulier JM, Lachatre G, Marquet P. Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the selected reaction–monitoring mode for drug analysis. *Clin Chem*. 2008;54:1519–27.

15. Remane D, Wissenbach DK, Peters FT. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology—an update. *Clin Biochem.* 2016;49:1051–71.
16. Marquet P, Venisse M, Lacassie E, Lachatre G. In-source ID mass spectral libraries for the “general unknown” screening of drugs and toxicants. *Analysis.* 2000;28:925–34.
17. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.* 2003;86:412–31.
18. Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaito K, Shima N, Kamata T, et al. Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. *Forensic Sci Int.* 2013;232:40–5.

2) Evaluation de la méthode MRM-Spectrum mode : application à une méthode de screening quantitative pour un panel de 245 composés d'intérêt en toxicologie clinique

Ces travaux avaient pour objectifs de développer une méthode de screening reposant sur une extraction automatisée et permettant à la fois d'identifier et de quantifier, en une seule analyse, des molécules d'intérêt.

En toxicologie clinique, le screening aide le clinicien à expliquer l'origine d'une défaillance neurologique (dont le stade le plus sévère est le coma), d'une défaillance respiratoire (bradypnée ou tachycardie), d'une défaillance cardio-circulatoire (tachycardie, bradycardie, hypo- ou hypertension). En mettant en évidence la présence d'un ou plusieurs xénobiotiques, le screening permet de comprendre l'origine de telle ou telle défaillance, et permet d'aiguiller la prise en charge, notamment si un des toxiques présente une toxicité fonctionnelle ou lésionnelle particulièrement dangereuse (paracétamol et toxicité hépatique, ou morphine et arrêt respiratoire, par exemple).

Il est également important de comprendre qu'en toxicologie clinique, le screening est une analyse permettant d'exclure la présence de toxiques particulièrement redoutés. En d'autres termes, le screening peut être vu comme un outil utilisé pour s'assurer que tel ou tel xénobiotique n'est pas présent, notamment ceux ayant une toxicité retardée (antidépresseur tricycliques et toxicité cardiaque, par exemple).

Le laboratoire doit donc disposer d'un screening, non seulement capable de détecter les xénobiotiques usuellement responsables d'intoxications, mais de les détecter à des concentrations relativement faibles.

Le plus souvent, une fois identifié, le toxique doit être quantifié par une méthode spécifique (36-41). Un premier axe d'amélioration consiste donc à pouvoir identifier et quantifier au cours d'une même analyse pour assurer une prise en charge du patient plus rapide et plus efficace. Le deuxième axe qui permettrait également de réduire le délai de rendu de résultats est l'automatisation de la méthode d'extraction puisque celle-ci peut être longue et fastidieuse pour les méthodes de screening.

Il n'existe pas de méthode universelle de préparation et la littérature rapporte soit de simples dilutions, soit de la précipitation de protéine, soit du salting-out par les sels QUeChERs, soit des extractions en phase solide, soit des extractions liquide-liquide (42). Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre précédent, des solutions en partie automatisées ont également été proposées (15-18).

Concrètement, dans cette partie de mes travaux, nous avons étendu la méthode développée lors de nos précédents travaux (paragraphe III.1 Evaluation de la méthode MRM-SpM : application à un panel de drogues d'abus) à un panel bien plus large de molécules.

Nous avons appliqué les mêmes paramètres à un panel de 245 composés connus pour être fréquemment rencontrés en toxicologie clinique. Parmi ces substances, nous avons inclus, notamment, des anti-coagulants, des anti-dépresseurs, des anti-épileptiques, des anti-psychotiques, des barbituriques, des benzodiazépines, des bêta-bloquants, des diurétiques et des drogues d'abus.

Comme pour le travail précédent, nous nous sommes efforcés à suivre les recommandations de la norme ISO 15189 pour valider la méthode. Nous avons également étudié en détail sa robustesse et l'avons appliquée à un grand nombre d'échantillons réels issus de la routine du laboratoire.

Pour chacune des 245 molécules, nous avons vérifié la capacité d'identification de la méthode à limite de quantification. Dans cette étude, nous avons observé que chaque substance était proposée comme « Hit 1 » lors de la recherche en librairie avec un score de similitude (SS) supérieur à 80.

Eu égard aux très grandes différences de concentrations attendues parmi les 245 molécules, trois ranges de calibration ont été définis lors de la validation afin de couvrir les concentrations thérapeutiques et toxiques de chaque composé. La majorité des composés ont rempli les critères d'acceptation. Par exemple, les tests de répétabilité et de reproductibilité ont rapporté que 97.5% des composés pouvaient être quantifiés avec une imprécision inférieure à 20 % (avec un CV également inférieur à 20%).

L'étude de robustesse a été réalisée sur le mélange de référence de 23 composés utilisé lors du développement. Deux niveaux de contrôles qualités (CQ) (LLOQ et concentration intermédiaire) ont été extraits et analysés avec des droites de calibration acquises jusqu'à 4 semaines avant leur analyse. Le biais moyen était compris entre 80 et 120% pour l'ensemble des composés pour les 2 CQ. Le CV maximum était de 18,5%. De plus, aucune perte de sensibilité et aucun décalage de temps de rétention n'a été noté pendant cette période.

L'analyse de 127 échantillons issus de patients a montré que lorsqu'un composé était détecté avec une méthode quantitative de référence utilisé en routine dans le laboratoire, il l'était également avec la méthode de screening. En termes de quantification, une étude de régression linéaire a montré une excellente corrélation ($R^2 > 0.96$) entre les méthodes spécifiques du laboratoire et la méthode de screening.

En conclusion, nous avons montré la capacité du MRM-SpM à identifier et à quantifier avec une précision suffisante des « molécules de première ligne » de toxicologie clinique, en une seule analyse, tout en conservant une sensibilité suffisante. Sa principale limitation est inhérente aux méthodes de screening ciblé : « la méthode ne détecte que ce qu'elle cherche ». Nous avons donc choisi un panel représentatif de la routine hospitalière.

Le mélange de référence peut être utilisé pour la qualification journalière du système (sensibilité et temps de rétention) et des droites de calibration historique permettent d'estimer avec une précision acceptable la concentration. Ceci permet un gain de temps important, car peut éviter une calibration systématique en cas de détection d'une molécule. Enfin, l'automatisation de l'extraction permet également de simplifier et d'accélérer le rendu de résultats.

Tous ces éléments permettent de disposer d'une méthode de screening de première ligne pour un laboratoire travaillant 24/24 7-7.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication, présentée ci-dessous, dans le Journal of Analytical Toxicologie (2020).

Ils ont également fait l'objet :

- D'un article dans The Analytical Scientist (Mai 2018)
- D'un poster à l'ASMS 2017 , 2018 et 2019
- D'un poster à la NFKK 2018
- D'un poster à l'EACPT 2019
- D'un poster à Euromedlab 2019
- D'une communication orale au congrès Mass Spectrometry and Advanced in Clinical Lab (MSACL 2018)
- D'une communication orale au congrès Shimadzu clinical day Benelux (2019)
- D'une communication orale au congrès Novergian Society of Mass Spectrometry (NSMS 2019)
- D'une communication orale au congrès London Toxicology Group 2019

First-line Toxicological Screening with Fully Automated Extraction

Tiphaine Robin¹; Souleiman El Balkhi¹; Sylvain Dulaurent¹; Pierre Marquet¹; Franck Saint-Marcoux¹

(1) Department of pharmacology, toxicology and pharmacovigilance, Limoges University Hospital, France

Running title: Fully automated LC-MS-MS screening

Corresponding author :

Franck Saint-Marcoux

Department of pharmacology, toxicology and pharmacovigilance

Limoges University Hospital

France

Tel: +33555056143

Fax: +33555056162

franck.saint-marcoux@unilim.fr

UNCORRECTED MANUSCRIPT

Downloaded from <https://academic.oup.com/jat/article-abstract/doi/10.1093/jat/bkaa075/5863921> by University of New England user on 04 July 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Abstract

Background: In clinical toxicology, laboratories need screening methods allowing unambiguous identification of the compounds in a short turnaround time to either confirm or exclude the hypothesis of drug overdose, or poisoning with a toxicant.

Methods: We developed a fully automated screening procedure designed to identify and quantify in a single run 245 compounds of interest in clinical toxicology. Sample extraction was carried out by a programmable liquid handler directly coupled to a liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS-MS) system. Data acquisition was performed in the positive and negative ionization modes with up to 15 multiple reaction monitoring (MRM) transitions per compound, each with optimized collision energy to enable both qualitative library searching and quantitation. The method was validated according to the ISO 15189 requirements and was applied to real patient samples (n=127).

Results: The 15 MRM transitions per compound provided higher confidence for the identification of all the compounds. The quantitative method was fully validated with satisfactory intra- and inter-assay imprecision and inaccuracy with CV% lower than 20%. For only 9 molecules, imprecision and inaccuracy were relatively high but never exceeded 31.7%. Comparison with dedicated quantitative methods using conventional MRM monitoring performed using 127 patient samples (n=175 pairs of measured concentrations) showed excellent correlation ($R^2 = 0.96$). A robustness study showed that calibration curves prepared for up to one month yielded uncertainty < 20%. Retention times ranged from 0.89 min for metformin to 9.72 minutes for difenacoum. The automated sample preparation required 8 minutes and was followed by 10 min chromatographic separation.

Conclusion: This first-line screening procedure yields high confidence in compound detection and should be useful in core labs facing clinical toxicology situations where rapid and reliable results are needed.

UNCORRECTED MANUSCRIPT

Downloaded from <https://academic.oup.com/jat/article-abstract/doi/10.1093/jat/bkaa075/5983921> by University of New England user on 04 July 2020

Introduction:

Screening methods for compounds of interest in clinical toxicology have been historically employed as first-line analysis to either confirm or exclude the hypothesis of drug overdose, or poisoning with a toxicant. Nowadays, liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS) or tandem mass spectrometry (MS-MS) is a well-established and widely used technique in this field (1-6).

For a screening dedicated to clinical toxicology using LC-MS-MS, labs can choose between targeted and untargeted. The main advantages and drawback of these two approaches have been reviewed in detail elsewhere (1). Actually, when using low resolution mass spectrometry (MS), untargeted screening generates information-rich product ion spectra (PIS) by selecting the most intense ions from the full scan MS data to fragment them and screen the product ions in the third quadrupole, a concept often called general unknown screening (GUS) (7, 8). The obtained PIS can be searched against libraries of reference mass spectra. GUS is an untargeted method that needs no prior information about the precursor ion, hence no pre-selection of the analytes of interest, which may be ideal for clinical toxicology. Its weakness is that the PIS cycle time can be long as compared to multiple-reaction monitoring (MRM). Fast eluting compounds with medium to low intensity may also be missed, increasing the risk of false negative results. Targeted screening with low resolution systems, also known as multi-targeted screening (MTS) is typically based on the survey of a limited list of MRM transitions, specific for targeted compounds, and the generation of PIS whenever one of these MRM transitions is detected. The targeted MTS method is restricted to a predefined list of compounds but is more sensitive than GUS. However, it can also lead to false negative results as it is dependent on MRM intensity thresholds to trigger PIS acquisition. Screening techniques based on the sole MRM mode also bear the risk of mistaking isobaric compounds (9). Consequently, guidelines have proposed to monitor at least 2 or 3 ion transitions per

compound and use their relative ratios for positive identification (10, 11). However, measuring such ion ratios from trace to toxic concentrations is challenging and generally requires loosening the acceptance criteria (12). In a previous work on 42 drugs of abuse, we proposed a new paradigm based on the acquisition of up to 15 optimized ion transitions for each compound, to improve compound identification confidence (13). With this approach, no threshold triggering was applied, so that all transitions were measured during the entire scheduled acquisition period.

With regards to the rapidity needed to report results in clinical toxicology, sample extraction may be a limiting step. There is no universal extraction procedure for human samples prior to screening analysis and literature broadly reports the use of simple dilution, protein precipitation, solid-phase or liquid-liquid extraction and salting-out extraction (14). Most recent extraction procedures involving any automated step of sample preparation were extensively reviewed by Vogeser and Kirchhoff (15), Zheng et al (16), Prabhu and Urban (17) or Wei (18). Off-line automated extraction offers a wide range of possibilities, but they are not, by definition, 100% automated as the extracts need at least to be transferred into the autosampler. Several online sample extraction strategies have been used, including online solid-phase extraction (SPE), turbulent flow chromatography, online dried blood spots (DBS) and online immunoaffinity extraction (18). They allow very high throughput analysis but require complex systems that generally lack flexibility, implying that one system is generally dedicated to a single type of analysis. In this context, we published the LC-MS-MS measurement of drugs of abuse using fully synchronized, on-line sample preparation where no human intervention was necessary after the primary tube was loaded on the system (13).

After identification using a screening method, quantification using specific methods is often necessary in a second time to assess the severity of intoxication. This obviously increases the turnaround time and has an impact on patient care. Therefore, a method able to

both screen and provide a good estimate of the concentration for compounds most often involved in clinical toxicology cases is the next goal to achieve. In the present study, our objective was to develop a targeted and quantitative screening procedure designed for clinical toxicology, combining fully automated sample preparation and LC–MS-MS analysis. The procedure had to be developed for a large panel of compounds selected based on their relevance to, and occurrence in, clinical toxicology, including anticoagulants, antidepressants, antiepileptics, antipsychotics, barbiturates, benzodiazepines, beta-blockers, diuretics and drugs of abuse.

Material and methods:

Chemicals and reagents:

Table I reports the 245 compounds analyzed in the present study and the 11 internal standards included in the method.

The compounds were supplied either by Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Lipomed (Arllesheim, Switzerland), LGC Standards (Molsheim, France) or by Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Methanol was purchased from Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, France). Formic acid, ammonium formate and acetonitrile were purchased from Biosolve (Dieuze, France). Pure water was obtained using a Millipore Direct Q purification system (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Sample preparation:

Extraction was performed by an automated sample preparation system, the CLAM-2000 (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France), coupled to LC–MS-MS. Briefly, once the primary tube was loaded onto the automated system, no further human intervention was

required. Blood could be contained either in an EDTA tube (5 or 7 mL), which was then centrifuged by the CLAM-2000, or plasma in a secondary tube.

Once on track, plasma was automatically pipetted in a pre-conditioned tube containing a filter, to which reagents were then added, mixed and filtered. Precisely: 100 μ L of acetonitrile was added to a PTFE (polytetrafluoroethylene) filter vial (0.45 μ m pore size) previously conditioned with 20 μ L methanol. Then, 50 μ L of plasma and 10 μ L of isotopically labelled internal standards (at 20 mg/L for phenobarbital- d_5 , 10 mg/L for topiramate- d_{12} and 0.2 mg/L for atenolol- d_5 , benzoylecgonine- d_3 , clonazepam- d_4 , diazepam- d_5 , haloperidol- d_4 , mianserin- d_3 , morphine- d_3 and THC-COOH- d_3 in acetonitrile) were added. The mixture was agitated for 120 seconds then filtered by application of vacuum pressure (-60 to -65 kPa) for 120 seconds into a collection vial. Finally, 3 μ L of the extract was injected in the LC-MS-MS system.

LC-MS-MS conditions:

The chromatographic system consisted of two Shimadzu LC-30 AD pumps (Nexera X2), a CTO 20AC oven and a SIL-30 AC-MP autosampler (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France). Chromatographic separation was performed using a Raptor biphenyl, 2.7 μ m (100 \times 2.1 mm I.D.) column (Restek, Lisses, France), and a gradient of (A) water containing ammonium formate 2 mM/0.002% formic acid buffer, and (B) methanol containing ammonium formate 2 mM/0.002% formic acid buffer as mobile phase at a flow-rate of 0.3 mL/min (0.6 mL/min from 11 to 16.2 min to accelerate column conditioning and equilibration), as follows: 0.00–1.00 min, 10% (B); 1.00–2.00 min, 10 to 40% (B); 2.00–10.50 min, 40 to 100% (B); 10.50–11.00 min, 100% (B); 11.01–13.50 min, 100% (B); 13.50–13.51, 100 to 5% (B); 13.51–18 min, 5% (B). Oven temperature was set at 40°C.

LC-MS-MS analysis was performed on an LCMS-8060 triple-quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) used in the positive and negative

electrospray ionization modes. The interface parameters and common settings were as follows: interface voltage: 1.5kV; nebulizing gas flow: 3 L/min; heating gas flow: 10 L/min; interface temperature: 300°C; DL (desolvation line) temperature: 250°C; heat block temperature: 400°C; drying gas flow: 10 L/min, collision gas pressure 250 kPa.

MS Acquisition:

All compounds were measured in the MRM “Spectrum mode”, which involves monitoring up to 15 transitions per compound throughout the entire scheduled window using 1 ms pause time and 1 to 30 ms dwell time (Table I). The number of transitions depends on the chemical structure of the molecule and all transitions are collision-energy optimized using authentic standard flow injection analysis. Column-separated analyses were integrated and chromatographic peak apex intensity used to extract ion intensities for construction of the so-called “MRM Spectra”. Sample MRM Spectra were searched against inhouse library spectra, constituted of fully optimised MRM data from chromatographically separated authentic standards. The inhouse library included compound class information, retention time and additional meta-data (formula, structure, CAS number). Library searching was restricted to matches within +/- 0.5 min retention time of the measured compound. The library search result score was generated by measuring the difference of intensity of each transition in a spectral peak, the smaller this difference the greater the match enabling a similarity index (SI) score to be generated by LabSolutions Insight Screening software (version 3.1, Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France).

Validation procedure:

The validation protocol followed the EMEA guidelines (10). Additionally, the laboratory of Pharmacology-toxicology of the Limoges University Hospital has been accredited according

to the International Standards Organization (ISO) 15189 standard (accreditation number: 8-2607).

Calibration model/linearity: Three calibration ranges were used depending on the family of compounds. Calibration standards were prepared by automatically adding appropriate working standard solutions to 100 μ L of plasma in order to obtain concentrations ranging from 5 to 1000 ng/mL (5, 10, 50, 100, 200, 500 or 1000 ng/mL), from 50 to 5000 ng/mL (50, 100, 500, 1000, 2500 and 5000 ng/mL), or from 1000 to 50 000 ng/mL (1000, 2000, 4000, 10 000, 20 000 and 50 000 ng/mL). Calibration curves were constructed using quadratic regression analysis with $1/x$ or $1/x^2$ weighting.

Limit of quantification: The lower limit of quantitation (LLOQ) was defined as the lowest compound concentration that could be measured with intra-assay and inter-assay imprecision (CV%), and inaccuracy (bias) all $< 20\%$. For medicines in particular, the concentration ranges usually observed in patients given therapeutic doses and the minimal toxic concentrations were *a priori* explored to help define a suitable LLOQ (19-22).

Accuracy and precision: The intra-assay precision and accuracy ($n = 6$) and the inter-assay precision and accuracy ($n = 6$) were assessed at LOQ, intermediate concentration and ULOQ after extraction and analysis of six different plasma samples (compound-free human plasma) spiked with working solutions of compounds of clinical toxicology interest at each level. To assess the inter-assay precision and accuracy, a set of calibration standards was analysed each day for 6 days.

The effect of dilution was investigated using samples manually spiked at 150% of ULOQ then re-analyzed after 2, 4 and 10-fold dilutions with blank human serum.

Carry-over: According to EMEA guidelines (10) carry-over was assessed by injecting blank samples were systematically injected after the calibration standard at the upper limit of

quantitation (ULOQ) to evaluate the carry-over effect. should not be greater than 20% of the LLOQ for the analyte and 5% of spiked amount for the internal standard.

Selectivity: was tested by analyzing 6 different blank plasma and checking that interferences had a response less than 20% of the LLOQ for the analytes and 5% for the internal standard.

Matrix effect: It was assessed for the 245 molecules. Six different plasma samples were extracted and then spiked at an intermediate concentration of all molecules. Pure standard solutions were prepared at the same concentration in water/acetonitrile (1:2). Potential ion suppression or enhancement was tested by checking that the average peak intensity in the matrix was within 20% that of the pure solution.

In order to verify that co-eluting analytes did not influence each other's analytical signal, quantification was performed with 6 mixtures (M1 to M6) containing at least 50 compounds. In each mixture, multiple compounds with very close or similar retention times were selected. Additionally, in cases where significant ion suppression or enhancement was suspected, molecules were injected alone and with coeluting molecules at intermediate concentration to compare average peak intensities.

Recoveries: Recoveries were determined at three concentration levels (LLOQ, intermediate concentration and at ULOQ) by measuring analyte / internal standard peak area ratios and comparing values obtained after extraction of pre-spiked plasma samples (n = 6) to blank plasma spiked at the correct concentration after automated sample preparation (n = 3).

Robustness study: As the preparation of several calibration points containing 245 molecules at every batch run is hardly feasible in routine settings, a robustness study was performed to evaluate the stability of the system in terms of retention time, sensitivity and calibration stability. The aim was to assess how long acceptable quantitative accuracy could be maintained using calibration curves acquired in the previous days or weeks. The study was based on a reference mix of 23 compounds distributed throughout the chromatographic

separation times and chemical characteristic (Table II). Spiked samples freshly prepared in blank human matrix at the LOQ and the intermediate concentration were quantified using historic calibration standard data files obtained for up to 4 weeks before (n = 9).

Application of the whole procedure to routine patient samples:

Patient samples were obtained from a diverse range of backgrounds commonly encountered in the lab. Using 127 such samples, the new procedure was tested by comparing its quantitative results to those of pre-existing, validated quantitative LC-MS-MS methods routinely used in our lab (i.e., methods dedicated to one compound or one class of compounds). The screening method employed the MRM Spectrum mode whereas the others were operated in conventional MRM modes (2–3 transitions per compound).

UNCORRECTED MANUSCRIPT

Results:

Screening and identification:

Library identification achieved reliable SI scoring (>80) for all compounds when spiked in plasma at LLOQ and in the M1 to M6 solutions. The correct result was always ranked first, whereas the second best hit typically yielded a very low SI score. Table I reports the MRM transitions used (with optimized collision energy for each) from which the MRM spectrum was reconstituted by averaging ten points around the peak apex. All transitions were measured for ± 0.25 min to 0.5 min around their expected retention time (schedule MRM). Figure 1 reports spectra obtained from a plasma spiked with four molecules at the LLOQ.

Quantitative method validation:

The results of the validation study are available in a supplemental data files (Tables S1 and S2). Intra-assay imprecision (CV%) was lower than 20% at the LLOQ for 236 molecules. However, for 9 molecules (i.e., 3.7% of the cases) it was greater than 20% at the tested LLOQ (maximum value was 28.8% for lamotrigine). For intra-assay and inter-assay imprecision (CV%) and inaccuracy (bias), 97.5% of the tests reported values less than 20%. In rare cases, where expected values were not obtained, imprecision and inaccuracy never exceeded 31.7%. The acceptance criteria were fulfilled for recovery, dilution, carry-over and selectivity testing. Matrix effect was noticed for only 12 molecules at 15–20% and was more pronounced for only 4 molecules at 20–25% (amoxapine, atenolol, clotiazepam, labetalol and norclozapine). Examination of the peak areas and area ratios in presence of co-eluting molecules also gave satisfactory results. In Figure 2, we report typical examples of coeluting molecules injected at intermediate concentration: 3,4 MDPV coeluates with 10-OH carbamazepine while paroxetine coeluate with desipramine.

The possibility of measuring the plasma concentration of the detected compounds using historic calibration curves gave satisfactory results with calibration curves acquired up to one month before (n = 9 calibration curves over the period). The results of this study are given in Table II. Accuracy varied between 80 and 120% for 100% of the molecules spiked at their LLOQ or at an intermediate concentration, and the maximum imprecision CV% was 18.2%. Additionally, no loss of sensitivity was noted over one month and the retention times were stable within their scheduled MRM timeframe for all compounds.

Application of the whole procedure to routine patient samples:

The analysis of 127 clinical samples received as part of our routine hospital activity showed that when a compound was positively detected with a quantitative reference method, it was always detected using the current screening technique. Sixty-one different compounds were identified in these 127 patient samples, corresponding to a total of 175 pairs of concentrations, whose regression analysis showed excellent agreement (R^2 0.96, slope 0.91). A summary of these results is presented in supplemental data (Figure S1).

Of note, the automated sample preparation required 8 minutes and was followed by 10 min chromatographic separation and 8 min column wash and equilibration. Retention times ranged from 0.89 min for metformin (an antidiabetic drug) to 9.72 minutes for difenacoum (an anticoagulant). About 26 minutes were needed to obtain the first result and then, extraction and separation were performed in parallel with the system producing a result every 18 minutes.

Discussion:

We report an innovative, targeted screening technique able to screen and quantify a panel of 245 relevant compounds for clinical toxicology in plasma. It is characterized by fully automated extraction directly coupled to an LC–MS-MS system, and an innovative acquisition mode ensuring unambiguous identification and accurate quantification. To the best of our knowledge, only a limited number of targeted screening procedures based on low resolution mass spectrometry and covering an important range of analytes from different drug classes have been published so far. Shah et al. developed a method for 200 substances of interest in forensic and doping analysis of hair samples (23). The method monitored at most four MRM transitions per compound using a “dynamic MRM” mode (proprietary software) that collected data for a given MRM during a predetermined time window. Di Rago et al. published a method for the analysis of 132 drugs and poisons in whole blood (24) that employed manual protein precipitation, an API 2000 LC–MS-MS system (ABSciex®) with electrospray ionization (ESI) in the positive and negative modes and two transitions per analyte. Remane et al. developed two LC–MS-MS procedures (positive and negative ESI) for the analysis of 100 analytes of interest in drug-facilitated crimes (25). Applied to urine samples, these last methods used a scheduled MRM mode following two transitions per compound. Gergov et al proposed a qualitative screening for 238 drugs in blood based with a two-step liquid-liquid extraction and an identification based on the compound's absolute retention time and one representative fragment ion obtained by multiple reaction monitoring (MRM) at an individually selected collision energy of 20, 35, or 50 eV (26). Rosano et al reported the targeted detection of over 200 analytes with dual transition ion monitoring using an Acquity UPLC System with a TQ Detector (Waters®) and its application to forensic cases (5). In the present work, multiple ion transitions (up to 15, depending on the chemical structure of a molecule) were monitored for each molecule. Each was obtained at its

optimized collision energy ensuring that its intensity is maximal. A few years ago, our team published forensic cases illustrating the fact that many compounds of interest can share several common transitions: for example, a metabolite of zolpidem can be mistaken for lysergic acid diethylamide, benzoylecgonine mistaken for atropine, and clomipramine for 3 phenothiazines (27). Obviously, the higher the number of ion transitions the lesser the risk of false positives. The LOD obtained for the 245 compounds and the comparative study with conventional MRM methods using 134 patient samples support the fact that the proposed 'MRM Spectrum' mode is very sensitive, despite the high number of transitions it follows for each molecule, and that its quantitation accuracy fits the purpose.

The different benefits of sample preparation automation have been largely discussed elsewhere (14-18) and it is fair to consider that "automation has to dominate where it is most effective (i.e., repetitive tasks), while creative tasks will remain the domain of humans" (28). When using pretreatment processes such as protein precipitation, liquid-liquid extraction or solid phase extraction, good performances can be obtained to eliminate the interference from matrices. However, all these multiple-step procedure are labor intensive and costly. Automation also reduces exposure of humans to hazardous environment, risk of sample contamination, chemical use and production of waste (18). Herein, we used fully automated sample preparation encompassing sample centrifuging, aliquoting, extraction and dilution, which altogether represent the most time-consuming step of LC-MS-MS analysis with direct impact on assay throughput, performance and overall cost.

The present method was validated according to the ISO 15189 requirements for clinical laboratories. Multiple guidelines propose standard practices for method validation (29-32), with some more dedicated to clinical and/or forensic toxicology (33-35). Recently, the French society of analytical toxicology has proposed recommendations for the accreditation of toxicological screening methods (36). For the present procedure, robustness assessment

showed that molecules could be quantified with reasonable uncertainty using historic calibration curves dating back up to one month. A reference mix of 23 standards (spiked at their LLOQ) is systematically analyzed daily before any clinical sample. For each molecule, observed retention time, relative retention times and ion ratios are compared to their expected values to test the system response in the positive and the negative modes across wide ranges of mass and chromatographic retention time.

The present method permits the identification and quantification of 245 compounds of clinical toxicology interest in less than 30 min. Indeed, in most clinical contexts identification is not sufficient and quantitation, or at least semi-quantitation (lower-therapeutic, therapeutic, supra-therapeutic or toxic -- when known) of the identified compounds is required. When applying GUS approaches, this implies additional analyses which inevitably increase the time to final results reporting, impacting patient care and increasing the overall costs. For each drug, included in the present procedure, the LLOQ was much less than the concentration ranges usually observed in patients given therapeutic doses: for example the LLOQ was 5 ng/mL for antidepressants and benzodiazepines, 5 to 50 ng/mL for antidiabetics and 5 to 50 ng/mL for drugs affecting cardiovascular function.

The main limitation of the present method is that inherent to all targeted screenings: it is only suitable for a predefined panel of compounds. We have selected 245 compounds based on their relevance to, and occurrence in, clinical toxicology, including anticoagulants, antidepressants, antiepileptics, antipsychotics, barbiturates, benzodiazepines, beta-blockers, diuretics and drugs of abuse. Addition of other molecules to the procedure is possible but will require validation.

Conclusion:

We have developed and validated a quantitative screening technique based on LC–MS-MS integrated with automated sample preparation for a panel of 245 compounds most frequently involved in clinical toxicology cases. The innovative MS acquisition mode employed provides high confidence in compound identification and accurate quantification with a short turn-around time. It could be proposed as a complement or an alternative to untargeted screening procedures in core labs working 24/7, when quick results are expected.

UNCORRECTED MANUSCRIPT

Downloaded from <https://academic.oup.com/jat/article-abstract/doi/10.1093/jat/bkaa075/5663921> by University of New England user on 04 July 2020

Conflicts of interest:

Tiphaine Robin received a grant from Shimadzu.

UNCORRECTED MANUSCRIPT

Downloaded from <https://academic.oup.com/jat/article-abstract/doi/10.1093/jat/kaa075/5863921> by University of New England user on 04 July 2020

References

1. Remane, D., Wissenbach, D.K. and Peters, F.T. (2016) Recent advances of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical and forensic toxicology - An update. *Clinical Biochemistry*, 49, 1051-1071.
2. Oberacher, H. and Arnhard, K. (2015) Compound identification in forensic toxicological analysis with untargeted LC-MS-based techniques. *Bioanalysis*, 7, 2825-2840.
3. Wang, Z., Lu, J., Zhang, Y., Tian, Y., Yuan, H. and Xu, Y. (2016) Applications and challenges in using LC-MS/MS assays for quantitative doping analysis. *Bioanalysis*, 8, 1307-1322.
4. Meyer, M.R. and Maurer, H.H. (2016) Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices - Where do we stand today? *Analytica Chimica Acta*, 927, 13-20.
5. Rosano, T.G., Wood, M. and Swift, T.A. (2011) Postmortem drug screening by non-targeted and targeted ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry technology. *Journal of Analytical Toxicology*, 35, 411-423.
6. Lynch, K., Breaud, A.R., Vandenberghe, H., Wu, A.H. and Clarke, W. (2010) Performance evaluation of three liquid chromatography mass spectrometry methods for broad spectrum drug screening. *Clinica Chimica Acta*, 411, 1474-1481.
7. Sauvage, F.L., Picard, N., Saint-Marcoux, F., Gaulier, J.M., Lachâtre, G. and Marquet, P. (2009) General Unknown Screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: applications and constraints. *Journal of separation science*, 32, 3074-3083.
8. Saint-Marcoux, F., Lachâtre, G. and Marquet, P. (2003) Evaluation of an improved General Unknown Screening procedure using liquid chromatography electrospray mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high performance liquid chromatography diode array detection. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14, 14-22.
9. Patteet, L., Maudens, K.E., Sabbe, B., Morrens, M., De Doncker, M. and Neels, H. (2014) High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 429, 51-58.
10. (2011) Guideline on bioanalytical method validation – 2011 version. European Medicines agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
11. (2003) Identification criteria for qualitative assay. Incorporating chromatography and mass spectrometry. World Anti-Doping Agency. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_TD2003IDCR_Identification_Criteria_Qualitative_Assays_EN.pdf
12. Sauvage, F.L., Saint-Marcoux, F., Duret, B., Deporte, D., Lachatre, G. and Marquet, P. (2006) Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 52, 1735-1742.
13. Robin, T., Barnes, A., Dulaurent, S., Loftus, N., Baumgarten, S., Moreau, S. et al. (2018) Fully automated sample preparation procedure to measure drugs of abuse in plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 5071-5083.
14. Bylda, C., Thiele, R., Kobold, U. and Volmer, D.A. (2014) Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst*, 139, 2265-2276.
15. Vogeser, M. and Kirchhoff, F. (2011) Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. *Clinical Biochemistry*, 44, 4-13.
16. Zheng, N., Jiang, H., Zeng, J. (2014) Current advances and strategies towards fully automated sample preparation for regulated LC-MS/MS bioanalysis. *Bioanalysis*, 6, 2441-2459.
17. Prabhu, G.R.D. and Urban, P.L. (2017) The dawn of unmanned analytical laboratories. *Trends in Analytical Chemistry*, 88, 41-52.

18. Wei, D., Li, M., King, K.W., Yang, L. (2015) Online and automated sample extraction. *Bioanalysis*, 7,2227-2233.
19. Baselt RC (2014) Disposition of toxic drugs and chemicals in man – 10th edition. Biomedical Publications, Seal Beach, CA
20. Hiemke, C., Bergemann, N., Clement, H., Conca, A., Deckert, J., Domschke, K. et al. (2018) Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*,51,9-62.
21. Regenthal, R., Krueger, M., Koeppel, C. and Preiss, R. (1999) Drug Levels: Therapeutic and Toxic Serum/Plasma Concentrations of Common Drugs. *Journal of clinical monitoring and computing*,15,529-544.
22. Schulz, M. and Schmoldt, A. (2003) Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie*,58,447-474.
23. Shah, I., Petroczi, A., Uvacsek, M., Ránky, M. and Naughton, D. (2014) Hair-based rapid analyses for multiple drugs in forensics and doping: application of dynamic Multiple Reaction Monitoring with LC-MS/MS. *Chemistry Central journal*,8:73.
24. Di Rago, M., Saar, E., Rodda, L.N., Turfus, S., Kotsos, A., Gerostamoulos, D et al. (2014) Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC-MS/MS. *Forensic science international*,243,35–43.
25. Remane, D., Wetzal, D. and Peters, F. (2014) Development and validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) procedure for screening of urine specimens for 100 analytes relevant in Drug-Facilitated Crime (DFC). *Analytical Bioanalytical Chemistry*,406,4411–4424.
26. Gergov, M., Ojanperä, I. and Vuori, E. (2003) Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*,795,41-53.
27. Sauvage, F.L, Gaulier, J.M., Lachâtre, G. and Marquet, P. (2008) Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the selected Reaction-Monitoring Mode for drug analysis. *Clinical Chemistry*,54,1519–1527.
28. Liscouski, J.G. (1985) Laboratory automation. *Journal of chemical information*,25,288-292.
29. Kaza, M., Karażniewicz-Lada, M., Kosicka, K., Siemiątkowska, A. and Rudzki, P.J. (2019) Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,165,381-385.
30. Moein, M.M., El Beqqali, A. and Abdel-Rehim, M. (2017) Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of chromatography B Analytical technologies in the biomedical and life sciences*,1043,3-11.
31. Kadian, N., Raju, K.S.R., Rashid, M., Malik, M.Y., Taneja, I. and Wahajuddin, M. (2016) Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,126,83-97.
32. Hess, C., Sydow, K., Kuetting, T., Kraemer, M. and Maas, A. (2018) Considerations regarding the validation of chromatographic mass spectrometric methods for the quantification of endogenous substances in forensics. *Forensic science international*,283,150-155.
33. Fachri, M.M., Leonart, L.P., Cerqueira, L.B., Pontes, F.L.D., De Campos, M.L. and Pontarolo, R. (2017) (2017) A systematic and critical review on bioanalytical method validation using the example of simultaneous quantitation of antidiabetic agents in blood. *Journal of chromatography B Analytical technologies in the biomedical and life sciences*,1055,61-71.
34. Wille, S.M.R., Coucke, W., De Baere, T. and Peters, F.T. (2017) Update of Standard Practices for New Method Validation in Forensic Toxicology. *Current pharmaceutical design*,23,5442-5454.
35. Peters, F.T., Wissenbach, D.K., Busardo, F.P., Marchei, E. and Pichini, S. (2017) Method Development in Forensic Toxicology. *Current pharmaceutical design*,23,5455-5467.
36. Guitten, J., Gaulier, J.M., Citterio-Quentin, A., Abe, E., Allibé, N., Bartoli, M. et al. (2019) Accréditation du criblage toxicologique : recommandations du groupe SFBC — SFTA. *Toxicologie Analytique et Clinique*,31,12-17.

figure captions

Figure 1. Four examples of MS spectra obtained with the MRM spectrum mode. In each case, the lower MS is the library reference and the upper MS is the observed spectrum (amitriptyline, diazepam, warfarin, and benzoylecgonine spiked at 5 ng/mL in plasma).

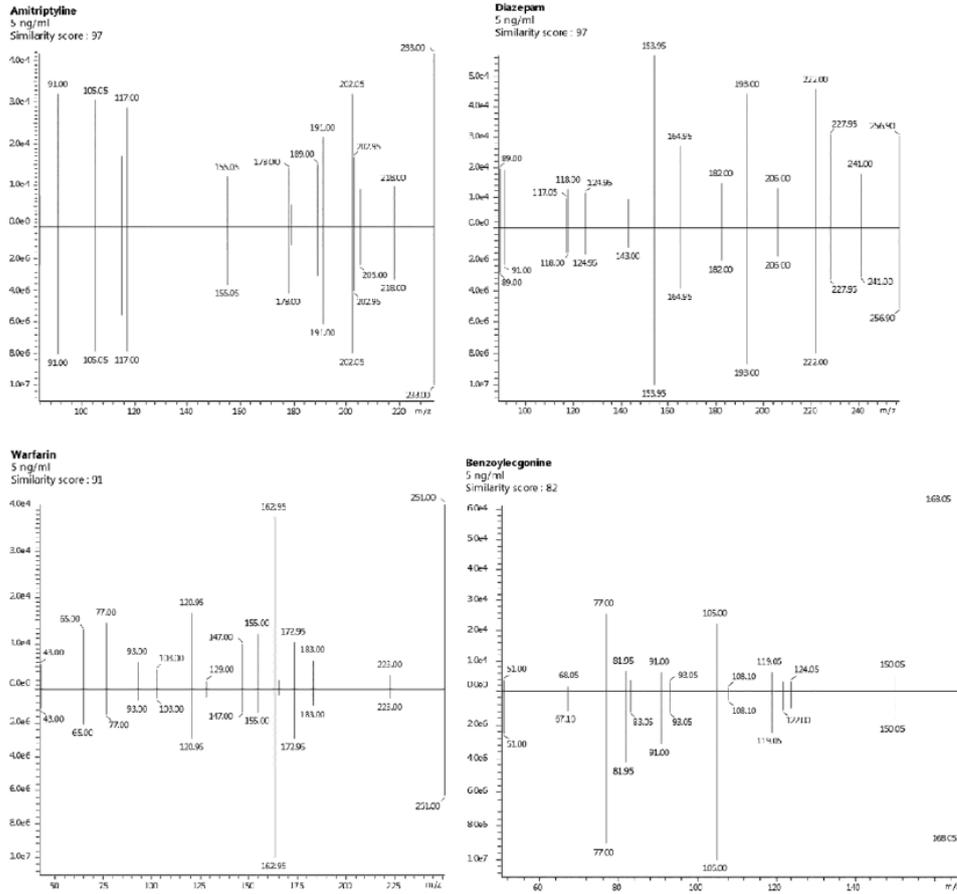
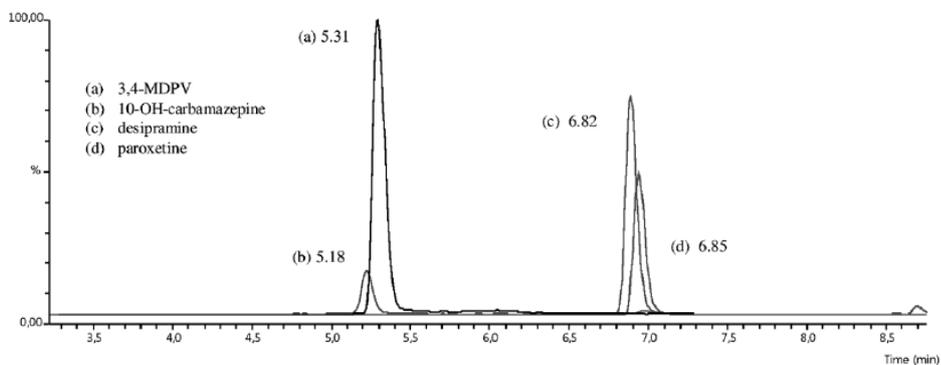


Figure 2. Evaluation of signal area in case of coelution.



Molecule	Injected alone			Injected with other co-eluted molecules			
	Retention time (min)	Signal area (10^6 cps)	Signal area for associated IS (10^6 cps)	Area ratio	Signal area (10^6 cps)	Signal area for associated IS (10^6 cps)	Area ratio
3,4 MDPV	5.18	13.32	1.63	8.15	12.93	1.51	8.54
10-OH carbamazepine	5.31	1.90	1.70	1.12	1.70	1.51	1.12
Paroxetine	6.85	7.97	5.11	1.56	7.40	5.45	1.36
Desipramine	6.82	18.03	6.04	2.99	17.09	5.45	3.13

UNCORRECTED

Table I. MRM Transitions, Retention Times and Total Number of MRM Transitions Measured as Part of the “MRM Spectrum” Mode for 245 Compounds and their 11 Internal Standards*†

Compounds	Class	Precursor ion		Product ion			Reference			RT (min)	Numb. MRM	LLOQ (ng/mL)
		m/z	Q1 pre-bias (V)	m/z	CE (V)	Q3 (V)	m/z	CE (V)	Q3 (V)			
1-Hydroxymidazolam	<i>Bzd metab.</i>	342.10	-13.0	324.00	-22.0	-15.0	202.95	-27.0	-20.0	7.98	15	5
10-Hydroxycarbamazepine	<i>Antiepileptic</i>	255.10	-16.0	194.00	-4.0	-19.0	236.95	-2.0	-24.0	5.31	14	1000
11-OH-THC	<i>Illicit drug metab.</i>	331.25	-12.0	193.05	-15.0	-14.0	313.15	-15.0	-14.0	9.29	13	5
2-ABBP	<i>Bzd metab.</i>	277.00	19.0	78.05	-28.0	-14.0	106.05	-16.0	-19.0	7.42	4	5
2,4-D [*]	<i>Pesticide</i>	218.95	11.0	161.00	14.0	16.0	125.05	30.0	25.0	4.75	2	5
2C-B	<i>Illicit drug</i>	260.05	-10.0	242.90	-12.0	-11.0	227.85	-22.0	-23.0	4.52	15	5
2-CI	<i>Illicit drug</i>	308.00	-11.0	290.85	-14.0	-13.0	275.85	-24.0	-29.0	5.03	15	5
3,4 MDPV	<i>Illicit drug</i>	276.15	-10.0	175.00	-23.0	-17.0	126.10	-27.0	-12.0	5.18	15	5
3-Hydroxybromazepam	<i>Bzd metab.</i>	332.00	-22.0	287.00	-20.0	-30.0	314.95	-15.0	-22.0	6.12	5	5
3-Hydroxyflunitrazepam	<i>Bzd metab.</i>	330.10	-12.0	283.95	-21.0	-13.0	238.00	-32.0	-24.0	7.38	13	5
4-Hydroxymidazolam	<i>Bzd metab.</i>	342.10	-24.0	325.05	-22.0	-22.0	297.05	-27.0	-20.0	7.70	5	5
4-MTA	<i>Illicit drug</i>	182.10	-12.0	117.10	-21.0	-11.0	137.05	-21.0	-23.0	4.39	15	5
6-Acetylmorphine	<i>Illicit drug metab.</i>	328.35	-12.0	164.95	-39.0	-16.0	211.00	-27.0	-21.0	3.57	15	5
7-Aminoclonazepam	<i>Bzd metab.</i>	286.05	-20.0	121.05	-29.0	-21.0	222.00	-25.0	-14.0	5.25	15	5
7-Aminonitrazepam	<i>Bzd metab.</i>	252.10	-15.0	121.00	-26.0	-11.0	77.00	-34.0	-13.0	5.19	15	5
7-Aminoflunitrazepam	<i>Bzd metab.</i>	284.10	-10.0	135.00	-26.0	-13.0	226.00	-31.0	-22.0	5.91	15	5
9-Hydroxyrisperidone	<i>Antipsych. metab.</i>	427.20	-15.0	110.00	-30.0	-19.0	41.10	-65.0	-18.0	5.52	10	5
Acetubolol	<i>Cardiovasc - renal</i>	337.20	-12.0	116.05	-25.0	-20.0	55.95	-35.0	-10.0	4.07	15	5
Acenocoumarol	<i>Anticoagulant</i>	352.10	24.0	265.00	30.0	27.0	145.00	42.0	13.0	7.70	5	5
Acepromazine	<i>Antipsychotic</i>	327.15	-12.0	222.05	-39.0	-23.0	254.00	-24.0	-26.0	7.24	8	5
Aceprometazine	<i>Antipsychotic</i>	327.15	-12.0	239.95	-24.0	-11.0	71.10	-44.0	-12.0	7.35	15	5
Acetazolamide	<i>Cardiovasc - renal</i>	223.00	-15.0	180.90	-14.0	-18.0	163.85	-22.0	-29.0	2.80	6	50
Alhmemazine	<i>Antipsychotic</i>	299.15	-11.0	180.00	-35.0	-19.0	100.05	-21.0	-20.0	7.07	7	5
Alprazolam	<i>Bzd</i>	309.10	-11.0	280.95	-20.0	-18.0	204.95	-35.0	-20.0	8.43	15	5
Alprenolol	<i>Cardiovasc - renal</i>	250.20	-17.0	116.05	-16.0	-11.0	56.00	-27.0	-25.0	5.38	15	5
Altizide	<i>Cardiovasc - renal</i>	382.00	25.0	340.85	16.0	27.0	204.95	34.0	20.0	5.37	13	50
Amiloride	<i>Cardiovasc - renal</i>	230.08	-15.0	170.95	-10.0	-17.0	142.95	-26.0	-28.0	3.04	15	50
Amiodarone [*]	<i>Cardiovasc - renal</i>	646.05	-20.0	73.10	-36.0	-15.0	72.15	-52.0	-14.0	10.24	9	50
Amisulpride	<i>Antipsychotic</i>	370.20	-14.0	112.10	-27.0	-26.0	195.95	-31.0	-19.0	4.02	15	5
Amitriptyline	<i>Antidepressant</i>	278.20	-20.0	91.00	-26.0	-14.0	233.00	-17.0	-17.0	7.19	15	5
Amlodipine	<i>Cardiovasc - renal</i>	409.15	-14.0	409.15	-13.0	-26.0	294.00	-13.0	-13.0	6.98	14	5
Amoxapine	<i>Antipsychotic</i>	314.10	-12.0	270.90	-25.0	-18.0	192.95	-44.0	-18.0	6.90	13	5
Amphetamine [*]	<i>Illicit drug</i>	136.10	-25.0	91.00	-22.0	-17.0	65.00	-36.0	-27.0	3.31	8	5
AEME	<i>Illicit drug metab.</i>	182.10	-12.0	91.05	-29.0	-20.0	122.10	-22.0	-12.0	2.96	15	5
Apixaban [*]	<i>Anticoagulant</i>	460.20	-16.0	443.05	-16.0	-30.0	199.00	-37.0	-20.0	8.54	15	5
Aripiprazole [*]	<i>Antipsychotic</i>	448.15	-16.0	285.00	-27.0	-13.0	146.00	-44.0	-14.0	8.76	15	5
Atenolol [*]	<i>Cardiovasc - renal</i>	267.15	-10.0	145.00	-26.0	-14.0	190.05	-19.0	-19.0	2.96	14	5
Atropine	<i>Cardiovasc - renal</i>	290.20	-11.0	93.00	-25.0	-16.0	124.05	-15.0	-21.0	3.92	15	5
Baclofen	<i>Muscle relaxant</i>	214.05	-14.0	115.00	-45.0	-20.0	116.00	-32.0	-11.0	3.20	12	50
BDB	<i>Illicit drug</i>	194.10	-13.0	135.00	-20.0	-13.0	77.00	-39.0	-13.0	3.98	8	5
Bendroflumethiazide	<i>Cardiovasc - renal</i>	420.05	15.0	288.90	24.0	12.0	196.95	48.0	11.0	5.94	15	50
Benzoyllecgonine [*]	<i>Illicit drug metab.</i>	290.15	-11.0	168.05	-20.0	-16.0	77.00	-58.0	-13.0	4.5	15	5
Betaxolol	<i>Cardiovasc - renal</i>	308.20	-11.0	116.05	-21.0	-19.0	72.05	-22.0	-12.0	5.81	15	5
Bisoprolol	<i>Cardiovasc - renal</i>	326.25	-12.0	116.05	-12.0	-11.0	74.05	-27.0	-12.0	5.29	14	5
Bromazepam	<i>Bzd</i>	316.00	-12.0	182.05	-31.0	-11.0	209.00	-28.0	-21.0	7.02	15	5
Bumetamide	<i>Cardiovasc - renal</i>	365.10	-26.0	240.10	-18.0	-25.0	184.05	-24.0	-18.0	7.00	14	50
Buprenorphine [*]	<i>Illicit drug</i>	468.30	-16.0	54.95	-52.0	-20.0	414.10	-36.0	-28.0	7.40	15	5
Bupropion	<i>Illicit drug</i>	468.30	-16.0	54.95	-52.0	-20.0	396.00	-41.0	-26.0	4.93	15	5
Cannabidiol	<i>Illicit drug</i>	315.25	-20.0	193.10	-23.0	-20.0	123.10	-35.0	-20.0	9.45	2	5
Cannabinol	<i>Illicit drug</i>	223.00	-11.0	223.00	-21.0	-22.0	293.10	-17.0	-19.0	10.00	15	5
Canrenone	<i>Cardiovasc - renal</i>	341.20	-12.0	107.05	-16.0	-18.0	187.0	-10.0	-19.0	10.42	15	50
Carbutamide	<i>Cardiovasc - renal</i>	272.10	-10.0	74.05	-6.0	-12.0	155.95	-6.0	-27.0	4.78	9	1000
Carpipramide	<i>Cardiovasc - renal</i>	447.30	-10.0	98.00	-40.0	-20.0	141.00	-24.0	-13.0	8.50	7	5
Carteolol	<i>Cardiovasc - renal</i>	293.20	-20.0	237.00	-15.0	-20.0	202.00	-21.0	-20.0	3.56	14	5
Carvedilol	<i>Cardiovasc - renal</i>	407.20	-14.0	100.00	-29.0	-10.0	224.00	-23.0	-22.0	7.18	15	5
Celiprolol	<i>Cardiovasc - renal</i>	380.25	-20.0	251.05	-25.0	-20.0	74.05	-30.0	-20.0	4.74	15	5
Cetirizine	<i>Antipsychotic</i>	389.15	-27.0	165.05	-42.0	-16.0	201.00	-10.0	-21.0	7.81	3	5
Chlordiazepoxide	<i>Bzd</i>	300.10	-11.0	226.90	-24.0	-23.0	281.90	-24.0	-18.0	7.92	15	5
Chlorophacinone	<i>Anticoagulant</i>	373.05	18.0	201.05	22.0	21.0	145.05	24.0	13.0	7.55	5	5
Chlorpromazine	<i>Bzd</i>	319.10	-12.0	58.00	-25.0	-24.0	86.00	-12.0	-16.0	7.62	8	5
Chlortalidone	<i>Cardiovasc - renal</i>	356.05	-13.0	321.90	-16.0	-22.0	150.00	-62.0	-25.0	4.70	15	50
Citalopram [*]	<i>Antidepressant</i>	325.15	-22.0	262.10	-20.0	-28.0	109.05	-15.0	-21.0	5.84	14	5

Downloaded from https://academic.oup.com/aj/article-abstract/doi/10.1093/aj/bkaa075/5863921 by University of New England user on 04 July 2020

Clobazam	Bzd	301.05	-11.0	258.90	-14.0	-17.0	223.95	-33.0	-14.0	8.05	15	5
Clomipramine	Antidepressant	315.15	-11.0	315.15	-30.0	-16.0	86.00	-9.0	-14.0	7.69	8	5
Clonazepam	Bzd	316.05	-22.0	269.90	-25.0	-17.0	213.90	-38.0	-22.0	7.44	14	5
Clonazepam	Cardiovasc - renal	346.10	-20.0	249.95	-21.0	-20.0	98.10	-33.0	-17.0	5.30	5	50
Clotiazepam	Bzd	319.05	-12.0	154.00	-29.0	-16.0	218.00	-26.0	-21.0	9.47	15	5
Clozapine	Antipsychotic	327.15	-12.0	269.95	-13.0	-18.0	165.00	-63.0	-16.0	6.11	8	5
Cocaethylene	Illicit drug metab.	318.15	-12.0	81.95	-32.0	-14.0	76.95	-60.0	-30.0	5.49	15	5
Cocaine	Illicit drug	304.15	-11.0	76.95	-60.0	-29.0	182.00	-10.0	-20.0	4.94	15	5
Codeine	Opiate	300.15	-11.0	151.95	-62.0	-28.0	165.00	-42.0	-16.0	3.56	15	5
Colchicine	Anti-inflammatory	400.20	-14.0	358.05	-23.0	-16.0	310.0	-28.0	-21.0	6.88	15	1
Cyamemazine	Antipsychotic	324.15	-12.0	57.95	-18.0	-23.0	100.05	-6.0	-17.0	7.21	8	5
Desalkylflurazepam	Bzd metab.	289.05	-20.0	139.95	-28.0	-13.0	226.00	-28.0	-22.0	7.60	12	5
Desipramine	Antidepressant	267.20	-10.0	72.05	-10.0	-13.0	44.00	-31.0	-16.0	6.82	14	5
Desmethylclonazepam	Antidep. metab.	311.15	-11.0	261.95	-17.0	-28.0	108.95	-15.0	-11.0	5.80	15	5
Desmethylclomipramine	Antidep. metab.	301.15	-11.0	72.05	-10.0	-12.0	44.00	-48.0	-16.0	7.53	14	5
Desmethylflunitrazepam	Bzd metab.	300.10	-20.0	253.90	-25.0	-25.0	197.90	-39.0	-20.0	7.12	13	5
Desmethylmianserin	Antidep. metab.	251.15	-13.0	208.05	-20.0	-13.0	118.05	-29.0	-21.0	6.17	15	5
Desmethylmirtazapine	Antidep. metab.	252.15	-16.0	209.00	-25.0	-20.0	194.00	-39.0	-18.0	5.38	15	5
Desmethylsertraline	Antidep. metab.	292.05	-21.0	158.90	-28.0	-29.0	122.95	-53.0	-12.0	7.59	14	5
Desmethylvenlafaxine	Antidep. metab.	264.20	-10.0	57.95	-22.0	-21.0	246.05	-13.0	-27.0	3.88	10	5
Dextrometorphan	Opiate	272.20	-10.0	127.95	-63.0	-20.0	213.05	-28.0	-21.0	6.45	15	5
Diacetolol	Cardiovasc - renal	309.20	-11.0	116.05	-21.0	-26.0	55.95	-32.0	-20.0	3.36	15	5
Diazepam	Bzd	285.10	-10.0	193.00	-33.0	-20.0	153.95	-27.0	-15.0	9.04	15	5
Dihydrocodeine	Opiate metab.	302.20	-11.0	198.95	-33.0	-19.0	127.95	-64.0	-23.0	3.51	15	5
Diltiazem	Cardiovasc - renal	415.15	-15.0	177.95	-5.0	-20.0	311.95	-20.0	-14.0	7.46	7	5
Difenacoum	Anticoagulant	445.20	-10.0	178.95	-32.0	-19.0	256.95	-21.0	-17.0	9.72	15	50
Dosulepine	Antidepressant	296.15	-11.0	201.95	-57.0	-20.0	272.90	-24.0	-14.0	6.77	15	5
Doxepin	Antidepressant	280.15	-10.0	107.00	-23.0	-10.0	165.00	-55.0	-16.0	6.17	15	5
Droperidol	Antipsychotic	380.20	-27.0	123.00	-35.0	-21.0	165.05	-17.0	-16.0	6.35	4	5
Duloxetine	Antidepressant	298.15	-22.0	44.05	-14.0	-16.0	154.00	-9.0	-16.0	6.94	14	5
Ecgonine methyl ester	Illicit drug metab.	200.15	-12.0	182.05	-18.0	-18.0	82.05	-26.0	-13.0	0.97	15	5
EDDP	Illicit drug metab.	278.20	-10.0	219.00	-42.0	-23.0	186.05	-35.0	-18.0	6.96	15	5
Ephedrine	Illicit drug	166.10	-11.0	166.10	-14.0	-14.0	115.00	-27.0	-19.0	3.12	14	5
Esmolol	Cardiovasc - renal	296.20	-11.0	145.00	-25.0	-14.0	219.00	-20.0	-22.0	4.80	15	5
Estazolam	Bzd	295.05	-11.0	204.95	-40.0	-20.0	266.95	-24.0	-12.0	8.22	15	5
Ethyl loflazepate	Bzd	361.05	-13.0	361.05	-31.0	-17.0	286.95	-20.0	-13.0	8.46	14	5
Ethylmorphine	Opiate metab.	314.20	-12.0	165.00	-42.0	-16.0	152.00	-65.0	-14.0	4.04	15	5
Felbamate	Antiepileptic	239.10	-15.0	117.00	-8.0	-26.0	178.00	-5.0	-30.0	4.44	6	1000
Flecainide	Cardiovasc - renal	415.15	-15.0	208.95	-48.0	-21.0	232.00	-40.0	-15.0	5.37	15	50
Fluanisone	Antipsychotic	357.20	-16.0	123.00	-18.0	-20.0	95.10	-35.0	-21.0	6.79	4	5
Fluindione	Anticoagulant	241.05	-29.0	213.00	-18.0	-22.0	185.00	-25.0	-25.0	5.70	3	50
Flunitrazepam	Bzd	314.10	-11.0	267.95	-27.0	-17.0	239.00	-35.0	-24.0	8.18	14	5
Fluoxetine	Antidepressant	310.15	-21.0	44.10	-13.0	-17.0	148.10	-9.0	-15.0	6.24	2	5
Flupenthixol	Antipsychotic	435.15	-30.0	304.90	-30.0	-14.0	264.85	-40.0	-17.0	8.46	15	5
Fluphenazine	Antipsychotic	438.20	-30.0	100.10	-45.0	-10.0	248.00	-54.0	-25.0	8.13	15	5
Flurazepam	Bzd	388.15	-14.0	314.90	-13.0	-21.0	316.95	-20.0	-15.0	6.52	15	5
Fluvoxamine	Antidepressant	319.15	-23.0	71.00	-17.0	-11.0	41.05	-42.0	-18.0	6.14	15	5
Furosemide	Cardiovasc - renal	329.00	22.0	284.90	14.0	12.0	204.95	22.0	22.0	5.22	5	50
Glibenclamide	Antidiabetic	494.15	-18.0	368.90	-17.0	-17.0	168.90	-36.0	-17.0	9.13	11	5
Glibomunde	Antidiabetic	367.15	-24.0	170.15	-17.0	-30.0	152.05	-20.0	-30.0	8.03	13	50
Gliclazide	Antidiabetic	324.15	-24.0	127.05	-20.0	-12.0	110.05	-21.0	-20.0	7.99	15	50
Glimepiride	Antidiabetic	491.25	-18.0	325.00	-15.0	-12.0	125.90	-25.0	-21.0	9.66	10	50
Glipizide	Antidiabetic	446.20	-10.0	320.95	-15.0	-21.0	102.95	-44.0	-18.0	7.95	15	5
Haloperidol [*]	Antipsychotic	376.15	-22.0	123.00	-25.0	-23.0	95.05	-50.0	-17.0	6.06	4	5
Hydrochlorothiazide	Cardiovasc - renal	295.95	15.0	268.85	19.0	26.0	205.00	22.0	13.0	3.10	9	50
Hydrocodone	Opiate	300.15	-11.0	198.95	-31.0	-20.0	127.90	-59.0	-22.0	3.80	15	5
Hydromorphone	Opiate	286.15	-10.0	128.00	-59.0	-23.0	157.00	-42.0	-15.0	3.11	15	5
Hydroxy alprazolam	Bzd metab.	325.10	-12.0	296.95	-27.0	-13.0	216.00	-38.0	-22.0	7.78	15	5
Hydroxy haloperidol	Antipsych. metab.	378.15	-20.0	360.15	-15.0	-20.0	109.05	-33.0	-22.0	5.48	4	5
Hydroxyzine	Antipsychotic	375.20	-26.0	165.05	-35.0	-21.0	166.10	-25.0	-23.0	7.10	3	5
Ibuprofen	Anti-inflammatory	205.10	22.0	161.20	6.0	16.0	/	/	/	7.86	1	1000
Imipramine	Antidepressant	281.20	-20.0	58.00	-24.0	-20.0	193.00	-35.0	-19.0	6.98	9	5
Indapamide	Cardiovasc - renal	366.05	-13.0	132.00	-15.0	-22.0	91.05	-41.0	-20.0	6.11	9	50
Ketamine [*]	Illicit drug	238.10	-15.0	124.95	-17.0	-12.0	220.00	-15.0	-23.0	4.80	15	5
Labetalol	Cardiovasc - renal	329.20	-20.0	311.05	-15.0	-20.0	91.00	-40.0	-20.0	5.08	15	5
Lacosamide	Antiepileptic	251.15	-17.0	108.05	-2.0	-20.0	116.05	-8.0	-20.0	4.45	12	50
Lamotrigine	Antiepileptic	256.00	-17.0	158.90	-15.0	-30.0	165.95	-13.0	-30.0	4.34	15	1000
Levetiracetam	Antiepileptic	171.10	-30.0	69.05	-28.0	-12.0	126.10	-8.0	-20.0	3.27	10	1000
Levobunolol	Cardiovasc - renal	292.20	-11.0	236.05	-10.0	-25.0	201.00	-21.0	-20.0	4.61	15	5
Levomopromazine	Antipsychotic	329.15	-12.0	100.10	-21.0	-10.0	167.00	-44.0	-16.0	7.50	9	5
Lidocaine [*]	Anesthetic	235.20	-20.0	86.05	-6.0	-20.0	30.10	-51.0	-30.0	3.85	5	50
Loprazolam	Bzd	465.15	-11.0	111.05	-26.0	-11.0	408.05	-28.0	-19.0	9.12	15	5

Downloaded from https://academic.oup.com/ajph/article-abstract/doi/10.1093/ajph/a75/5863921 by University of New England user on 04 July 2020

Lorazepam	Bzd	321.00	-12.0	274.85	-22.0	-17.0	302.85	-14.0	-14.0	7.25	13	5
Lormetazepam	Bzd	335.05	-12.0	288.90	-23.0	-13.0	176.95	-41.0	-18.0	8.20	15	5
Loxapine	Antipsychotic	328.10	-12.0	164.00	-60.0	-16.0	227.90	-34.0	-24.0	7.75	11	5
Maprotiline	Antidepressant	278.20	-10.0	250.05	-20.0	-16.0	191.00	-36.0	-19.0	6.91	15	5
MBDB	Illicit drug	208.15	-14.0	134.95	-5.0	-20.0	50.95	-60.0	-19.0	4.23	9	5
MC-Tianeptine	Antidep. metab.	409.10	-15.0	291.85	-12.0	-19.0	227.85	-35.0	-23.0	7.08	15	5
m-CPP	Illicit drug	197.10	-12.0	118.10	-34.0	-11.0	154.00	-20.0	-15.0	4.38	15	5
MDA	Illicit drug	180.10	-13.0	77.00	-38.0	-30.0	105.05	-21.0	-22.0	3.57	15	5
MDEA	Illicit drug	208.15	-12.0	105.00	-25.0	-10.0	163.00	-13.0	-15.0	4.06	11	5
MDMA	Illicit drug	250.20	-13.0	105.05	-25.0	-18.0	77.00	-45.0	-28.0	3.77	12	5
Medifoxamine	Antidepressant	258.15	-10.0	164.00	-11.0	-16.0	71.00	-23.0	-29.0	5.90	10	5
Mephedrone	Illicit drug	178.10	-12.0	145.05	-20.0	-14.0	144.05	-30.0	-26.0	4.00	15	5
Metformin [*]	Antidiabetic	130.10	-10.0	71.00	-22.0	-13.0	60.00	-14.0	-23.0	0.89	15	50
Methadone	Illicit drug	310.20	-11.0	265.00	-9.0	-21.0	105.00	-13.0	-18.0	7.60	14	5
Methamphetamine	Illicit drug	150.15	-10.0	91.00	-22.0	-20.0	65.00	-42.0	-24.0	3.54	8	5
Methaqualone	Illicit drug	251.10	-16.0	91.05	-38.0	-16.0	132.00	-28.0	-13.0	7.74	16	5
Methcathinone	Illicit drug	164.10	-30.0	131.05	-21.0	-23.0	130.05	-30.0	-23.0	3.31	13	5
Methiopropamine	Illicit drug	156.10	-10.0	97.00	-23.0	-10.0	58.00	-12.0	-23.0	3.27	15	5
Methoxetamine	Illicit drug	248.15	-17.0	121.00	-20.0	-22.0	175.05	-20.0	-17.0	5.11	15	5
Methylphenidate	Illicit drug	234.15	-20.0	84.00	-7.0	-20.0	56.00	-27.0	-22.0	4.71	7	5
Metoprolol	Cardiovasc - renal	310.20	-11.0	190.95	-24.0	-20.0	116.00	-21.0	-30.0	5.29	14	5
Metoprolol	Cardiovasc - renal	268.20	-10.0	116.05	-20.0	-11.0	74.00	-23.0	-12	4.36	15	5
Mianserin	Antidepressant	265.15	-10.0	208.00	-20.0	-22.0	57.95	-25.0	-20.0	6.66	14	5
Midazolam	Bzd	326.10	-12.0	221.95	-50.0	-22.0	243.90	-26.0	-26.0	8.76	14	5
Mirtazapine	Antidepressant	325.15	-22.0	262.10	-20.0	-28.0	234.10	-28.0	-15.0	5.84	14	5
Moclobemide	Antidepressant	269.10	-18.0	139.00	-21.0	-25.0	111.00	-35.0	-11	4.19	4	5
Morphine [*]	Opiate	286.15	-10.0	152.00	-60.0	-15.0	165.05	-41.0	-30.0	2.92	15	5
Nadolol	Cardiovasc - renal	310.20	-11.0	254.00	-17.0	-16.0	200.95	-23.0	-19.0	3.62	5	5
Nadoxolol	Cardiovasc - renal	261.10	-18.0	117.05	16.0	-12.0	99.05	-22.0	-17.0	5.40	12	5
Naloxone	Opiate	328.15	-12.0	310.00	-21.0	-21.0	268.00	-27.0	-29.0	3.64	14	5
Naltrexone	Opiate	342.15	-12.0	324.05	-22.0	-15.0	270.05	-28.0	-28.0	3.76	14	5
N-Desmethyloclobazam	Bzd metab.	287.05	-11.0	244.90	-20.0	-11.0	210.00	-31.0	-13.0	7.20	13	5
Nebivolol	Cardiovasc - renal	406.20	-15.0	150.95	-31.0	-14.0	102.95	-55.0	-10	7.04	15	5
Nitrazepam	Bzd	282.10	-10.0	236.00	-25.0	-15.0	180.00	-37.0	-18.0	7.46	4	5
Norbuprenorphine	Opiate metab.	414.25	-15.0	101.0	40.0	-10.0	83.05	-50.0	-14.0	5.34	15	5
Norclozapine	Antipsych. metab.	313.10	-11.0	165.05	-50.0	-16.0	252.95	-21.0	-17.0	5.77	11	5
Nordiazepam [*]	Bzd	271.05	-18.0	140.05	-27.0	-24.0	208.10	-27.0	-21.0	8.11	14	5
Norephedrine	Illicit drug	152.10	-10.0	115.05	-25.0	-11.0	91.00	-31.0	-15.0	2.7	11	5
Norfenfluramine	Illicit drug	204.10	-14.0	109.05	-40.0	-18.0	159.00	-20.0	-15.0	4.08	15	5
Norfluoxetine	Antidep. metab.	296.15	-19.0	134.15	-8.0	-20.0	30.15	-12.0	-30.0	6.22	2	5
Norketamine	Illicit drug metab.	224.10	-15.0	124.95	-23.0	-12.0	207.00	-11.0	-20.0	4.62	15	5
Noroxycodone	Opiate metab.	302.15	-11.0	227.00	-29.0	-23.0	283.95	-17.0	-13.0	3.50	15	5
Norpseudoephedrine	Illicit drug	152.10	-10.0	115.05	-25.0	-11.0	91.00	-31.0	-15.0	2.8	11	5
Nortriptyline	Antidepressant	264.15	-10.0	233.00	-14.0	-15.0	91.00	-22.0	-15.0	7.05	15	5
o-Desmethylntramadol	Analgesic	250.20	-17.0	58.10	-7.0	-24.0	42.10	-55.0	-18.0	3.56	4	5
Olanzapine	Antipsychotic	313.15	-11.0	197.95	-42.0	-19.0	256.00	-13.0	-28.0	5.21	15	5
Oxazepam	Bzd	287.05	-19.0	240.95	-23.0	-16.0	268.90	-14.0	-12.0	7.40	11	5
Oxprenolol	Cardiovasc - renal	266.20	-10.0	72.05	-22.0	-20.0	116.05	-18.0	-20.0	5.21	15	5
Oxycodone	Opiate	316.15	-12.0	298.00	-20.0	-20.0	240.95	-29.0	-24.0	3.70	14	5
Paracetamol	Analgesic	152.02	-10.0	110.05	-18.0	-11.0	65.00	-30.0	-11.0	2.64	11	50
Paroxetine	Antidepressant	330.15	-12.0	70.05	-29.0	-12.0	192.00	-21.0	-12.0	6.85	15	5
Penbutolol	Cardiovasc - renal	292.25	-17.0	236.05	-14.0	-24.0	74.00	-24.0	-12.0	7.05	15	5
Pentobarbital	Illicit drug	225.10	26.0	182.20	12.0	18.0	42.05	17.0	15.0	5.82	2	1000
Perampanel	Cardiovasc - renal	350.15	-13.0	104.05	-32.0	-19.0	247.05	-13.0	-25.0	9.42	15	50
Periciazine	Antipsychotic	366.15	-13.0	44.10	-49.0	-19.0	98.10	-24.0	-17.0	7.01	15	5
Perphenazine	Antipsychotic	404.15	-14.0	143.00	-29.0	-23.0	143.00	-24.0	-17.0	8.26	15	5
Pethidine	Opiate	248.15	-16.0	174.10	-20.0	-11.0	70.05	-29.0	-11.0	4.78	15	5
Phencyclidine	Illicit drug	244.20	-16.0	86.05	-8.0	-16.0	91.00	-28.0	-17.0	6.48	8	5
Phenobarbital [*]	Antiepileptic	231.10	25.0	42.05	15.0	16.0	188.15	10.0	19.0	5.02	3	1000
Pholcodine	Opiate	399.25	-14.0	114.05	-36.0	-11.0	114.05	-25.0	-18.0	3.13	5	5
Pimozide	Antipsychotic	462.25	-10.0	109.00	-56.0	-10.0	146.95	-40.0	-14.0	7.75	15	5
Pindolol	Cardiovasc - renal	249.15	-16.0	116.05	-18.0	-20.0	172.05	-17.0	-17.0	3.62	15	5
Pipamperone	Antipsychotic	376.25	-13.0	123.00	-35.0	-12.0	95.00	-65.0	-18.0	5.71	9	5
Pipotiazine	Antipsychotic	476.20	-17.0	142.00	-27.0	-25.0	170.05	-30	-22.0	7.51	15	5
Pramipexole	Antipsychotic	212.10	-14.0	153.05	-12.0	-27.0	111.00	-26.0	-19.0	2.50	15	5
Pregabalin	Antiepileptic	160.15	-11.0	55.00	-23.0	-22.0	142.10	-16.0	-28.0	2.98	15	1000
Prochlorperazine	Antipsychotic	374.15	-13.0	113.00	-20.0	-11.0	141.15	-8.0	-14.0	8.60	10	5
Promethazine	Antipsychotic	285.15	-10.0	86.05	-14.0	-15.0	197.95	-24.0	-20.0	6.81	15	5
Propranolol	Cardiovasc - renal	260.15	-18.0	98.00	-18.0	-10.0	127.00	-44.0	-24.0	5.56	15	5
Pseudoephedrine	Illicit drug	166.10	-11.0	166.10	-14.0	-14.0	115.00	-27.0	-19.0	3.21	14	5
Quetiapine	Antipsychotic	384.15	-14.0	209.90	-39.0	-21.0	247.05	-41.0	-25.0	7.37	13	5
Repaglimide	Antidiabetic	453.30	-11.0	230.20	-18.0	-20.0	162.15	-24.0	-16.0	9.52	15	5

Downloaded from https://academic.oup.com/ia/article-abstract/doi/10.1093/ia/ikaa075/5863921 by University of New England user on 04 July 2020

Retigabine	Antiepileptic	304.15	-21.0	258.05	-5.0	-17.0	230.10	-2.0	-23.0	6.87	5	1000
Risperidone	Antipsychotic	411.20	-22.0	191.00	-10.0	-21.0	110.00	-15.0	-11.0	6.39	5	5
Ritalinic acid	Illicit drug	220.15	-14.0	84.10	-22.0	-14.0	56.05	-44.0	-22.0	4.04	10	5
Rivaroxaban	Anticoagulant	436.05	-20.0	231.05	-21.0	-24.0	318.15	-20.0	-20.0	7.23	12	5
Rufinamide	Antiepileptic	239.05	-17.0	221.90	-5.0	-23.0	77.00	-50.0	-14.0	4.94	13	1000
Salicylic acid [*]	Antipyretic	137.00	29.0	93.05	17.0	12.0	65.10	27.0	23.0	2.92	5	1000
Scopolamine	Illicit drug	304.15	-11.0	138.00	-24.0	-13.0	156.00	-16.0	-15.0	3.52	15	5
Sertraline	Antidepressant	306.10	-11.0	158.90	-27.0	-15.0	274.85	-13.0	-27.0	7.60	10	5
Sotalol	Cardiovasc - renal	273.15	-10.0	255.00	-13.0	-16.0	133.00	-27.0	-23.0	2.80	15	5
Spironolactone	Cardiovasc - renal	341.30	-13.0	107.10	-30.0	-20.0	187.10	-21.0	-18.0	6.39	15	50
Sulforidazine	Antipsychotic	403.15	-28.0	98.00	-32.0	-21.0	126.05	-25.0	-20.0	8.11	10	5
Sulpiride	Antipsychotic	342.15	-12.0	112.05	-20.0	-20.0	213.90	-34.0	-21.0	3.19	15	5
Sultopride	Antipsychotic	355.15	-13.0	133.95	-49.0	-24.0	226.90	-32.0	-22.0	3.91	13	5
Temazepam	Bzd	301.05	-11.0	254.90	-20.0	-16.0	282.95	-15.0	-18.0	8.38	12	5
Tertatolol	Cardiovasc - renal	296.15	-11.0	56.00	-27.0	-21.0	240.00	-10.0	-15.0	6.50	15	5
Tetrazepam	Bzd	289.10	-11.0	253.10	-24.0	-17.0	197.00	-31.0	-20.0	9.56	13	5
THC	Illicit drug	315.25	-22.0	193.05	-22.0	-19.0	123.00	-33.0	-12.0	10.18	15	5
THC-COOH [*]	Illicit drug metab.	345.20	-17.0	299.20	-20.0	-14.0	327.20	-17.0	-15.0	9.61	12	5
Thiopropazine	Antipsychotic	447.20	-16.0	141.00	-27.0	-14.0	113.05	-33.0	-19.0	8.25	13	5
Thioridazin	Antipsychotic	371.15	-26.0	58.00	-43.0	-22.0	371.15	-10.0	-30.0	8.88	13	5
Tiagabine	Antiepileptic	376.15	-14.0	246.95	-20.0	-16.0	111.00	-35.0	-49.0	7.77	15	5
Tianeptine	Antidepressant	437.15	-10.0	291.85	-10.0	-13.0	227.95	-37.0	-24.0	8.09	15	5
Tiapride	Antipsychotic	329.15	-12.0	255.95	-15.0	-20.0	212.90	-29.0	-22.0	3.50	15	5
Timolol	Cardiovasc - renal	317.15	-20.0	74.00	-25.0	-20.0	261.00	-15.0	-20.0	4.38	15	5
Topiramate	Antiepileptic	357.15	-17.0	184.15	-21.0	-18.0	264.05	-5.0	-29.0	5.36	15	250
Tramadol [*]	Analgesic	264.20	-19.0	58.05	-6.0	-20.0	42.10	-35.0	-18.0	4.46	2	5
Triamterene	Cardiovasc - renal	254.10	-17.0	194.95	-31.0	-19.0	168.00	-37.0	-17.0	4.52	15	50
Triazolam	Bzd	343.05	-12.0	308.00	-27.0	-14.0	314.95	-28.0	-21.0	8.24	15	5
Trimipramine	Antidepressant	295.20	-11.0	58.00	-17.0	-10.0	100.10	-9.0	-20.0	7.35	6	5
Tropatepine	Antipsychotic	334.15	-12.0	178.05	-45.0	-29.0	210.95	-27.0	-14.0	7.83	15	5
Venlafaxine	Antidepressant	278.20	-10.0	121.00	-58.0	-11.0	147.00	-25.0	-14.0	5.20	11	5
Verapamil [*]	Cardiovasc - renal	455.30	-16.0	150.00	-40.0	-15.0	165.00	-22.0	-20.0	6.92	15	5
Viloxazine	Antidepressant	238.15	-16.0	55.95	-25.0	-20.0	100.05	-18.0	-10.0	4.65	15	5
Warfarin [*]	Anticoagulant	309.10	-17.0	162.95	-16.0	-20.0	251.00	-20.0	-24.0	7.79	15	5
Xipamide	Cardiovasc - renal	353.05	24.0	122.05	23.0	21.0	274.00	6.0	17.0	6.01	15	50
Zolpidem	Bzd	308.20	-20.0	235.00	-20.0	-20.0	92.00	-53.0	-20.0	7.09	15	5
Zonisamide [*]	Antiepileptic	213.05	-15.0	50.95	-42.0	-22.0	104.00	-22.0	-22.0	4.22	10	1000
Zopiclone	Bzd	389.10	-14.0	244.90	-19.0	-16.0	216.85	-33.0	-22.0	5.89	9	5
Zuclopenthixol	Antipsychotic	401.15	-14.0	220.85	-51.0	-22.0	230.90	-39.0	-22.0	8.54	15	5
Internal standards												
Atenolol-d ₇		274.20	-10.0	145.05	-26.0	-14.0	190.05	-19.0	-19.0	2.96	2	
Benzoyllecgonine-d ₃		293.15	-11.0	171.05	-20.0	-17.0	77.00	-56.0	-13.0	4.5	2	
Clonazepam-d ₄		318.05	30.0	282.05	17.0	29.0	290.00	17.0	29.0	7.44	2	
Cocaine-d ₃		307.15	-22.0	185.15	-19.0	-20.0	85.25	-31.0	-15.0	4.94	2	
Diazepam-d ₅		290.10	-10.0	198.00	-33.0	-19.0	153.95	-27.0	-15.0	9.04	2	
Haloperidol-d ₄		380.15	-20.0	127.05	-40.0	-20.0	169.15	-25.0	-20.0	6.06	2	
Mianserin-d ₃		268.20	-10.0	208.00	-21.0	-13.0	61.05	-25.0	-10.0	6.66	2	
Morphine-d ₃		289.15	-10.0	151.95	-59.0	-15.0	201.00	-26.0	-13.0	2.92	2	
Phenobarbital-d ₅		236.10	17.0	41.90	22.0	11.0	193.10	9.0	11.0	5.02	2	
THC-COOH-d ₃		348.20	-17.0	330.25	-15.0	-15.0	302.15	-14.0	-15.0	9.60	2	
Topiramate-d ₁₂		369.20	-13.0	270.00	-17.0	-18.0	352.10	-11.0	-12.0	5.36	2	

[*]: molecule belonging to a reference mix of 23 standards systematically analyzed daily before any clinical sample.

† Abbreviations: RT: retention time; Numb. MRM: number of MRM followed transitions; LLOQ: lower limit of quantitation; 11-OH-THC: 11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol; 2-ABBP: 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine; 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic; 2,5-dimethoxy-4-bromophenethylamine; 2-CB; 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine; 2-CI; 3,4-methylenedioxypropylvalerone; 3,4-MDPV; 4-Methylthioamphetamine; 4-MTA; AEME: anhydroecgonine methyl ester; Bzd: benzodiazepine; benzodioxazolyl-butanamine; BDB; Cardiovasc - renal: drug affecting cardiovascular and/or renal function; EDDP: ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidene N-Methyl-1,3-Benzodioxolylbutanamine; MBDB; 3-Chlorophenylpiperazine; m-cpp; Methylenedioxyamphetamine; MDA; Methylenedioxyethylamphetamine; MDEA; Methylenedioxyethylamphetamine; MDMA; Metab.: metabolite; THC: delta9-tetrahydrocannabinol; Tetrahydrocannabinol-COOH: 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol.

Table II. Determination of the Plasma Concentrations of 23 Compounds in Plasma using Nine Different Calibration Curves Prepared Up to Four Weeks Previously

Molecule	LLOQ			Intermediate concentration		
	Mean accuracy (%)	SD	CV (%)	Mean accuracy (%)	SD	CV (%)
2,4-D*	83.00	10.12	12.19	116.79	8.15	6.98
Amiodarone	80.84	13.87	17.16	112.04	12.21	10.90
Amphetamine	118.42	10.78	9.10	111.93	9.00	8.04
Apixaban	92.73	13.59	14.65	100.81	14.79	14.67
Aripiprazole	105.15	19.17	18.23	105.72	5.37	5.08
Atenolol	112.47	12.88	11.45	112.52	6.51	5.78
Benzoyllecgonine	83.03	16.09	19.38	87.69	12.04	13.73
Buprenorphine	85.68	15.69	18.31	97.57	9.44	9.68
Citalopram	104.77	12.21	11.66	96.15	8.01	8.33
Haloperidol	110.68	10.30	9.31	106.47	10.70	10.05
Ketamine	87.39	11.92	13.64	97.07	10.14	10.45
Lidocaine	91.80	16.74	18.23	107.66	16.72	15.53
Metformine	92.38	11.69	12.65	96.57	9.48	9.82
Morphine	118.27	13.22	11.18	100.52	10.74	10.69
Nordiazepam	103.90	8.85	8.52	90.23	9.58	10.62
Phenobarbital	81.50	12.60	15.46	85.20	12.78	15.00
Salicylic acid	107.23	15.34	14.31	103.12	10.23	9.92
THC	99.43	14.71	14.79	95.92	3.86	4.03
THC-COOH	118.47	16.19	13.67	117.51	16.67	14.19
Tramadol	102.60	13.76	13.41	102.56	7.97	7.77
Verapamil	116.26	9.05	7.79	116.53	9.86	8.46
Warfarin	85.02	8.87	10.43	89.73	13.16	14.66
Zonisamide	83.00	10.12	12.19	116.79	8.15	6.98

* Abbreviations: LLOQ, lower limit of quantitation; SD, standard deviation; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; THC, delta9-tetrahydrocannabinol; THC-COOH: 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol.

3) Application à la quantification de l'uracile (U) et du dihydrouracile (UH₂) dans le plasma

L'objectif de ces travaux était de mettre au point une méthode de dosage de l'uracile et du dihydrouracile en utilisant le couple CLAM 2030 - LCMS 8060. Longtemps resté « anecdotique », le suivi thérapeutique pharmacologique des fluoropyrimidines au travers du dosage de l'uracile et de son métabolite est désormais fortement recommandé. En effet, en Décembre 2018, L'HAS (Haute Autorité de Santé) a recommandé le dépistage systématique de la déficience de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) avant l'instauration d'un traitement par fluoropyrimidines (43). Ainsi les besoins analytiques ont été totalement bouleversés et pour faire face à l'afflux des échantillons et maintenir des analyses rapides et fiables, nous avons développé une méthode entièrement automatisée pour caractériser la déficience de la DPD.

Les fluoropyrimidines sont d'importants agents anti-néoplastiques (44,45). En effet, le 5-fluorouracile (5-FU) et sa pro-drogue, la capécitabine, sont la pierre angulaire pour le traitement de nombreux cancers (colorectal, pancréatique, gastrique, ...) (46,47). Cependant, leur usage est souvent associé à un risque de toxicité. La plupart du temps, celle-ci est due à un déficit d'activité de l'enzyme impliquée dans leur catabolisme : la DPD. Jusqu'à 15% des patients peuvent avoir une déficience partielle et 0.1 à 0.5% une déficience complète.

Cette déficience peut être détectée soit par une approche génotypique (recherche des polymorphismes du gène DPYD), soit par une approche phénotypique qui consiste à mesurer, dans le plasma, la concentration en uracile (« uracilémie ») ou à calculer le rapport dihydrouracile/uracile (UH₂/U). Cette mesure peut être réalisée par LC-DAD ou LC-MS mais nécessite des préparations d'échantillon complexes basées sur de la précipitation de protéines, de la LLE (liquid-liquid extraction) ou de la SPE (solid phase extraction). Jusqu'à présent, seules des méthodes d'extraction avec de multiples étapes manuelles (centrifugation, filtration, évaporation, ...) ont été rapportées (48-54). Même si, elles sont associées à des résultats satisfaisants, elles sont à la fois longues et fastidieuses. Historiquement, elles ont été développées dans les laboratoires ayant le plus souvent des activités modérées.

Les récentes recommandations proposent des valeurs seuils de 16 ng/ml et de 150 ng/ml en l'uracilémie pour diagnostiquer respectivement un déficit partiel et un déficit complet. Cela implique que les méthodes analytiques soient les plus précises, les plus fiables et les plus robustes possible, en particulier autour de ces valeurs seuils qui sont concrètement et directement associées au diagnostic et à la prise en charge du patient.

Comme nous l'avons déjà discuté plus haut, l'automatisation est la meilleure solution pour réduire, ou au moins minimiser, les risques de variations et d'erreurs. Dans ce contexte, nous avons donc décidé de mettre au point une méthode impliquant le CLAM 2030. Le développement a été réalisé par Doriane Toinon (ingénieur d'application à Shimadzu Paris) et la méthode a été entièrement validée à Limoges selon les recommandations de la norme ISO 15189.

En ce qui concerne l'extraction, une fois à bord du CLAM, le tube primaire est conservé à +4°C. Pour l'analyse, le système prélève 20 µL qui subissent une déprotéinisation, puis une filtration et une dilution. L'ensemble de ces étapes entièrement automatisées dure 8 minutes. La séparation chromatographique s'effectue ensuite en 15 minutes, permettant un premier résultat en 23 minutes, puis un résultat toutes les 15 minutes.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, nous avons appliqué une méthode MRM classique avec 2 transitions par composé et 2 étalons internes.

A la valeur seuil de 16 ng/ml, l'imprécision et le CV étaient inférieurs à 5% ce qui réduit le risque d'un mauvais diagnostic de l'activité de la DPD. Cette procédure a été appliquée à 64 échantillons patients qui ont également été mesuré par la méthode utilisée en routine au CHU de Limoges (extraction liquide/liquide) (55). Parmi ces patients, dans 5 cas les 2 méthodes auraient proposé un diagnostic différent. Cependant, les différences n'étaient que de 1,8 à 5,6 ng/mL, uniquement pour des patients mesurés entre 14 et 18 ng/mL par la méthode de référence.

Cette méthode est applicable à la routine clinique. L'automatisation garantit de maintenir des performances stables au cours du temps et de diminuer le temps humain dédié à l'extraction.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication, présentée ci-dessous, dans le Journal of Chromatography B (2020).

Ils ont également fait l'objet :

- D'un poster au congrès de la MSACL 2019
- D'un article dans le Clinical Laboratory Magazine (2020)
- D'un article dans l'European Hospital Magazine (Décembre 2019)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

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

Automatic quantification of uracil and dihydrouracil in plasma

Tiphaine Robin^a, Franck Saint-Marcoux^{a,b,*}, Doriane Toinon^c, Naïma Tafzi^a, Pierre Marquet^{a,b}, Souleiman El Balkhi^{a,b}^a Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacovigilance, Limoges University Hospital, France^b INSERM UMR 1248, France^c Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

LC-MS/MS

Automated sample preparation

5-FU

U

UH₂

DPD deficiency

ABSTRACT

Fluoropyrimidines-based chemotherapies are the backbone in the treatment of many cancers. However, the use of 5-fluorouracil and its oral pre-prodrug, capecitabine, is associated with an important risk of toxicity. This toxicity is mainly due to a deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). This deficiency may be detected by using a phenotypic approach that consists in the measurement of uracilemia or the calculation of dihydrouracil (UH₂)/uracil (U) ratio. For uracilemia, a threshold value of 16 ng/ml has been proposed for partial deficiency, while a value of 150 ng/ml has been proposed for complete deficiency.

We have developed a rapid, accurate and fully-automated procedure for the quantification of U and UH₂ in plasma. Sample extraction was carried out by a programmable liquid handler directly coupled to a liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system. The method was validated according to the EMA guidelines and ISO 15189 requirements and was applied to real patient samples (n = 64).

The limit of quantification was 5 and 10 ng/ml for U and UH₂ respectively. Imprecision and inaccuracy were less than 15% for inter and intra-assay tests. Comparison with dedicated routine method showed excellent correlation.

An automated procedure perfectly fulfills the need of low inaccuracy and CVs at the threshold values (less than 5% at 16 ng/ml) and is highly suitable for the characterization of DPD deficiency.

Automatization should guaranty reliable and robust performances by minimizing the sources of variation such as volume inaccuracies, filtration or manual extraction related errors.

1. Introduction

Fluoropyrimidines-based chemotherapies remain important anti-neoplastic agents since first approval for testing in humans about 60 years ago [1,2]. Indeed, 5-fluorouracil and its oral pre-prodrug capecitabine are the backbone in the treatment of colorectal, pancreatic, gastric, breast, head and neck cancers [3,4]. However, the use of fluoropyrimidines is associated with an important risk of toxicity, including a painful skin condition known as hand-foot syndrome, diarrhea, mucosal ulceration and immune suppression [5–7]. As a result, this toxicity limits or delays the administration of optimal or successive courses, which impacts the clinical outcome of patients with cancer. The mechanisms of fluoropyrimidines-based chemotherapies toxicity and the different strategies to prevent this toxicity are of great importance and numerous works have been published [5–10]. The dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), a rate-limited enzyme, is responsible of 80% of the catabolism of fluoropyrimidines. Most of the

toxicities under fluoropyrimidines treatment can be explained by an inherited deficiency in DPD activity. Up to 15% of patients could exhibit a partial deficit exposing them to moderate or even severe adverse effects. However, in 0.1 to 0.5% of patient, the complete DPD deficiency could lead to lethal toxicity. This deficiency may be detected by using genotyping that detect the DPYD gene inactivating polymorphisms or by using a phenotyping by measuring uracilemia. The calculation of the dihydrouracil (UH₂)/uracil (U) ratio to determine the phenotypes has been also used but it has raised some controversies.

Currently, there is no clear European regulatory obligation for DPD deficiency screening in patients given a fluoropyrimidine-based chemotherapy. However, based on the levels of evidence from the literature, the Group of Clinical Pharmacology in Oncology (GPCO)-UNICANCER and the French Network of Pharmacogenetics (RNPGx) has recently established the following recommendations [5]: (i) to explore DPD deficiency before initiating any chemotherapy containing fluoropyrimidines-based chemotherapies by measuring plasma

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacovigilance, Limoges University Hospital, France.
E-mail address: franck.saint-marcoux@unilim.fr (F. Saint-Marcoux).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122038>

Received 6 January 2020; Received in revised form 14 February 2020; Accepted 18 February 2020

Available online 21 February 2020

1570-0232/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

U concentrations (possibly associated with UH_2/U ratio); (ii) to genotype DPYD by exploring different variants; (iii) to reduce the initial dose, when partial deficiency is diagnosed or to proscribe fluoropyrimidines-based chemotherapies when the deficiency is complete. For uracilemia, a threshold value of 16 ng/ml has been proposed for partial deficiency [11–13]. No consensus has been defined for the interpretation of UH_2/U ratio, due to a great interlaboratory variability in the measurements [13–16].

In the past years, many labs have developed methods with UV detection [17–26] and more recently some have reported the use of mass spectrometry (MS) detection [26–32]. All these methods were based on classical manual sample preparations with protein precipitation, solid-phase or liquid-liquid extractions. With regards to the rapidity needed to report results and the increase in the number of patients to be monitored, the time dedicated to sample extraction may be a limiting step and its automation will offer a great added value. To our knowledge, no such automated extraction procedure coupled to LC-MS has been proposed yet for the measurement of U and UH_2 . Most recent extraction procedures involving any automated step of sample preparation (for the measurements of drugs or toxic compounds) were extensively reviewed by Vogeser and Kirchoff [33], Zheng et al [34], Prabhu and Urban [35] or Wei [36]. Their main drawback is that they were not fully automated as the extracts needed at least to be transferred into the autosampler. In this context, we recently published a very high throughput method for the measurement of illicit drugs where extraction procedure was fully synchronized to LC-MS and where no human intervention was necessary after the primary tube was loaded on the system [37]. The main objective of this study was to develop a LC-MS method for the measurement of U and UH_2 in plasma with a fully-automated sample preparation.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents:

Dihydrouracil, dihydrouracil- $^{13}C^{15}N_2$, uracil and uracil- $^{13}C^{15}N_2$ were supplied by LGC Standards (Molsheim, France). These analytes were stable in stock solution for 6 months at $-20^\circ C$ [29]. Acetonitrile and isopropanol were purchased from Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, France). Bovin serum albumin was purchased from Sigma Aldrich (ref. A7030) (Saint-Quentin Fallavier, France). Formic acid and acetic acid were supplied from Fisher Chemical (Illkirch, France). Pure water was obtained using a Millipore Direct Q purification system (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

2.2. Sample preparation

Extraction was performed by an automated sample preparation system, the CLAM-2030 (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France), coupled to a LC-MS/MS system (see below). Briefly, once the primary (or secondary) tube was loaded onto the automated system, no further human intervention was required.

Blood samples were collected in heparinized tubes and plasma was separated within 1 h30 by centrifugation at $+4^\circ C$ and stored at $-20^\circ C$ according to the recommendations [6,38].

Once on board, 20 μL plasma (store at $+4^\circ C$) were automatically pipetted in a pre-conditioned tube containing a filter, to which reagents were then added, mixed and filtered. Precisely: 40 μL of acetonitrile/acid formic (1%) was added to a PTFE (polytetrafluoroethylene) filter vial (0.45 μm pore size) previously conditioned with 20 μL of isopropanol. Then, the 20 μL of plasma and 10 μL of isotopically labelled internal standards (at 1500 ng/ml: namely, 167 ng/ml in the tube) were added. The mixture was agitated for 120 s (1900 rpm) then filtered by application of vacuum pressure (-60 to -65 kPa) for 120 s into a collection vial. Finally, the extract was diluted with 550 μL of

water and 50 μL were injected in the LC-MS/MS system.

2.3. LC-MS/MS conditions:

The chromatographic system consisted of two Shimadzu LC-30 AD pumps (Nexera X2), a CTO 20AC oven and a SIL-30 AC-MP autosampler (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France). Chromatographic separation was performed using a Hypercarb 3 μm , 150 \times 2.1 mm column (ThermoFisher, Illkirch, France), and a gradient of (A) water containing 0.5% acetic acid, and (B) acetonitrile containing 0.5% acetic acid as mobile phase at a flow-rate of 250 $\mu L/min$, as follows: 0.00–3.00 min, 5% (B); 3.00–5.00 min, 5 to 25% (B); 5.00–9.1 min, 25% (B); 9.1–9.2 min, 25 to 100% (B); 9.2–10.5 min, 100% (B); 10.5–10.6, 100 to 5% (B); 10.6–15 min, 5% (B). Oven temperature was set at 25 $^\circ C$.

LC-MS/MS analysis was performed on an LCMS-8060 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) used in the positive electrospray ionization modes. The interface parameters and common settings were as follows: interface voltage: 1 kV; nebulizing gas flow: 3 L/min; heating gas flow: 14 L/min; drying gas flow: 10 L/min; interface temperature: 380 $^\circ C$; DL (desolvation line) temperature: 300 $^\circ C$; heat block temperature: 500 $^\circ C$; collision gas pressure 170 kPa.

All compounds were measured by scheduled-MRM (Multiple Reaction Monitoring) using 1 ms pause time and 30 ms dwell time.

2.4. Validation procedure:

The calibration range was 5 to 320 ng/mL for U concentration and 10 to 640 ng/mL for UH_2 . The calibration standards and the 3 quality controls (QC) prepared in BSA at 80 g/L were used: (i) QC1 13 and 23 ng/mL, (ii) QC2 16 and 32 ng/mL and (iii) QC3 150 and 300 ng/mL for U and UH_2 , respectively.

The laboratory of Pharmacology-toxicology of the Limoges University Hospital activities has been accredited following the International Standards Organization (ISO) 15189 standard (accreditation number: 8-2607). The methods validation protocol respects also the EMA guidelines and examines the following criteria:

- The lower limit of quantitation (LLOQ) was defined as the lowest concentration that could be measured with intra-assay and inter-assay imprecision (CV%), and inaccuracy (bias) all less than 20%.
- The intra-assay precision and accuracy (n = 6) and the inter-assay precision and accuracy (n = 6) were assessed by analysis of the 3 different QC. To assess the intra-assay precision and accuracy 6 replicates of each QC were analyzed in one day. To assess the inter-assay precision and accuracy, each QC were analyzed each day for 6 days. The CV% values and bias values had to be less than 20% at the LLOQ and less than 15% for the other levels.
- Calibration standards were prepared by adding appropriate working standard solutions to 100 μL of BSA prior to extraction in order to obtain the following 6 concentration levels for uracil: 5, 10, 15, 20, 80 or 320 ng/mL; and the following for dihydrouracil: 10, 20, 30, 40, 160 and 640 ng/mL. Calibration curves of the compounds-to-internal standard peak-area ratios of the quantification transition versus expected compound concentrations were constructed using a linear with 1/x weighting regression analysis.
- Recoveries were determined for the 3 QC by comparing analyte/internal standard peak area ratios for sample spiked either before or after the automated sample preparation.
- The carry-over effect was evaluated by analyzing the blank samples that were systematically analyzed after the injection of calibration standards at the upper limit of quantification (respectively 320 and 640 ng/mL for U and UH_2). According to EMA guidelines [39] carry-over should not be greater than 20% of the LLOQ for the 2 analytes and 5% of their internal standards.
- Matrix effects were evaluated using deuterated internal standards.

Table 1
Results of the validation study.

Compound	Associated IS	Recovery (%) (%RSD) (n = 3)			Intra-assay precision (%) (%RSD) (n = 6)			Inter-assay precision (%) (%RSD) (n = 6)			Matrix effect (%)
		QC 1	QC 2	QC 3	QC 1	QC 2	QC 3	QC 1	QC 2	QC 3	
Dihydrouracil	Dihydrouracil $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$	64.8 (7.7)	68.9 (6.7)	69.6 (4.2)	85.3 (7.7)	86.5 (5.7)	101.3 (8.8)	89.5 (3.0)	93.8 (2.8)	100.6 (4.8)	10.2 (4.9)
Uracil	Uracil $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$	76.5 (14.2)	72.0 (5.6)	78.8 (8.9)	104.6 (4.7)	96.6 (4.4)	98.4 (3.1)	100.8 (6.6)	97.1 (3.8)	98.3 (6.0)	10.5 (2.2)

RSD: relative standard deviation; QC: quality control.

Table 2
Optimised mass spectrometry parameters.

Compounds	Precursor ion		Product ion						Retention time (min)
	m/z	Q1 pre-bias (V)	Quantitation			Reference			
			m/z	Collision energy (V)	Q3 (V)	m/z	Collision energy (V)	Q3 (V)	
Dihydrouracil	114.9	-12.0	30.1	-18.0	-13.0	55.0	-23.0	-21.0	4.26
Dihydrouracile $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$	118.3	-10.0	55.0	-25.0	-20.0	76.1	-14.0	-12.0	4.28
Uracil	113.1	-14.0	70.1	-19.0	-27.0	96.0	-22.0	-17.0	8.71
Uracil $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$	116.2	-10.0	71.1	-19.0	-28.0	98.0	-20.0	-18.0	8.71

In fact, U and UH₂ are endogenous compounds. Six different human plasma and 6 different water samples were extracted and secondary spiked with internal standards at 100 ng/ml. Potential ion suppression or enhancement was evaluated by comparing the average peak intensity obtained in the two different conditions. The difference had to be less than 15%.

- Selectivity examination is not applicable for U and UH₂ since the analytes are naturally present in human plasma at concentrations of approximately 10 ng/ml and 100 ng/ml, respectively. However, we examined the selectivity of IS by evaluating the interference in 6 different blank plasmas. Selectivity of IS was proven by the absence of any peaks at the same retention time.

- The stability of U and UH₂ were studied by others [25–31]. According to Jacobs et al [31] the U and UH₂ are stable in whole blood for 4 h at +4 °C at maximum. Noteworthy, 13% increases in the U concentration after 4 h has been observed. Both U and UH₂ were stable in plasma at -20 °C after long term storage. This is why all samples have to be centrifuged within 1 h30 and stored at -20 °C.

2.5. Application of the whole procedure to real patient samples:

The automated sample preparation and LC-MS/MS analysis procedure was tested using 64 patient samples by comparing its quantitative results to those of a pre-existing and validated quantitative LC-MS/MS method routinely used in our lab and considered as a reference here after. Briefly, this method was based on a liquid-liquid extraction of 500 µL of plasma with ethyl acetate/2-propanol preceded by a protein precipitation with ammonium sulfate. The chromatographic separation was performed using a XSelect[®]CSH[™] C18, 2.5 µm (100 × 2.1 I.D.) column and mass detection and quantification were performed on an AB-Sciex QTRAP[®]4500MD triple quadrupole mass spectrometer (Sciex, Villebon sur Yvette) operated in the positive electrospray ionization (ESI+) with selected reaction monitoring mode.

3. Results and discussion

As DPD deficiency screening in patients receiving a fluoropyrimidine-based chemotherapy is an obligation in France and highly recommended in other countries, most labs in charge of the measurement of U (and UH₂) will or are already facing a great increase of this

activity. We propose here a fully-automated solution able to ensure an accurate and robust measurement without requiring precious manpower and allowing high throughput by running samples continuously when necessary. The method was validated according to EMA guidelines. A summary of the results of validation and the MRM conditions are reported in Tables 1 and in 2.

• Selectivity

Among validation criteria, the specificity examination is challenging since U and UH₂ are both endogenous compounds in human plasma and that most determination methods use BSA to build matrix matched calibrations. We examined the selectivity of the IS by evaluating interferences in 6 different plasma. No significant signal (less than 5%) were observed at the RT of the IS.

An elegant approach has been proposed by Jacobs et al [31] where control human plasma was spiked with U- $^{15}\text{N}_2$ and UH₂- $^{13}\text{C}_4$ - $^{15}\text{N}_2$ and quantified using U and UH₂ as internal standards for examination of the selectivity, the recovery and the matrix effects. However, for selectivity, only the selectivity of the IS was examined but any interference from possible co-administered medications could not be verified. As patients receiving fluoropyrimidines-based chemotherapies are generally poly-medicated, this verification is necessary, though. Therefore, we examined, in our in-house built library, a list of 900 drugs and metabolites of interest to identify a potential interfering compound. None of these drugs presented a mass of 114.0 or 112.0. Collision induced dissociation ions, produced in the ESI source, with these m/z could be another source of interference. But it is still unlikely that such a compound would have the same retention time and transitions as U and HU₂. In addition, the use of a column allowing a significant retention of very polar molecules, such Hypercarb, contributes to improve the selectivity of the method. Table 3 resumes the published methods assessing U and UH₂.

• Linearity and limits of quantification:

Correlation coefficients values were greater than 0.99 for each standard calibration curves in the concentration range from 5 to 320 ng/ml for U and from 10 to 640 ng/ml for UH₂. The LLOQs were 5 ng/ml for U and 10 ng/ml for UH₂. All LLOQs were below the physiological concentrations and were quantifiable with an accuracy and a

Table 3
State of the art for methods assaying U and UH₂ by LC-MS/MS or LC-UV.

Compound	Matrix	ISTD	Sample preparation	Extraction	Column	LC run (min)	Mobile phase	Detection mode	Limit of quantification (ng/ml)	Reference
U, UH ₂ , SFU, SFUH ₂ , FUPA, Fβala	Plasma 50 µL	U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂ UH ₂ - ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂ SFU- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂ FUH ₂ - ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂ FUPA- ¹³ C ₃ Fβala- ¹³ C ₃	Prot. prec.: 100 µL ZnSO ₄ 1 M Methanol 50 µL Acetic acid 0.25 M 400 µL 15% Isopropanol/85% Ethyl acetate	L/L: (*2): 600 µL 95% Acetonitrile/5% Methanol 400 µL 15% Isopropanol/85% Ethyl acetate Dryness, recovery and centrifugation	Luna-PPP	8	0.25% Acetic acid/0.05% Formic acid/99.7% Water Acetonitrile	LC-MS/MS ESI+	U = 5 UH ₂ = 10 SFU = 50 FUH ₂ = 50 FUPA = 50 Fβala = 50	32
U, UH ₂	Plasma 300 µL	U- ¹⁵ N ₂ UH ₂ - ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂	Prot. prec.: 900 µL 50% Acetonitrile/50% Methanol	Dryness, recovery and centrifugation	Acquity UHPLC HSS T3	5	0.1% Formic acid Acetonitrile/0.1% Formic acid	LC-MS/MS ESI: U: - UH ₂ : +	U = 1 UH ₂ = 10	31
U, UPA, βala	Plasma 300 µL	U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂ UPA βala	Dilution: 4 times Prot. prec.: 1.8 mL Ethanol	Centrifugation and ultrafiltration	Synergi Hydro-RP	18	50 mM Ammonium acetate (pH 2.8)/10% Methanol 50 mM ammonium acetate (pH 2.8)/30% Methanol	LC-MS/MS ESI +	U = 73 UPA = 616 βala = 1157	30
U, UH ₂ , SFU, SFUH ₂	Plasma 200 µL	U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂ UH ₂ - ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂ SFU- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₂	Prot. prec.: 200 µL H ₂ SO ₄ /NH ₃	L/L: (*2): 10% Isopropanol/90% Ethyl acetate	C18 Atlantis	10	1 mM Ammonium acetate/0.5 mM formic acid/3.3% Methanol	LC-MS/MS ESI +	U = 4.1 UH ₂ = 12.1 SFU = 13	29
U, UH ₂	Plasma 500 µL	U-CI	Prot. prec.: 50 µL phosphoric acid	L/L: 40% Ethyl acetate/60% Dichloromethane/30% Methyl-tert-butyl-ether	C18X-Terra	5	Methanol/0.1% Sodium hydroxide (1385)	LC-MS/MS ESI-	U = 5 UH ₂ = 10	28
U, UH ₂	Plasma 500 µL	U-Br	Prot. prec.: 300 mg H ₂ SO ₄ /NH ₃	L/L: 15% Isopropanol/85% Ethyl acetate and derivatization	Acquity UPLC BEH	4.5	0.5% Acetic acid 99.5% Acetonitrile/0.5% acetic acid	LC-MS/MS ESI +	U = 0.625 UH ₂ = 0.625	27
U, UH ₂	Plasma 500 µL	SFC 5B-C	Prot. prec.: 500 µL KH ₂ PO ₄ 10 mM	SFE: Atoll Xtrem 500 µL Methanol for elution, dryness, 200 µL mobile phase A	C18 Atlantis	12	Water/0.1% Acetic acid Acetonitrile	LC-MS/MS ESI + LC-UV	U = 4.1 UH ₂ = 12.1	26
U, UH ₂	Plasma 200 µL	U-Br	Prot. prec.: 150 mg (NH ₄) ₂ SO ₄ Isopropanol.	L/L: 5 mL 85% Ethyl acetate/15% Isopropanol.	Discovery Amide C16		3% Methanol	LC-MS/MS ESI -	U = 0.5 UH ₂ = 5	25
U, UH ₂	Plasma 500 µL	SFU	Prot. prec.: 600 mg (NH ₄) ₂ SO ₄	Centrifugation, dryness, 120 µL water, filtration.	Hypercarb	42	Water	LC-UV	U = 1.25 UH ₂ = 0.675	24
U, UH ₂	Plasma 500 µL	SFU	Prot. prec.: 500 mg (NH ₄) ₂ SO ₄ Isopropanol	L/L: 4 mL 85% Ethyl acetate/15% Isopropanol	Hypercarb	30	Water	LC-UV	U = 0.2 UH ₂ = 0.2	23
U, UH ₂	Plasma 1 mL	5-homo-2'-deoxyuridine	Prot. prec.: 1 mL perchloric acid 1 M	SFE: non polar high capacity polymeric sorbent One column volume Methanol for elution. Dryness. 150 µL water	RP-18 Supelcoal		50% Acetonitrile 0.1% trifluoroacetic acid	LC-UV	UH ₂ = 0.2	22
U, UH ₂	Plasma 500 µL	SFC	Prot. prec.: 500 µL KH ₂ PO ₄ 10 mM	SFE: Atoll Xtrem 1000 µL ammonium formate buffer (10 mM, pH 5.0) for elution, dryness, 200 µL mobile phase A	dC18 Atlantis	15	10 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0)	LC-UV	U = 2.5 UH ₂ = 6.75	21
U, UH ₂	Plasma 500 µL	FUH ₂	Prot. prec.: 600 mg (NH ₄) ₂ SO ₄ Isopropanol	L/L: 4 mL 85% Ethyl acetate/15% Isopropanol	Hypercarb	77	Water	LC-UV	U = 1.25 UH ₂ = 0.675 SFU = 5	20
U, UH ₂ , SFU	Plasma 500 µL	U-Br	Prot. prec.: 20 µL orthophosphoric acid (5%)	L/L: 6 mL 16% Propanol/84% Ether	RP-18X Terra	35	Acetonitrile 50 mM potassium phosphate, 0.1% triethylamine	LC-UV	U = 1.25 UH ₂ = 0.675 SFU = 5	19
U, UH ₂	Plasma 500 µL	U-CI	Prot. prec.: 200 µL (NH ₄) ₂ SO ₄ Isopropanol	L/L: 6 mL 85% Ethyl acetate/15% Isopropanol	Spherisorb ODS2	45	10 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0)	LC-UV	U = 2 UH ₂ = 10	18
U, SFU	Plasma 500 µL	U-Br U-CI	Prot. prec.: 600 mg (NH ₄) ₂ SO ₄ Isopropanol	L/L: 1.200 µL 85% Ethyl acetate/15% Isopropanol	Spherisorb ODS2 Phase Sep	25	10 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0)	LC-UV	UH ₂ = 10 SFU = 6	17

Prot. prec.: protein precipitation; L/L: liquid/liquid; SFE: solid phase extraction; LC: liquid chromatography; MS/MS: tandem mass spectrometry; U: ultraviolet; ESI: electrospray ionization.

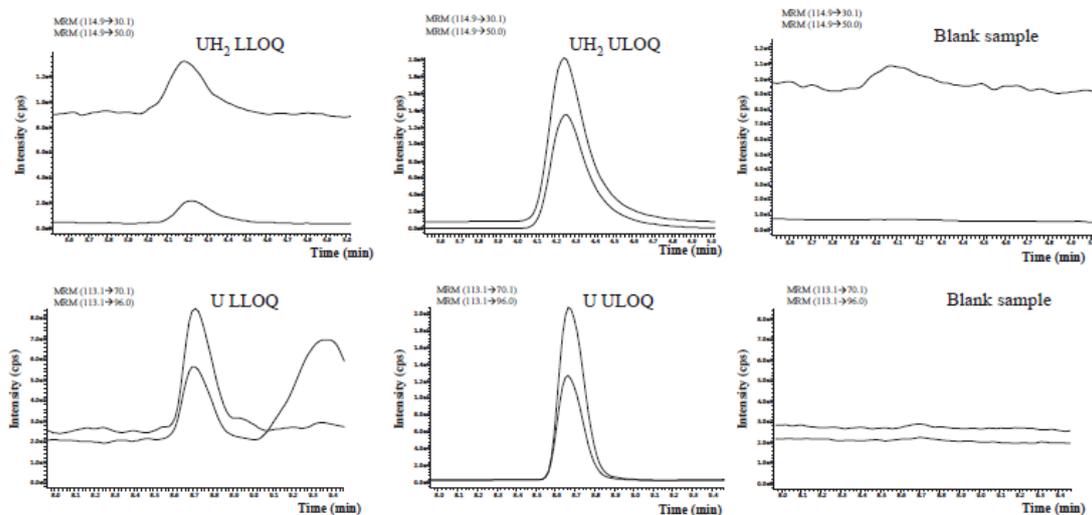


Fig. 1. Typical MRM chromatograms of uracil (bottom) and dihydrouracil (top) at the lower and upper limits of quantification (LLOQ and ULOQ). Blank samples were obtained after ULOQ.

precision within 20%. ULOQs were above the concentrations observed in DPD deficient patients, namely: 320 and 640 ng/ml for U and UH₂ respectively.

- Carry over, recovery and matrix effect:

By inspecting blank samples used during the validation procedure, no carry over was observed after the injection of calibration standards prepared at the ULOQ. A typical example of chromatogram is presented in Fig. 1 for U and UH₂. The mean recoveries were very stable for all the tested concentrations: 65 to 70% for UH₂ and 75 to 80% for U, with low CV% values for the 2 molecules. The mean matrix effects were 10.5 and 10.2% for U-¹³C¹⁵N₂ and UH₂-¹³C¹⁵N₂, respectively.

- Accuracy and precision

Intra and inter-assay precisions (%RSD) varied from 2.8 to 8.8 complying with EMA validation guidelines. Intra and inter-assay accuracies varied from 85.3 to 104.6 and were also within these acceptance criteria. The inaccuracy and CV were less than 5% for intra and inter-assay tests for the threshold value 16 ng/ml.

Recent recommendations proposed threshold values of 16 and 150 ng/ml for uraciluria to characterize a partial or a complete DPD deficiency, respectively. This implies that analytical methods have to be the most accurate, reliable and robust as possible. Indeed, a suboptimal quantification, in particular around threshold values may change or delay patient's care and medical decisions. Generally, inaccuracy and CV less than 15% are the common acceptance criteria to validate each parameter of a method [39]. Unfortunately, the French recommendations do not mention any acceptable inaccuracies for the 2 thresholds. In this case, a range of quantification from 13.6 to 18.4 ng/ml could be expected for the threshold value set at 16 ng/ml. When the recommendations are strictly respected, for patient's care, such range may have different consequences: (i) Wrongly measured less than 16 ng/ml, a patient could be considered as having no DPD deficiency. The clinician may not reduce the dose of 5-FU and the patient could be overexposed with a risk of toxicity; (ii) Wrongly measured more than 16 ng/ml, a patient could be considered as having a partial DPD deficiency. The 5-FU dose may be reduced and the patient could be

underexposed with a suboptimal treatment. Practically, to prevent these risks it may be recommended to re-analyze the sample or to explore the deficiency by genotyping. Both solutions delay the treatment whereas it's highly recommended that patients benefit from it as soon as they are diagnosed.

Obviously, a method with very low inaccuracy is needed to explore DPD deficiency. Even if they can provide such performances, the analytical methods reported up to now for the measurement of U and UH₂ are particularly long and tedious (Table 3). Most of these methods required 200 to 500 µL of plasma (except for [33]) and a preparation of the sample with a protein precipitation was always necessary before the extraction. Each also needed a liquid/liquid extraction (LLE) or solid phase extraction (SPE) with multiple manual steps including centrifugation, filtration and evaporation. In this study, we have automated the sample preparation in order to insure and maintain low accuracy. The automated sample preparation required 8 min. Then, after the automated transfer of the extract, the chromatographic separation was performed in 15 min. About 23 min were needed to obtain the first result. Then, as extraction and separation were performed in parallel, the system produced a result every 15 min.

Once the sample is on board of the system, this approach drastically decreases the manpower dedicated to sample preparation. In addition, automation is an ideal solution allowing the analysis of patients' samples rapidly/immediately in labs willing to perform this analysis every day/at all times.

- Clinical practice

The relevance of UH₂/U ratio was already reviewed by French group (ref HAS). The UH₂/U ratio as a biomarker for severe toxicities under fluoropyrimidines treatment is still controversial. In addition, no consensus value could be set between the different laboratories. The main reason is the presence of interfering compounds of UH₂ when analyzed by LC-UV. The genotyping approach for the diagnosis of DPD deficiency focuses on only 4 variants leading to a lack of sensitivity (false negatives). Therefore, the use of U concentrations as phenotypic approach of DPD deficiency is recommended currently by the French health authorities. The validated method here is now used for routine analysis and allowed the comparison of results obtained for 64 patients with a

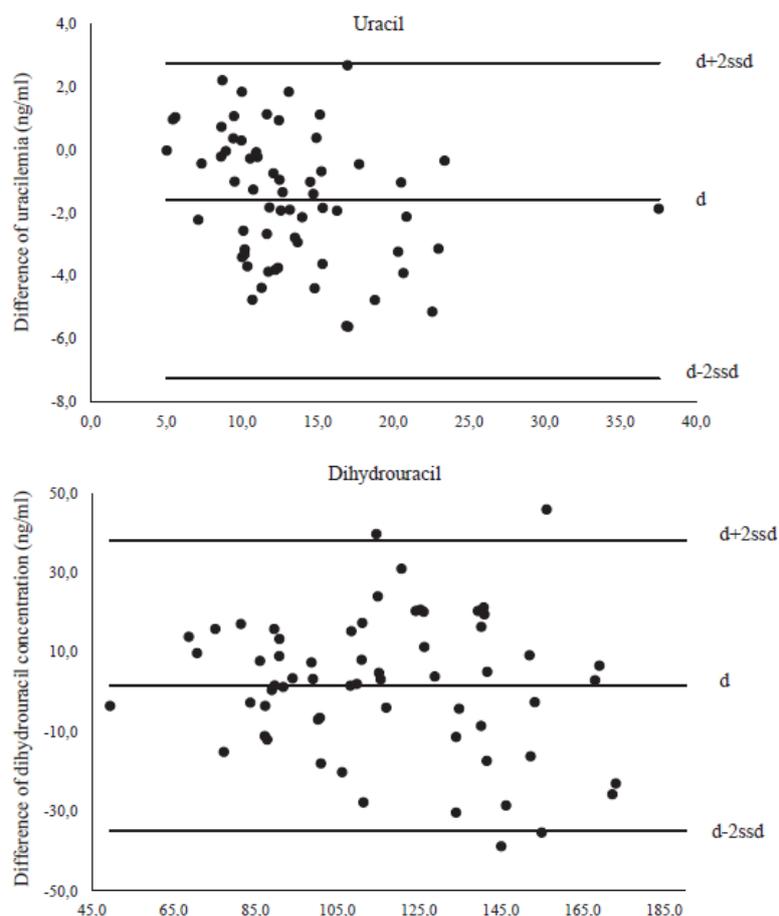


Fig. 2. Bland Altman analysis for uracil and dihydrouracil quantified with the newly procedure and a validated LC-MS method with manual sample preparation. d: mean difference. ssd: standard deviation.

reference method. Our results show reliable quantification. The concentrations of U in 63 patients ranged between 4.9 and 36.6 ng/mL. Seventeen patients have concentrations between 14 and 18 ng/mL. Among these, the 2 methods would have proposed different diagnosis for 5 patients (based on the threshold of 16 ng/ml). The difference varied from 1.8 to 5.6 ng/ml. In this study, 100% and 93.7% of the Bland Altman plots were within the $\pm 2SD$ interval for U and UH₂ concentrations, respectively. A summary of this study is presented in Fig. 2.

4. Conclusion

To our knowledge, a fully-automated LC-MS/MS method for accurate and robust quantification of U and UH₂ has not been published yet. This method could be used in routine labs facing a great increase in this activity since it allows high throughput by running samples continuously when necessary. Its application in routine clinical for the characterization of DPD deficiency is an ideal solution to reduce incidence of errors and thus insure best reproducibility, robustness and reliability [33,35].

CRediT authorship contribution statement

Tiphaine Robin: Validation, Writing - original draft. **Franck Saint-Marcoux:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision. **Doriane Toinon:** Methodology. **Naïma Tafzi:** Resources. **Pierre Marquet:** Writing - original draft. **Souleiman El Balkhi:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] R.B. Diasio, B.E. Harris, Clinical pharmacology of 5-fluorouracil, *Clin. Pharmacokinet.* 16 (1989) 215–237.
- [2] C. Heidelberger, N.K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, I. Griesbach, R. Duschinsky, R.J. Schnitzer, E. Pleven, J. Scheiner, Fluorinated pyrimidines, a

- new class of tumour-inhibitory compounds, *Nature* 179 (1957) 663–666.
- [3] F. Chionh, D. Lau, Y. Yeung, T. Price, N. Tebbutt, Oral versus intravenous fluoropyrimidines for colorectal cancer, *Cochrane Database Syst Rev*, 7 (2017) CD008398.
 - [4] V.C. Jordan, A. Retrospective, On Clinical Studies with 5-Fluorouracil, *Cancer Res.* 76 (2016) 767–768.
 - [5] F. Lemaire, F. Goirand, M. Launay, E. Chatelut, J.C. Boyer, A. Evrard, M.N. Paludetto, R. Guilhaumou, J. Ciccolini, A. Schmitt, 5-fluorouracil therapeutic drug monitoring: Update and recommendations of the STP-PT group of the SFPT and the GPCO-Umicancer, *Bull. Cancer* 105 (2018) 790–803.
 - [6] M.A. Lorient, J. Ciccolini, F. Thomas, C. Barin-Le-Guellec, B. Royer, G. Milano, N. Picard, L. Becquemont, C. Verstuyft, C. Narjoz, A. Schmitt, C. Robin-Dubigeon, A. Harle, A. Paci, V. Poincignon, S. Quaranta, A. Evrard, B. Hennart, F. Broly, X. Fonrose, C. Lafay-Chebassier, A.S. Wozny, F. Masskouri, J.C. Boyer, M.C. Etienne-Grimaldi, Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency screening and securing of fluoropyrimidine-based chemotherapies: update and recommendations of the French GPCO-Umicancer and RNPx networks, *Bull. Cancer* 105 (2018) 397–407.
 - [7] A.B. van Kuilenburg, J.G. Maring, Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetic models and therapeutic drug monitoring in cancer patients, *Pharmacogenomics* 14 (2013) 799–811.
 - [8] F. Goirand, F. Lemaire, M. Launay, C. Tron, E. Chatelut, J.C. Boyer, M. Bardou, A. Schmitt, How can we best monitor 5-FU administration to maximize benefit to risk ratio? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 14 (2018) 1303–1313.
 - [9] D. Meulendijks, A. Cats, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice? *Cancer Treat. Rev.* 50 (2016) 23–34.
 - [10] J. Ciccolini, E. Gross, L. Dahan, B. Lacarelle, C. Mercier, Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin. Colorectal Cancer* 9 (2010) 224–228.
 - [11] D. Meulendijks, L.M. Henricks, B.A.W. Jacobs, A. Aliev, M.J. Deenen, N. de Vries, H. Rosing, E. van Werkhoven, A. de Boer, J.H. Beijnen, C. Mandigers, M. Soesan, A. Cats, J.H.M. Schellens, Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity, *Br. J. Cancer* 116 (2017) 1415–1424.
 - [12] M.C. Etienne-Grimaldi, J.C. Boyer, C. Beroud, L. Mbatchesi, A. van Kuilenburg, C. Robin-Dubigeon, F. Thomas, J.L. Merlin, F. Pinguet, C. Ferrand, J. Meijer, A. Evrard, L. Llorca, G. Romieu, P. Follana, T. Bachelot, L. Chaigneau, X. Pivrot, V. Dieras, R. Lartigier, M. Mousseau, A. Goncalves, H. Roche, J. Bonnetterre, V. Servent, N. Doholou, Y. Chateau, E. Chamorey, J.P. Desvignes, D. Salgado, J.M. Ferrero, G. Milano, New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine, *PLoS ONE* 12 (2017) e0175998.
 - [13] M. Boisdrion-Celle, G. Remaud, S. Traore, A.L. Poirier, L. Gamelin, A. Morel, E. Gamelin, 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, *Cancer Lett.* 249 (2007) 271–282.
 - [14] E. Gamelin, M. Boisdrion-Celle, V. Guerin-Meyer, R. Delva, A. Lortholary, F. Genevieve, F. Larra, N. Ifrah, J. Robert, Correlation between uracil and dihydrodouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: a potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage, *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 1105.
 - [15] M. Launay, J. Ciccolini, C. Fournel, C. Blanquicett, C. Dupuis, N. Fakhry, F. Duffaud, S. Salas, B. Lacarelle, Upfront Dpd Deficiency Detection to Secure 5-Fu Administration: Part 2- Application to Head-and-Neck Cancer Patients, *Clin. Cancer Drugs* 4 (2017) 122–128.
 - [16] M. Launay, L. Dahan, M. Duval, A. Rodallec, G. Milano, M. Duluc, B. Lacarelle, J. Ciccolini, J.F. Seitz, Beating the odds: efficacy and toxicity of dihydropyrimidine dehydrogenase-driven adaptive dosing of 5-FU in patients with digestive cancer, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81 (2016) 124–130.
 - [17] E. Gamelin, M. Boisdrion-Celle, A. Turcant, F. Larra, P. Allain, J. Robert, Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic analysis of halogenopyrimidines in plasma, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 695 (1997) 409–416.
 - [18] M.B. Garg, J.C. Sevester, J.A. Sakoff, S.P. Ackland, Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrodouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 774 (2002) 223–230.
 - [19] J. Ciccolini, C. Mercier, M.F. Blachon, R. Favre, A. Durand, B. Lacarelle, A simple and rapid high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for 5-fluorouracil (5-FU) assay in plasma and possible detection of patients with impaired dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity, *J. Clin. Pharm. Ther.* 29 (2004) 307–315.
 - [20] G. Remaud, M. Boisdrion-Celle, C. Hameline, A. Morel, E. Gamelin, An accurate dihydrodouracil/uracil determination using improved high performance liquid chromatography method for preventing fluoropyrimidines-related toxicity in clinical practice, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 823 (2005) 98–107.
 - [21] R. Deporte, M. Amiard, A. Moreau, C. Charbonnel, L. Campion, High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrodouracil/uracil ratio in plasma, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 834 (2006) 170–177.
 - [22] M.H. Kristensen, P. Pedersen, J. Mejer, The value of dihydrodouracil/uracil plasma ratios in predicting 5-fluorouracil-related toxicity in colorectal cancer patients, *J. Int. Med. Res.* 38 (2010) 1313–1323.
 - [23] R.Z. Hahn, A.F. Galarza, A. Schneider, M.V. Antunes, G. Schwartzmann, R. Linden, Improved determination of uracil and dihydrodouracil in plasma after a loading oral dose of uracil using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and porous graphitic carbon stationary phase, *Clin. Biochem.* 48 (2015) 915–918.
 - [24] F. Thomas, I. Hennebelle, C. Delmas, I. Lochon, C. Dhelens, C. Garnier Tixidre, A. Bonadona, N. Penel, A. Goncalves, J.P. Delord, C. Toulas, E. Chatelut, Genotyping of a family with a novel deleterious DPYD mutation supports the pre-therapeutic screening of DPD deficiency with dihydrodouracil/uracil ratio, *Clin. Pharmacol. Ther.* 99 (2016) 235–242.
 - [25] H. Jiang, J. Jiang, P. Hu, Y. Hu, Measurement of endogenous uracil and dihydrodouracil in plasma and urine of normal subjects by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 769 (2002) 169–176.
 - [26] R. Svobaitė, I. Solassol, F. Pinguet, L. Ivanauskas, J. Bres, F.M. Bressolle, HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrodouracil in human plasma, *Clin. Chem.* 54 (2008) 1463–1472.
 - [27] B. Buchel, P. Rhyn, S. Schurch, C. Buhr, U. Amstutz, C.R. Largiadre, LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrodouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrodouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 7–16.
 - [28] I.C. Cesar, G.F. Cunha-Junior, R.M. Duarte Byrro, L.G. Vaz Coelho, G.A. Pianetti, A rapid HPLC-ESI-MS/MS method for determination of dihydrodouracil/uracil ratio in plasma: evaluation of toxicity to 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer, *Ther. Drug Monit.* 34 (2012) 59–66.
 - [29] O. Chavani, B.P. Jensen, R.M. Strother, C.M. Florowski, P.M. George, Development, validation and application of a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry assay measuring uracil, 5,6-dihydrodouracil, 5-fluorouracil, 5,6-dihydro-5-fluorouracil, alpha-fluoro-beta-ureidopropionic acid and alpha-fluoro-beta-alanine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 142 (2017) 125–135.
 - [30] F. Coudore, D. Roche, S. Lefeuvre, D. Fausot, E.M. Billaud, M.A. Lorient, P. Beaune, Validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for quantifying uracil and 5,6-dihydrodouracil in human plasma, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 877–884.
 - [31] B.A. Jacobs, H. Rosing, N. de Vries, D. Meulendijks, L.M. Henricks, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, Development and validation of a rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for determination of uracil and dihydrodouracil in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 126 (2016) 75–82.
 - [32] C. Stentoft, M. Vestergaard, P. Lovendahl, N.B. Kristensen, J.M. Moorby, S.K. Jensen, Simultaneous quantification of purine and pyrimidine bases, nucleosides and their degradation products in bovine blood plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 197–210.
 - [33] M. Vogeser, F. Kirchhoff, Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 4–13.
 - [34] N. Zheng, H. Jiang, J. Zeng, Current advances and strategies towards fully automated sample preparation for regulated LC-MS/MS bioanalysis, *Bioanalysis* 6 (2014) 2441–2459.
 - [35] G.R.D. Prabhu, P.L. Urban, The dawn of unmanned analytical laboratories, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 88 (2017) 41–52.
 - [36] D. Wei, M. Li, K.W. King, L. Yang, Online and automated sample extraction, *Bioanalysis* 7 (2015) 2227–2233.
 - [37] T. Robin, A. Barnes, S. Dulacourt, N. Loftus, S. Baumgarten, S. Moreau, P. Marquet, S. El Balkhi, F. Saint-Marcoux, Fully automated sample preparation procedure to measure drugs of abuse in plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 5071–5083.
 - [38] R.F. Murphy, F.M. Balis, D.G. Poplack, Stability of 5-fluorouracil in whole blood and plasma, *Clin. Chem.* 33 (1987) 2299–2300.
 - [39] T.C.O.T.E. COMMUNITIES, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, in: E.U. commission (Ed.), 2002.

Discussion - Conclusion

Basés sur un système LC-MS et un préparateur d'échantillons alors tout juste commercialisés, mes travaux de thèse avaient pour but de développer (i) différentes méthodes analytiques avec des applications de toxicologie cliniques (ii) et différentes procédures d'extraction automatisées des échantillons.

Le premier projet imaginé par le laboratoire du CHU de Limoges et la société Shimadzu a été de développer différentes procédures de screening permettant de proposer des « méthodes clés en main » à des laboratoires faisant l'acquisition d'un LCMS 8060 et/ou un CLAM.

Dans un premier temps, deux librairies de spectres de masse contenant l'information spectrale d'un très grand nombre de xénobiotiques d'intérêt en toxicologie ont été développées. La première contient 4 spectres par molécule correspondant aux PIS acquis à 3 énergies de collision différentes ($\pm 10,35, 55$ eV), en mode négatif ou positif, plus un « merged spectrum » correspondant à la somme de ces 3 PIS. La deuxième a été construite avec un mode dit « MRM spectrum mode » consistant à suivre pour chaque molécule jusqu'à 15 transitions, chacune avec des énergies de collision optimisées, puis à reconstruire un spectre contenant toute l'information spectrale (« MRM spectrum »). Nos travaux suggèrent que ce mode d'acquisition présente une bien meilleure spécificité que les modes d'acquisition classiques pour des applications de screening. En effet, une méthode MRM ne suit usuellement que 2 ou 3 transitions par molécules. Dans un contexte de recherche sans *a priori* comme le screening, cette information spectrale est le plus souvent trop pauvre. Les PIS peuvent, eux, manquer de spécificité car les énergies de collision « fixes » ne sont, par définition, pas optimales pour chaque molécule. En conditions réelles, avec des échantillons issus de la routine hospitalière, les scores d'identification en librairies peuvent alors ne pas être très élevés et laisser un doute à l'opérateur.

Ces librairies réunissent l'ensemble des informations nécessaires à la création de méthodes de screening « à façon ». Pour chacune sont disponibles les transitions MRM optimisées de chaque composé (maximum de 15), ses temps de rétention et diverses informations telles que le numéro CAS, la classe pharmacologique, la formule chimique, etc... Un opérateur peut définir la liste des molécules qu'il souhaite inclure dans sa méthode de screening. Il est ainsi possible de limiter la recherche aux molécules psychotropes ou aux substances illicites, ou bien encore aux cardiotropes...

Dans un deuxième temps, sur la base d'un mélange de référence de 23 molécules, nous avons dû définir des conditions chromatographiques qui doivent permettre l'élution de composés très polaires ou très apolaires. Le propre d'un screening est de pouvoir détecter des molécules aux propriétés physicochimiques très différentes. Pour ne citer que ces deux exemples, un screening doit pouvoir « chromatographier » des métabolites de médicaments (ou de toxiques) qui sont le plus souvent extrêmement polaires, mais également des pesticides qui sont souvent des molécules très apolaires. En l'état, environ 1300 « molécules d'intérêt » ont pu être « chromatographiées » selon les conditions que nous avons définies.

La méthode incorpore 11 étalons internes, répartis tout au long du chromatogramme. Chaque molécule est recherchée par son TRR vis-à-vis de l'étalon interne qui lui est le plus proche. Ce nombre d'étalons est un gage de robustesse et permettra également de pouvoir modifier au cours du temps les conditions chromatographiques sans nécessiter de « re-chromatographier » l'ensemble des molécules. Plus précisément, après injection d'un

mélange contenant les 11 étalons internes et les 23 molécules de référence, il est possible d'appliquer une équation tenant compte des modifications de TR observées tout au long du chromatogramme (le plus souvent un polynôme du premier degré).

Dans un troisième temps, des méthodes d'extraction ont été développées. La première est basée sur l'utilisation de sels QuEChERS. Le laboratoire du CHU de Limoges ayant déjà démontré l'efficacité de cette approche pour la recherche et le dosage de pesticides, de stupéfiants et de benzodiazépines, nous avons décidé de l'appliquer à nos méthodes de screening. Nous avons testé cette approche sur un panel d'environ 120 molécules ainsi que sur notre mélange de référence. Cette extraction est très simple à mettre en œuvre : une spatule de sels dans l'échantillon sanguin ou urinaire auquel a été au préalable ajouté de l'acétonitrile, centrifugation et injection du surnageant. Par exemple, la préparation d'une gamme, de 2 CQ et d'une série de 10 échantillons patients, nécessite moins de 45 minutes pour un opérateur même peu expérimenté. Nos travaux suggèrent qu'elle soit une bonne approche pour un laboratoire h24 7-7 devant réaliser des screening en urgence.

Cependant, cette méthode nécessite toujours un temps humain précieux là où il peut être nécessaire de rendre un résultat en urgence. Ainsi, dans un deuxième temps, nous avons développé une deuxième méthode d'extraction entièrement automatisée à l'aide du CLAM-2000. Le développement s'est basé sur le mélange de référence, dans un premier temps. Il s'agissait bien sûr de trouver le meilleur compromis. Au final, 9 min sont nécessaires à l'extraction du 1^{er} échantillon. Le temps de préparation est ensuite « masqué » puisque l'échantillon suivant est extrait pendant l'analyse du précédent. Cette approche est un véritable bon en avant car, une fois l'échantillon chargé à bord du CLAM-2000, plus aucune intervention humaine n'est nécessaire. Au-delà d'un gain de temps manifeste, l'utilisation d'un préparateur d'échantillons entièrement automatisé et directement couplé au système LC-MS, permet de libérer totalement le personnel technique vers d'autres tâches. Dans des travaux menés pour mettre en place une méthode de dosage de l'uracile et du dihydrouracile dans le cadre du STP des fluoropyrimidines, nous avons également montré la possibilité d'introduire cette approche pour des activités de dosage de médicaments en routine.

Par la suite, nous avons testé différents modes d'acquisition spectrale dans le but de mettre au point une méthode de screening à la fois qualitative et quantitative. Fort des résultats obtenus lors de la validation de la méthode combinant MRM-SpM et CLAM-2000 pour un panel de drogues d'abus nous avons décidé d'appliquer les mêmes paramètres à un panel de 248 composés. Finalement, une méthode de screening permettant d'identifier et de quantifier avec une précision acceptable ce panel de composés pour des applications en toxicologie a été validée. La méthode est simple à mettre en œuvre puisque (i) l'extraction est automatisée, (ii) sa robustesse permet de ne pas calibrer quotidiennement le système, (iii) un mélange de référence permet la qualification opérationnelle du système (temps de rétention et sensibilité). Il s'agit seulement d'un exemple de méthode de screening qu'un utilisateur peut mettre en place. Nous avons ici « pioché » 248 molécules dans la bibliothèque dans l'optique d'obtenir un screening répondant au mieux à une utilisation en première ligne dans un laboratoire de garde ayant des demandes de toxicologie clinique. Comme nous l'avons indiqué plus haut, chaque utilisateur pourra inclure dans ce type de méthode les molécules qu'il jugera les plus pertinentes en fonction de ses activités. Si nous n'avons pas testé le nombre maximal de molécules pouvant être incluses, nous avons

démontré que les conditions chromatographiques et les conditions d'acquisition permettaient de suivre au moins, environ, 250 molécules.

Stricto sensu, cette méthode n'est pas une méthode de recherche large sans a priori. Son mode d'acquisition est basé sur le suivi de transitions MRM, donc elle ne sera en mesure de détecter que les molécules a priori ciblées. C'est pourquoi il est important que l'utilisateur définisse une liste des molécules qu'il souhaite absolument détectées. En aucun cas cette approche ne pourra signaler la présence d'un spectre, et donc d'un produit inconnu. Elle doit être positionnée comme une méthode de première ligne pour des laboratoires travaillant 24h/24 7j/7, dans un contexte d'urgence.

Pour proposer une autre alternative, le prochain projet est de développer des méthodes de screening sur le nouveau spectromètre de masse haute résolution de Shimadzu, le LCMS 9030. La haute résolution ouvre le champ des possibilités avec notamment d'autres modes d'acquisitions, tel que le Data Independent Acquisition (DIA), plus adaptés aux méthodes de screening non ciblées.

Bibliographie

1. Shimadzu. LCMS-8060 Manuel d'instructions. 2015.
2. Capolaghi B, Moulsmas M, Houdret N, Baud FJ. Stratégies analytiques en toxicologie d'urgence. *Ann Toxicol Anal.* 2000;12:274–81.
3. Turcant A, Premel-Cabic A, Cailleux A, Allain P. Toxicological screening of drugs by microbore high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and ultraviolet spectral library searches. *Clin Chem.* 1991;37:1210–5.
4. Lambert WE, Van Bocxlaer JF, De Leenheer AP. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;689:45–53.
5. Szymanski G. Validation d'une méthode de Multi-Target-Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et étude de l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble. :112.
6. Tenczer J, Lappenberg-Pelzer M, Schneider V, Demme U, Köppel C. Fatal poisoning with detajmium: identification of detajmium and its metabolites and artifacts by gas chromatography-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B, Biomed Appl.* 1994;661:47–53.
7. Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrom Rev.* 2006;25:838–65.
8. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin Biochem.* 2008;41:649–62.
9. Weinmann W, Stoertz M, Vogt S, Wendt J. Tune compounds for electrospray ionisation/in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching. *J Chromatogr A.* 2001;926:199–209.
10. Maurer HH. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem.* 2005;38:310–8.
11. Saint-Marcoux F, Lachâtre G, Marquet P. Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography--diode array detection. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14:14–22.
12. Venisse N, Marquet P, Duchoslav E, Dupuy JL, Lachâtre G. A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2003;27:7–14.
13. Sauvage F-L, Saint-Marcoux F, Duretz B, Deporte D, Lachatre G, Marquet P. Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2006;52:1735–42.
14. Dulaurent S, Moesch C, Marquet P, Gaulier J-M, Lachâtre G. Screening of pesticides in blood with liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396:2235–49.
15. Vogeser M, Kirchhoff F. Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. *Clinical Biochemistry.* 2011;44:4–13.
16. Zheng N, Jiang H, Zeng J. Current advances and strategies towards fully automated sample preparation for regulated LC-MS/MS bioanalysis. *Bioanalysis.* 2014;6:2441–59.
17. Zheng N, Jiang H, Zeng J. Current advances and strategies towards fully automated sample preparation for regulated LC-MS/MS bioanalysis. *Bioanalysis.*

- 2014;6:2441–59.
18. Wei D, Li M, King KW, Yang L. Online and automated sample extraction. *Bioanalysis*. 2015;7:2227–33.
 19. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*. 2003;86:412–31.
 20. Renard JA. Water-2-Chloroethanol-Salt and Water-Tetrahydrofurfuryl Alcohol-Salt. *Journal of chemical and engineering data*. 1962;7:3.
 21. Renard JA, Oberg G. Ternary Systems: Water-Acetonitrile-Salts. *Journal of chemical and engineering data*. 1965;10:4.
 22. Luke MA, Froberg JE, Masumoto HT. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem*. 1975;58:1020–6.
 23. K. Mastovska and S. J. Lehotay. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J. Chromatogr. A*. 2004;42:259-72.
 24. Schenck FJ, Callery P, Gannett PM, Daft JR, Lehotay SJ. Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. *J AOAC Int*. 2002;85:1177–80.
 25. Mol HGJ, Rooseboom A, van Dam R, Roding M, Arondeus K, Sunarto S. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389:1715–54.
 26. Banerjee K, Oulkar DP, Patil SB, Patil SH, Dasgupta S, Savant R, et al. Single-laboratory validation and uncertainty analysis of 82 pesticides determined in pomegranate, apple, and orange by ethyl acetate extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int*. 2008;91:1435–45.
 27. Dulaurent S, El Balkhi S, Poncelet L, Gaulier J-M, Marquet P, Saint-Marcoux F. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408:1467–74.
 28. Cailleux A, Le Bouil A, Auger B, Bonsergent G, Turcant A, Allain P. Determination of opiates and cocaine and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 1999;23:620–4.
 29. Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;713:91–109.
 30. Soriano T, Jurado C, Menéndez M, Repetto M. Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. *J Anal Toxicol*. 2001;25:137–43.
 31. De Jager AD, Bailey NL. Online extraction LC-MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879:2642–52.
 32. Sausseureau E, Lacroix C, Gaulier JM, Gouille JP. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012;885–886:1–7.
 33. Imbert L, Dulaurent S, Mercerolle M, Morichon J, Lachâtre G, Gaulier J-M. Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic Sci Int*. 2014;234:132–8.
 34. Anzillotti L, Odoardi S, Strano-Rossi S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and

- benzodiazepines by UPLC-MSMS(☆). *Forensic Sci Int.* 2014;243:99–106.
35. Wissenbach DK, Meyer MR, Remane D, Philipp AA, Weber AA, Maurer HH. Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MSn screening concept. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400:3481–9.
 36. Remane D, Wissenbach DK, Peters FT. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology - An update. *Clin Biochem.* 2016;49:1051–71.
 37. Oberacher H, Arnhard K. Compound identification in forensic toxicological analysis with untargeted LC-MS-based techniques. *Bioanalysis.* 2015;7:2825–40.
 38. Wang Z, Lu J, Zhang Y, Tian Y, Yuan H, Xu Y. Applications and challenges in using LC-MS/MS assays for quantitative doping analysis. *Bioanalysis.* 2016;8:1307–22.
 39. Meyer MR, Maurer HH. Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices - Where do we stand today? *Anal Chim Acta.* 2016;927:13–20.
 40. Rosano TG, Wood M, Swift TA. Postmortem drug screening by non-targeted and targeted ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry technology. *J Anal Toxicol.* 2011;35:411–23.
 41. Lynch KL, Breaud AR, Vandenberghe H, Wu AHB, Clarke W. Performance evaluation of three liquid chromatography mass spectrometry methods for broad spectrum drug screening. *Clin Chim Acta.* 2010;411:1474–81.
 42. Bylda C, Thiele R., Kobold U. and Volmer D.A. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst.* 2014;139:2265-76.
 43. Lorient M.A, Ciccolini J, Thomas F, Barin-Le-Guellec C, Royer B, Milano G et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency screening and securing of fluoropyrimidine-based chemotherapies: update and recommendations of the of the French GPCO-Uncancer and RNPgX networks, *Bull. Cancer* 105 (2018) 397–407.
 44. Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16:215–37.
 45. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.* 1957;179:663–6.
 46. Chionh F, Lau D, Yeung Y, Price T, Tebbutt N. Oral versus intravenous fluoropyrimidines for colorectal cancer, *Cochrane Database Syst Rev,* 7 (2017):CD008398.
 47. Jordan VC. A Retrospective: On Clinical Studies with 5-Fluorouracil. *Cancer Res.* 2016;76:767–8.
 48. Svobaite R, Solassol I, Pinguet F, Ivanauskas L, Brès J, Bressolle FMM. HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrouracil in human plasma. *Clin Chem.* 2008;54:1463–72.
 49. Büchel B, Rhyn P, Schürch S, Bühr C, Amstutz U, Largiadèr CR. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomed Chromatogr.* 2013;27:7–16.
 50. César IC, Cunha-Júnior GF, Duarte Byrro RM, Vaz Coelho LG, Pianetti GA. A rapid HPLC-ESI-MS/MS method for determination of dihydrouracil/uracil ratio in plasma: evaluation of toxicity to 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer. *Ther Drug Monit.* 2012;34:59–66.
 51. Chavani O, Jensen BP, Strother RM, Florkowski CM, George PM. Development, validation and application of a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry assay measuring uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil, 5,6-dihydro-5-fluorouracil, α -fluoro- β -ureidopropionic acid and α -fluoro- β -alanine in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;142:125–35.
 52. Coudoré F, Roche D, Lefeuvre S, Faussot D, Billaud EM, Lorient M-A, et al.

- Validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for quantifying uracil and 5,6-dihydrouracil in human plasma. *J Chromatogr Sci.* 2012;50:877–84.
53. Jacobs BAW, Rosing H, de Vries N, Meulendijks D, Henricks LM, Schellens JHM, et al. Development and validation of a rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for determination of uracil and dihydrouracil in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;126:75–82.
 54. Stentoft C, Vestergaard M, Løvendahl P, Kristensen NB, Moorby JM, Jensen SK. Simultaneous quantification of purine and pyrimidine bases, nucleosides and their degradation products in bovine blood plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014;1356:197–210.
 55. Tafzi N, Woillard J-B, Fleytoux A, Picard N, Marquet P. Phenotyping of Uracil and 5-Fluorouracil Metabolism Using LC-MS/MS for Prevention of Toxicity and Dose Adjustment of Fluoropyrimidines. *Ther Drug Monit.* 2020;42:540–7.

Mise au point de méthodes de recherche large de xénobiotiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Dans de nombreux contextes de toxicologie clinique, le screening ou criblage toxicologique est la première analyse effectuée chez un patient, lorsque la nature ou la présence même de médicaments ou de toxiques est totalement inconnue. Le plus souvent, le screening précède la mise en œuvre de méthodes quantitatives spécifiques. Les méthodes d'extractions peuvent être diverses mais celles-ci restent en général manuelles.

Les objectifs de nos travaux étaient de développer des méthodes de screening qualitatives, quantitatives et automatisées avec un spectromètre de masse en tandem (modèle 8060 ; Shimadzu) et une préparateur automatisé d'échantillons (CLAM-2000 ; Shimadzu).

Des bibliothèques regroupant les paramètres spectraux et chromatographiques d'environ 1 300 molécules d'intérêt en toxicologie ont été construites. Sur la base de ces bibliothèques plusieurs méthodes de screening faisant appel à différents modes d'acquisition spectrales ont été développées et évaluées (MTS, MRM, MRM-SpM,...). Différentes méthodes d'extraction ont été également mises en place : préparation manuelle basée sur l'utilisation des sels QuEChERS et approche entièrement automatisée grâce au CLAM-2000.

Ses approches ont été appliquées à des échantillons réels et ont vu leurs performances comparées à celles de méthodes déjà accréditées selon les exigences de la norme ISO-15189. Elles pourraient notamment être positionnées comme des méthodes de première ligne pour des laboratoires travaillant 24h/24 7j/7, dans un contexte d'urgence.

Mots-clés : screening, criblage toxicologique, chromatographie liquide, spectrométrie de masse

Development of screening procedures using chromatography-tandem mass spectrometry for forensic and clinical application.

Screening methods for compounds of interest in clinical toxicology have been historically employed as first-line analysis to either confirm or exclude the hypothesis of drug overdose, or poisoning with a toxicant. After identification using a screening method, quantification using specific methods is often necessary in a second time to assess the severity of intoxication. This obviously increases the turnaround time and has an impact on patient care. With regards to the rapidity needed to report results in clinical toxicology, sample extraction may be a limiting step. There is no universal extraction procedure for human samples prior to screening analysis. Our goal were to developed screening procedures using a programmable liquid handler (CLAM-2000; Shimadzu®) directly coupled to a liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS 8060; Shimadzu®).

Libraries with spectral and chromatographic parameters were built for about 1300 compounds selected based on their relevance to, and occurrence in, clinical toxicology.

Using these libraries, screening methods were developed using different acquisition modes.

Two different extraction procedures were developed: one using QuEChERS salts, another using the CLAM-2000.

Each approach was validated according to the ISO 15189 requirements and was applied to real patient samples. The different screening methods yielded high confidence in compound detection and should be useful in core labs facing clinical toxicology situations where rapid and reliable results are needed.

Keywords : screening, LCMS 8060, CLAM-2000, MRM-SpM

