

Thèse d'exercice

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 16 juin 2017

par

Tiphaine Robin

né(e) le 19 septembre 1992, à Limoges

**Mise au point d'une méthode de recherche large de xénobiotiques
par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
en tandem**

Examineurs de la thèse :

M. Philippe Cardot , Professeur des Universités	Président
M. Franck Saint-Marcoux , Professeur des Universités – Praticien Hospitalier	Juge
M. Damien Richard , Praticien Hospitalier	Juge
M. Sylvain Dulaurent , Docteur en Sciences	Membre invité
M. Alban Huteau	Membre invité





Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 16 juin 2017

par

Tiphaine Robin

né(e) le 19 Septembre 1992, à Limoges

**Mise au point d'une méthode de recherche large de xénobiotiques
par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
en tandem.**

Examineurs de la thèse :

M. **Philippe Cardot**, Professeur des Universités

Président

M. **Franck Saint-Marcoux**, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Juge

M. **Damien Richard**, Praticien Hospitalier

Juge

M. **Sylvain Dulaurent**, Docteur en Sciences

Membre invité

M. **Alban Huteau**

Membre invité



Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE
-------------------------	-------------

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE



CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

FABRE Gabin	(01.09.2016 au 31.08.2017) CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
--------------------	--



LAVERDET Betty

(1.09.2016 au 31.08.2017)
PHARMACIE GALENIQUE

PHAM Thanh Nhat

(1.09.2016 au 31.08.2017)
CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement,

Monsieur Franck SAINT-MARCOUX, pour son soutien et tout le temps qu'il m'a consacré. Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse.

Monsieur Damien Richard, pour avoir accepté de juger cette thèse.

Monsieur Philippe CARDOT, pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Monsieur Sylvain DULAURENT, pour sa disponibilité et sa pédagogie (du coup).

Monsieur Alban HUTEAU, pour son accueil et ses conseils.

Alan Barnes pour m'avoir fait partager ses connaissances par ordinateur interposés.

L'ensemble de l'équipe du service de PTP du CHU de Limoges. Merci pour votre aide et votre bonne humeur. C'est un réel plaisir de travailler avec vous.

L'équipe de Shimadzu. Travailler avec vous à Paris a été une expérience très enrichissante.

Ma famille pour leur soutien sans faille.

A Elise, Corentin, Sebastien, Amandine, Benjamin et Pierre : sans vous ces années d'études auraient été bien tristes.



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

Introduction	1
Partie 1 : Chromatographie, spectrométrie de masse et screening.....	2
I) Chromatographie.....	3
1) Introduction.....	3
a) Définition	3
b) Principe.....	3
c) Intérêt.....	3
2) Les différents types de chromatographie	4
a) La chromatographie ionique	4
b) La chromatographie d'exclusion stérique	4
c) La chromatographie d'adsorption	4
d) La chromatographie de partage.....	4
3) Organisation d'une chaîne HPLC.....	5
a) Les phases mobiles.....	6
b) Le dégazeur	8
c) Les pompes.....	8
d) L'injecteur.....	9
e) Colonne.....	10
f) Détecteur	10
II) Spectrométrie de masse.....	11
1) Introduction.....	11
a) Définition	11
b) Principe	11
c) Intérêt.....	11
2) Mode d'ionisation, analyseur et détecteur choisis pour le développement du screening 11	
a) Mode d'ionisation : l'Electrospray (ESI)	11
b) Type d'analyseur : quadripôle	12
c) Le détecteur : dynode de conversation et multiplicateur d'électron.....	13
3) Le spectromètre de masse de type triple quadripôle	14
a) Organisation.....	14
b) Les principaux modes de balayage d'un triple quadripôle.....	14
b.1) Mode full scan (spectre complet)	14



b.2) Single ion monitoring (SIM).....	15
b.3) Product ion scan (PIS).....	15
III) Screening	16
1) Introduction.....	16
2) LC-DAD	17
3) GC-MS	17
4) LC-MS	18
5) Expérience de Limoges pour le screening LC-MS	18
6) Conclusion.....	20
Partie 2 : Travaux personnels.....	22
A) Stratégie globale	23
I) Système LC-MS/MS.....	25
II) Détermination des conditions chromatographiques et des paramètres de la source d'ionisation	25
7) Choix des conditions chromatographiques.....	25
8) Choix des paramètres de la source d'ionisation.....	27
III) Infusion des molécules	27
1) Méthode d'infusion développée pour le spectromètre de masse en tandem 8060	27
2) Traitement des résultats	28
IV) Choix des étalons internes.....	33
V) Détermination des temps de rétention.....	34
VI) Enregistrement des spectres de masse à partir des pics chromatographiques	37
VII) Création des méthodes d'acquisition	39
1) Le General Unknown Screening (GUS)	39
a) Principe.....	39
b) Méthode GUS créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060.....	39
2) Multiple Reaction Monitoring (MRM)	40
a) Principe.....	40
b) Méthode MRM créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060.....	40
9) Le MRM spectrum mode (MRM-SpM)	40
a) Principe.....	40
b) Méthode MRM spectrum mode créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060.....	40
3) Multiple Target Screening (MTS)	41
a) Principe.....	41
b) Méthode MTS créée sur le spectromètre de masse en tandem 8060.....	41



4) Comparaison aux bibliothèques de spectres de masse	41
5) Comparaison GUS / MRM / MRM-SpM / MTS	41
a) Aspects qualitatifs et quantitatifs	41
b) Spécificité.....	41
c) Sensibilité.....	42
VIII) Choix de la méthode d'extraction	43
B) Résultats	44
I) Construction d'une librairie de spectres de masse et de transitions MRM pour plus de 1 250 composés.....	44
II) Evaluation de la méthode GUS	64
III) Evaluation de la méthode MTS.....	69
Discussion - Conclusion	77
Bibliographie	79
Webographie.....	81



Table des illustrations

Figure 1 : exemple d'un pic chromatographique	3
Figure 2 : organisation d'une chaîne HPLC	5
Figure 3 : force éluante des principaux solvants en chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversée.....	6
Figure 4 : abaque de calcul de la force éluante d'un mélange binaire.....	6
Figure 5 : table de miscibilité des solvants.....	7
Figure 6 : exemple de séparation de deux composés en mode isocratique	7
Figure 7 : exemple de séparation de deux composés en mode gradient d'élution	8
Figure 8 : exemple de pompes HPLC.....	9
Figure 9 : Vanne d'injection en phase de chargement et d'injection.....	9
Figure 10 : principe d'une ESI	12
Figure 11 : schéma du principe d'un analyseur quadripolaire	13
Figure 12 : organisation d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle.....	14
Figure 13 : mode full scan	14
Figure 14 : mode SIM.....	15
Figure 15 : mode Product Ion Scan	15
Figure 16 : pourcentage des molécules détectées par une, deux ou les trois méthodes de screening.....	21
Figure 17 : étapes de développement de la méthode de screening.....	24
Figure 18 : principe d'une infusion à partir de l'ion pseudo-moléculaire	27
Figure 19 : SelectPre de la clozapine	29
Figure 20 : CE_Select du $[M+H]^+$ de la clozapine.....	30
Figure 21 : CE_Select du $[M+Na]^+$ de la clozapine.....	31
Figure 23 : organigramme décisionnel du traitement des résultats de l'infusion.....	32
Figure 24 : chromatogramme de la clozapine	35
Figure 25 : chromatogramme de la chlorpromazine.....	36
Figure 26 : organigramme décisionnel du traitement des résultats des temps de rétention ..	37
Figure 27 : construction d'un spectre de masse à partir des intensités d'un pic chromatographique	37
Figure 28 : intensité des ions en fonction de leur rapport m/z.....	39
Figure 29 : principe d'une MRM.....	40
Figure 30 : comparaison des méthodes GUS, MRM, MRM-SpM et MTS.....	42
Figure 31 : principe de fonctionnement d'une extraction par les sels QuEChERS	43



Table des tableaux

Tableau 1 : résumé des différentes caractéristiques des méthodes de screening	20
Tableau 2 : mélange des 16 molécules de référence	26
Tableau 3 : paramètres chromatographiques retenus.....	26
Tableau 4 : paramètres du spectromètre de masse retenus	27
Tableau 5 : critères de sélection des transitions ion parent > ion fils	28
Tableau 6 : caractéristiques des 10 étalons internes retenus	34
Tableau 7 : rang des différentes transitions de la clozapine	36



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
- dp : diamètre des particules
- m/z : masse sur charge
- ESI : ElectroSprayIonization
- 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



Introduction

L'objectif de ma thèse était de développer une méthode de recherche large de xénobiotiques (screening) sur une chaîne HPLC (High Performance Liquid Chromatography) couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). Ce projet reposait sur une collaboration entre 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. Son souhait était de créer une méthode de screening « clef en main » pouvant être associée à leurs systèmes de LC-MS/MS de dernière génération. Ainsi, un système 8060 a été confié au service PTP avec pour mission la mise au point de la méthode de screening.

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, les composés mis en évidence par le screening sont recherchés et dosés par une méthode quantitative spécifique. Par exemple, un antidépresseur peut être mis en évidence dans le sang lors du screening, puis peut être dosé par une méthode spécifique.

Dans ce travail, après avoir présenté la chromatographie liquide et le spectromètre de masse (en particulier les chaînes HPLC et le spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle) ainsi que les différentes approches du screening, nous présenterons la stratégie de développement de la méthode de screening sur le système 8060.

Partie 1

Chromatographie, spectrométrie de masse et screening

l) Chromatographie

1) Introduction

a) Définition

La chromatographie est un procédé de séparation de substances chimiques reposant sur les différences de comportement entre une phase mobile et une phase stationnaire.

b) Principe

L'échantillon à analyser est entraîné par une phase mobile (liquide ou gazeuse) à travers une phase stationnaire (liquide ou solide). La phase stationnaire se situe soit sur une surface plane soit à l'intérieur d'une structure cylindrique appelée colonne. Les substances contenues dans l'échantillon vont plus ou moins interagir avec la phase stationnaire et vont donc être plus ou moins retenues par cette dernière.

Le type d'interaction mis en jeu va dépendre de la nature de la phase stationnaire (résine, gel,...) et des phénomènes impliqués (exclusion stérique, liaison de Van der Waals,...).

c) Intérêt

Chaque composé est plus ou moins retenu par la phase stationnaire selon des caractéristiques qui lui sont propre. Le temps passé dans la colonne est appelé temps de rétention (TR). Le temps de rétention est caractéristique pour chaque molécule.

Pour déterminer ce temps de rétention, la colonne doit être couplée à un détecteur. Ce dernier va détecter le composé au fur et à mesure qu'il sort de la colonne. Le signal aura un profil gaussien (= pic chromatographique, voir figure 1).

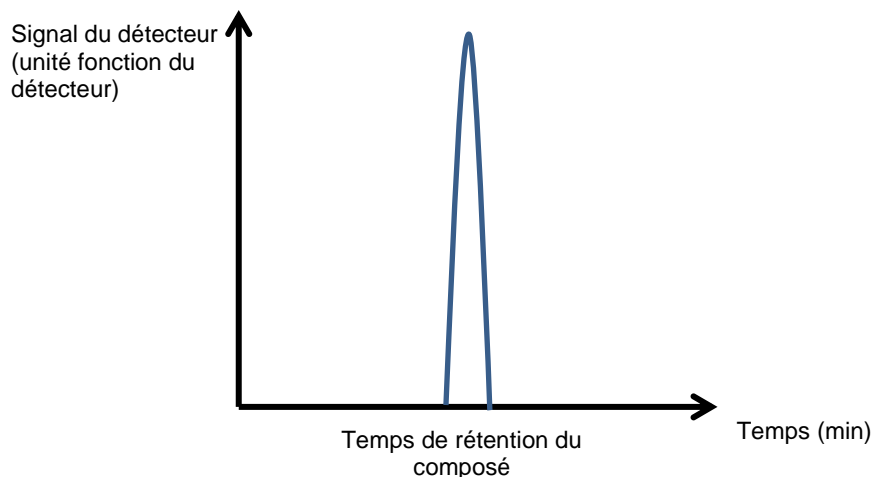


Figure 1 : exemple d'un pic chromatographique

On peut calculer l'aire sous la courbe du composé. Cette aire est directement proportionnelle à la concentration du composé.

Le temps de rétention donne une indication sur l'identité d'un composé et l'aire sous la courbe permet de quantifier le composé en question.

2) Les différents types de chromatographie

a) La chromatographie ionique

Elle sert comme son nom l'indique à séparer les ions. La phase stationnaire est une résine chargée négativement pour retenir les cations ou positivement pour retenir les anions.

b) La chromatographie d'exclusion stérique

Elle sépare les molécules en fonction de leur taille. La phase stationnaire est un gel (= structure poreuse). Les molécules de petites tailles vont pénétrer dans les pores du gel et être retenues par ceux-ci au contraire des molécules plus volumineuses. Les molécules de grande taille sont donc peu retenues.

c) La chromatographie d'adsorption

La phase stationnaire est composée d'un adsorbant (généralement des particules de silice). Les molécules peuvent se fixer sur l'adsorbant en établissant des liaisons (dipôle-ion, dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals) avec ce dernier. Les particules de silice forment un réseau à travers lequel la phase mobile peut s'écouler. Les particules sont relativement poreuses ce qui permet d'augmenter le volume accessible à la phase mobile. On dit que la chromatographie d'adsorption est un phénomène de surface.

Les particules de silice sont polaires. Elles interagissent principalement avec les composés de même polarité : les composés polaires sont donc plus retenus que les composés apolaires. Pour permettre la rétention des composés par la phase stationnaire, la phase mobile utilisée doit être apolaire. En effet, une phase mobile polaire (ex : eau, ...) entraînerait tous les composés en même temps. Ceux-ci n'auraient pas la possibilité d'interagir avec la phase stationnaire puisqu'ils présenteraient une affinité plus forte pour la phase mobile.

On parle de chromatographie liquide en phase normale lorsqu'on est en présence de cette configuration de phases (phase stationnaire polaire et phase mobile apolaire).

d) La chromatographie de partage

La chromatographie de partage consiste à greffer des groupements sur les particules de silice afin d'améliorer les performances. Si la polarité des phases est respectée en comparaison à la chromatographie d'adsorption on parle de chromatographie de partage en phase normale.

Si au contraire la polarité est inversée (= phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire) on parle de chromatographie de partage à polarité de phases inversée. Ce dernier cas de figure donne actuellement les meilleures performances.

Au fil des années le diamètre des particules de silice a diminué. En effet, plus le diamètre est petit, plus la surface d'échange augmente et plus il y a d'interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les composés sont donc retenus plus efficacement. Cependant la loi de Darcy démontre que cette diminution du diamètre des particules est accompagnée d'une augmentation de la pression nécessaire à l'écoulement de la phase mobile :

$$\Delta P = \frac{\eta \times u \times L}{k_0 \times dp^2}$$

- ΔP : pression
- η : viscosité
- u : débit
- L : longueur colonne
- k_0 :
- dp : diamètres des particules

Le terme d'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est employé pour designer cette configuration.

3) Organisation d'une chaîne HPLC

L'organisation d'une chaîne HPLC est représentée dans la figure 2 ci-dessous.

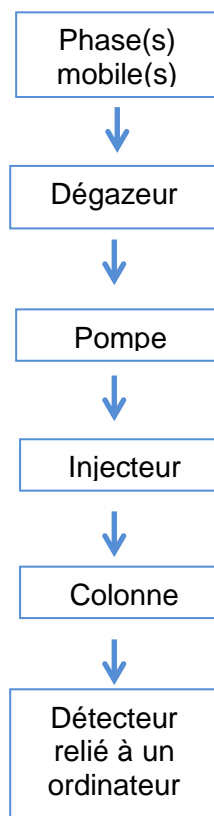


Figure 2 : Organisation d'une chaîne HPLC

a) Les phases mobiles

Selon les composés à séparer on choisit des solvants de force éluante appropriée. La force éluante est directement reliée à la polarité de la molécule. En chromatographie liquide en phase normale, les solvants polaires ont une force éluante importante. En effet, seul les solvants polaires sont capables de décrocher des molécules polaires fixés sur la phase stationnaire qui est elle-même polaire. En chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversée, plus un solvant est apolaire plus la force éluante est importante (cf. figure 3)

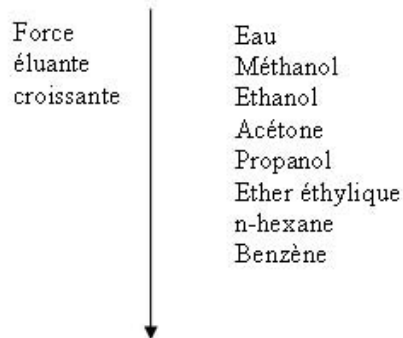
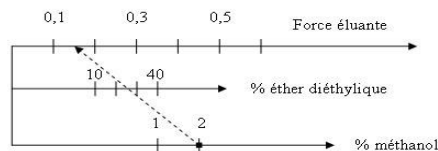


Figure 3 : force éluante des principaux solvants en chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversée

Les phases mobiles sont rarement constituées de solvants purs. Ce sont généralement des mélanges de solvants optimisés par des tests successifs vis-à-vis des composés à séparer. Des abaques (cf. figure 4) permettent de calculer la force éluante d'un mélange binaire.



Abaque donné à des fins pédagogiques : les valeurs indiquées sont arbitraires

Figure 4 : abaque de calcul de la force éluante d'un mélange binaire

Les solvants doivent être miscibles entre eux et compatibles avec le système de détection. Des tables de miscibilité de solvants (cf. figure 5) permettent de prévoir la pertinence d'un mélange.

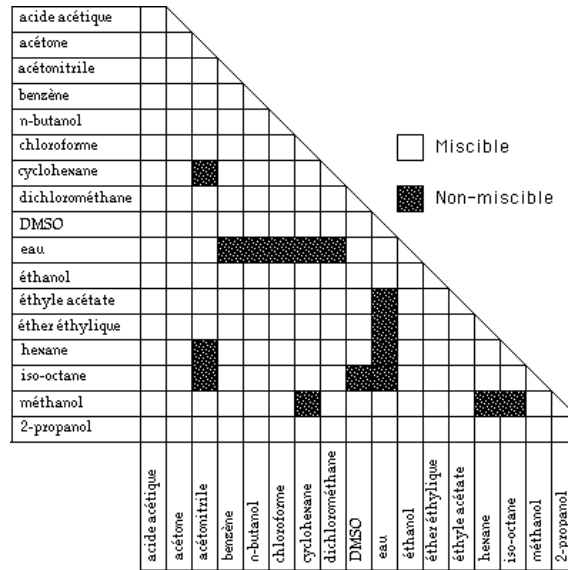


Figure 5 : table de miscibilité des solvants

On peut distribuer la phase mobile selon deux modes.

Le mode isocratique : on utilise un seul éluant au cours du temps, par exemple un mélange eau/acétonitrile (70/30).

Le mode gradient d'éluion : on fait varier la proportion des solvants entre eux au cours du temps. On peut commencer par une faible proportion en solvant organique puis augmenter celle-ci au cours du temps jusqu'à arriver à 100%.

Grâce au gradient d'éluion, on peut séparer des pics co-élus en mode isocratique ou bien réduire la durée d'analyse. La figure 6 ci-dessous représente la séparation de deux composés en mode isocratique (en chromatographie liquide à polarité de phases inversée). On remarque que 13 minutes séparent les deux composés : le temps d'analyse est long.

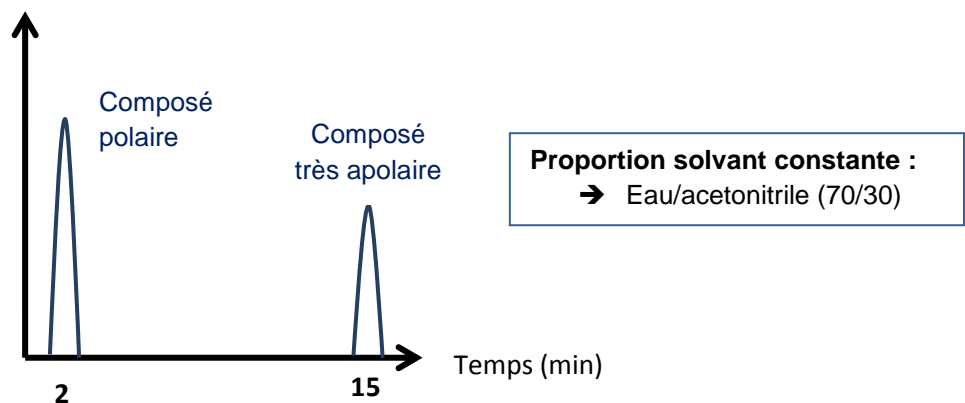


Figure 6 : exemple de séparation de deux composés en mode isocratique

Il est possible de diminuer ce temps en utilisant le mode gradient d'élution (cf. figure 7).

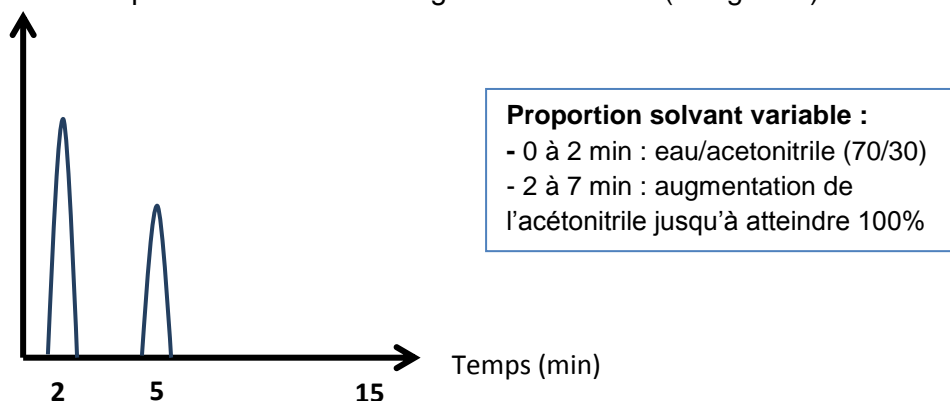


Figure 7 : exemple de séparation de deux composés en mode gradient d'élution

Le fait d'augmenter la proportion en solvant organique au cours du temps permet de diminuer le temps de rétention des composés apolaires et donc de réduire le temps d'analyse.

b) Le dégazeur

La présence de gaz (N_2 , O_2 , CO_2 ,...) dans les solvants peut créer des bulles d'air dans les tubulures servant à véhiculer la phase mobile. Ces bulles d'air peuvent désamorcer les pompes qui poussent les phases mobiles dans ces tubulures.

De plus, la formation de bulles augmente considérablement le bruit de fond et diminuerait la durée de vie des colonnes en dégradant la phase stationnaire.

Les chaînes HPLC contiennent un dégazeur en ligne sous-vide. Il consiste à faire passer la phase mobile dans un tube poreux contenu dans une enceinte sous-vide. Seul les gaz sont capables de s'échapper du tube.

NB :

- Il est aussi possible de dégazer les solvants par ultrasons ou par barbotage avec un gaz inerte. Leur efficacité est cependant moindre comparée au dégazeur en ligne sous-vide.
- Les solvants utilisés sont préalablement filtrés. Ils sont donc exempts de particules pouvant contaminer les phases mobiles.

c) Les pompes

Les pompes sont utilisées pour forcer le passage de la phase mobile dans la colonne dont la phase stationnaire est très compacte. On doit donc maintenir une pression élevée en amont de l'injecteur (cf. 9) pour permettre le passage de la phase mobile dans la colonne.

Les pompes doivent assurer un débit constant et non pulsé et résister à la corrosion. Elles fonctionnent grâce à un système de pistons alternatif : le mouvement de va et vient des pistons permet de pomper le solvant.

Dans certains types de pompes (cf. figure 8), lorsque l'écoulement est pulsé un amortisseur peut être intercalé entre la pompe et l'injecteur afin de réguler le débit.

Les pompes sont aussi associées à une chambre de mélange. Un système de valves électromagnétiques permet de réguler la proportion de chaque solvant entrant dans la chambre de mélange et donc de réaliser un gradient d'élution si nécessaire.

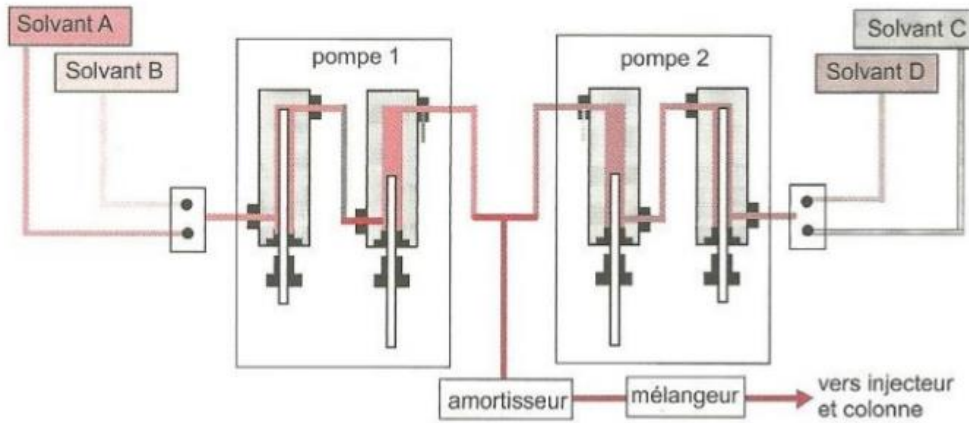
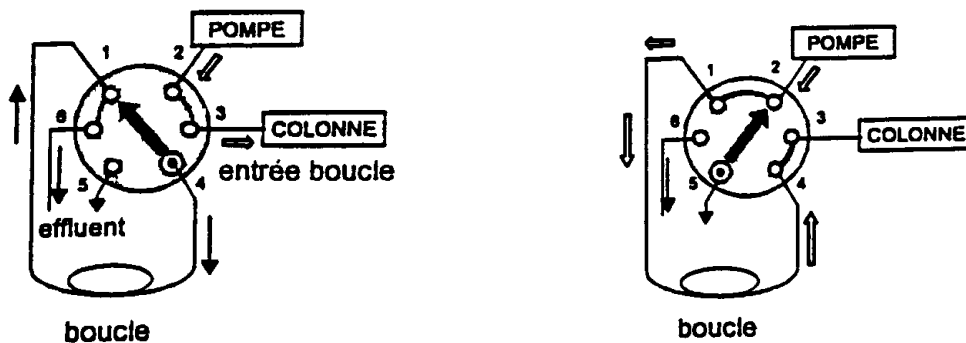


Figure 8 : exemple de pompes HPLC

d) L'injecteur

L'échantillon doit être inséré dans le flux de phase mobile le plus rapidement possible afin de perturber le moins possible le débit et la pression. L'injecteur utilisé en HPLC est une vanne haute pression qui comme son nom l'indique est capable de résister à des pressions élevées. Cette vanne possède un système de boucle et fonctionne en deux phases : une phase de chargement et une phase d'injection (cf. figure 9).



Phase de chargement :

- La phase mobile circule librement de la pompe vers la colonne
- L'échantillon est injecté dans la boucle (en 4)
- Le surplus est évacué (en 6)

Phase d'injection :

- La phase mobile passe dans la boucle et entraîne l'échantillon jusqu'à la colonne

Figure 9 : Vanne d'injection en phase de chargement et d'injection

La reproductibilité de l'injection n'est bonne, en boucle pleine, que si la boucle est correctement remplie lors de la phase de chargement. Pour s'assurer de son bon remplissage, il est nécessaire d'injecter deux à trois fois le volume de la boucle.

Le passage de la phase mobile dans la boucle change le sens de circulation de l'échantillon dans celle-ci ce qui permet de limiter le phénomène de diffusion des molécules. En effet, cela permet de regrouper les molécules qui s'étaient dispersées pendant la phase de chargement et de les injecter toutes en même temps.

e) Colonne

Elle se présente sous la forme d'un cylindre creux en acier. Il existe un grand nombre de greffage possible sur les particules de silice. On choisit le greffage en fonction des composés à séparer. En théorie, le greffage doit être proche de ces derniers.

La granulométrie des colonnes peut être très variée que soit en termes de diamètre de particules, diamètre de colonne et longueur de colonne. Cette granulométrie peut impacter fortement sur la séparation des composés.

Les colonnes peuvent être précédées d'une pré-colonne afin de limiter la baisse de performance de la colonne. En effet, la pré-colonne peut fixer des poussières (phénomène physique) ou des composés (phénomènes physico-chimiques) qui auraient pu se fixer de manière irréversible dans la colonne. On conseille généralement de choisir une pré-colonne ayant exactement la même phase stationnaire que la colonne

f) Détecteur

Les chaînes HPLC peuvent être couplées à plusieurs types de détecteur :

- Détecteur UV à barrette de diodes
- Détecteur d'indice de réfraction
- Détecteur de fluorescence
- Spectromètre de masse
-

Dans le cadre du développement du screening nous avons travaillé avec un spectromètre de masse. Seul ce détecteur est développé ici.

II) 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, l'échantillon à analyser est conduit par un capillaire dans une aiguille d'ESI qui se situe dans la chambre d'ionisation. Un champ électrique est appliqué sur cette aiguille ce qui provoque une accumulation de charges dans le liquide de l'échantillon. Le champ électrique est obtenu 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. L'aiguille pulvérise (à l'aide d'un gaz de nébulisation) l'échantillon en fines gouttelettes qui sont donc électriquement chargées à leur surface. 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 petites gouttelettes contenant un unique ion. Cet ion est éjecté par répulsion électrostatique dans la phase gazeuse. Un système de lentilles permet de le focaliser et de faciliter son entrée dans l'analyseur. Le principe de fonctionnement de l'ESI est schématisé dans la figure 10.

L'intérêt de l'ESI est qu'elle permet de produire des ions pseudo-moléculaires à de faibles tensions d'orifice. Le fait de visualiser les ions pseudo-moléculaires est une information importante pour l'identification d'une molécule. A de plus fortes tensions d'orifice il devient impossible de visualiser les ions pseudo-moléculaires, la fragmentation augmentant avec la tension d'orifice.

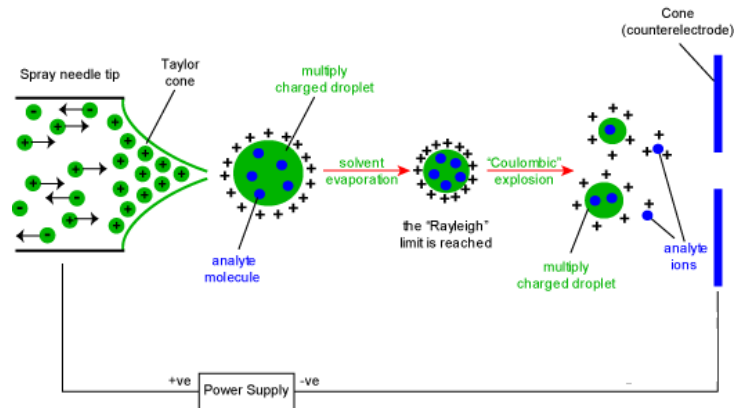


Figure 10 : principe d'une ESI

Exemple d'ions pseudo-moléculaires en ESI - :

Les molécules possédant des groupements OH vont avoir tendance à perdre le proton pour devenir O⁻. L'ion formé aura donc une masse M-H où M est la masse de la molécule.

Exemple d'ions pseudo-moléculaire en ESI + :

Les molécules possédant des groupements NH₃ vont avoir tendance à capter un proton pour devenir NH₄⁺. La masse de l'ion formé sera donc M+H.

Des ions tels que [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺ peuvent aussi se former, les ions ammonium et sodium étant apportés par la phase mobile.

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 11).

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

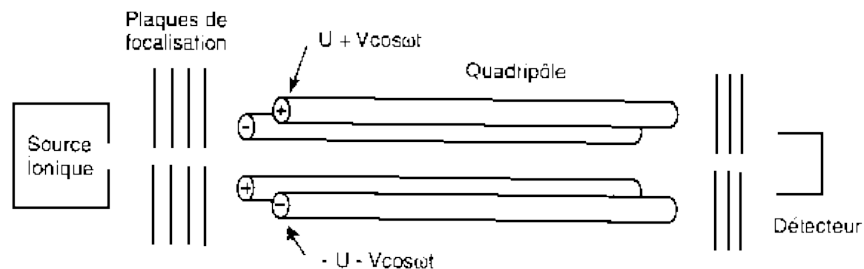


Figure 11 : schéma du principe d'un analyseur quadripolaire

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 sont captés par les électrodes. En faisant varier les tensions U et V, cet intervalle de valeur varie aussi.

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. Cette dernière approche est utilisée en application quantitative.

c) Le détecteur : dynode de conversion et multiplicateur d'électron

Les ions traversant le quadripôle vont frapper l'électrode contenue dans la dynode de conversion. Des ions et des électrons secondaires sont alors libérés. Ces électrons sont amplifiés par le multiplicateur d'électrons puis 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.

3) Le spectromètre de masse de type triple quadripôle

a) Organisation

Le spectromètre de masse en tandem utilisé pour le développement du screening est de type triple quadripôle. Son organisation est représentée dans la figure 12 ci-dessous :

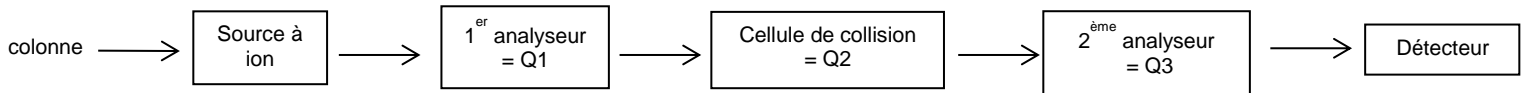


Figure 12 : organisation d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle

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.

En spectrométrie de masse simple, les ions produits dans la source sont séparés par l'analyseur avant d'arriver au détecteur. Ils ne sont pas fragmentés.

La spectrométrie de masse en tandem consiste à effectuer dans un premier temps une MS simple (= MS¹). Sur la base du spectre de masse obtenu lors de la MS¹, un ion est sélectionné en Q1 puis fragmenté en Q2. Les fragments sont ensuite analysés par le deuxième analyseur Q3. Cet ensemble d'évènement constitue la MS².

Les ions sont fragmentés dans la cellule de collision en percutant en gaz inerte. Ils percutent le gaz avec une certaine énergie de collision (CE) qu'on peut faire varier selon les besoins.

En fonction des informations recherchées, les quadripôles peuvent être réglés selon différents mode de balayage.

b) Les principaux modes de balayage d'un triple quadripôle

b.1) Mode full scan (spectre complet)

Les quadripôles ne jouent pas un rôle de filtre : ils laissent passer tous les ions produits dans la source. On analyse donc l'ensemble des rapports m/z comme illustré sur la figure 13.

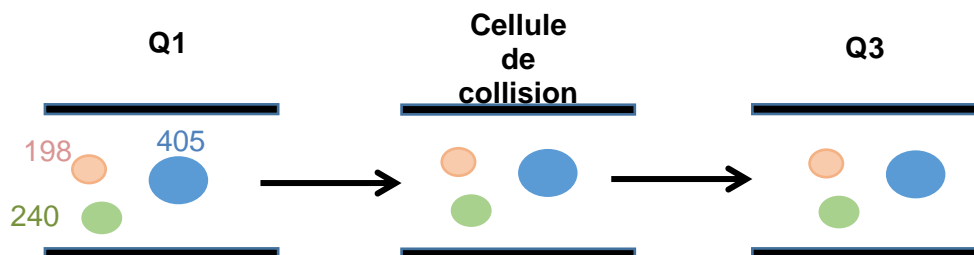


Figure 13 : mode full scan

b.2) 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 14.

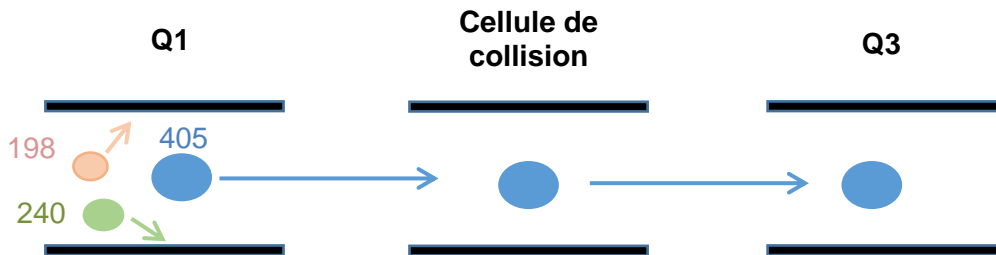


Figure 14 : mode SIM

b.3) Product ion scan (PIS)

Il 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 analysés dans le 3^{ème} quadripôle en mode full scan (cf. figure 15).

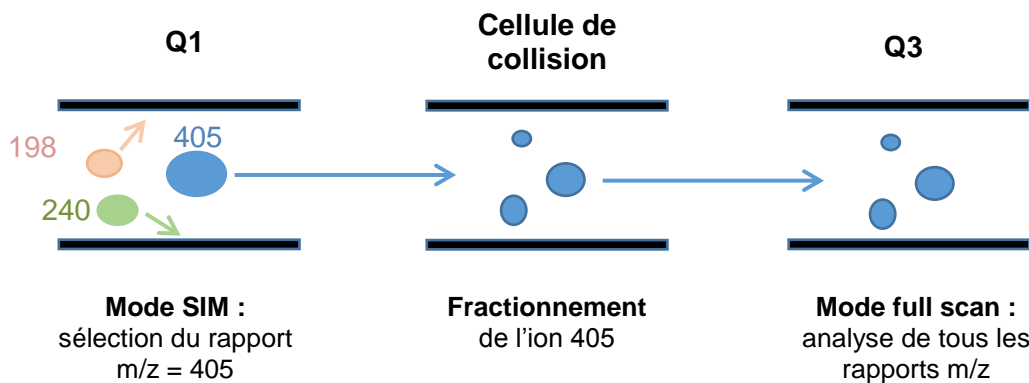


Figure 15 : mode Product Ion Scan

Ces modes de balayage peuvent être combinés de différentes manières pour créer différentes méthodes d'acquisition.

III) 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 et des méthodes colorimétriques les barbituriques. Et ainsi de suite.

Ces tests peuvent donc être utilisés dans un cadre médico-légal (cause d'un décès, éthanolémie, soumission chimique,...) mais aussi dans les cas d'urgence toxicologique. Lors d'une suspicion d'intoxication, 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, méthanol,...). Leur principal défaut est leur manque de spécificité.

Il existe également des techniques immunologiques permettant un diagnostic de classe (benzodiazépines, antidépresseur tricyclique,...), voire de quantifier des médicaments à risque toxique (phénytoïne, paracétamol, digoxine, méthotrexate,...) (Bernard Capolaghi et al.).

A ces techniques sont associées des techniques chromatographiques (GC et LC), associées à des détecteurs UV à barrette de diodes ou à la spectrométrie de masse, permettant de quantifier un nombre important de toxiques. Cependant ces techniques sont ciblées : on ne trouve que ce que l'on cherche.

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 70-80. La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse simple ou en tandem (LC-MS/MS) est apparue un peu plus tardivement, vers la fin du siècle.

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). 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 manquer 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 (Willy E. Lambert et al.).

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 (Gautier Szymanski)

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, comme pour la LC-DAD, pour l'identification. 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...)

A l'époque, la GC-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 est qu'elle est donc principalement adaptée aux composés volatiles (généralement molécules < 500 Da), non thermosensibles et plutôt apolaires.

Il est 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), nécessite du personnel qualifié et peut générer des artefacts. La présence des composés dérivés et des artefacts peut compliquer l'identification des composés.

Bien entendu, les problèmes de co-élution de composés sont également présents (Tenczer et al.).

4) LC-MS

La LC-MS s'est développée, il y a une vingtaine d'année, 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 (Lutz Alder et al.). Puis, l'utilisation de la spectrométrie de masse 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, ou en tandem, a été de pouvoir détecter des composés non analysables par GC-MS. Il est rapidement apparu qu'elle permettait de détecter un très large panel de molécules que ce soit en terme 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 (Michael Vogeser et al.).

Cependant, la fragmentation obtenue en CL-MS/MS est moins reproductible qu'en GC-MS. Celle-ci peut varier de manière non négligeable entre deux instruments notamment pour l'abondance relative des ions (W. Weinmann et al.). Une bibliothèque de référence doit donc être créée pour chaque appareil.

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 (Hans H. Maurer).

5) Expérience de Limoges pour le screening LC-MS

Le CHU de Limoges travaille sur la thématique du screening par LC-MS/MS depuis presque 20 ans et a développé plusieurs méthodes durant cette période. Ces travaux ont fait l'objet de multiples publications.

La première méthode de screening a été mise en place avec un système de LC-MS, c'est-à-dire un simple quadripôle (Venisse et al.). La méthode reposait sur une extraction en phase solide (Solid Phase extraction ; SPE) avec des cartouches Oasis HLB (Société Waters), une séparation à l'aide d'une colonne Nucleosid C18, 5 μm (150x1-mm i-d) (LC-Packings) et un couplage à un spectromètre de masse API 100 (Sciex). Cette méthode a ensuite été optimisée en développant une extraction par cartouches Oasis MCX (Waters) et séparation dans une colonne XTerra MS C18, 3,5 μm (150x2,1 mm) (Saint-Marcoux et al.). Cette méthode consistait en un full scan (de 100 à 1100 uma) avec une boucle d'acquisition comprenant les deux modes d'ionisation (positif et négatif) avec, pour chacun, 2 voltages différents de CID (Collision-Induced Dissociation) dans la source. Ces 2 voltages (20V et 80V) permettaient d'obtenir un spectre contenant l'ion pseudo-moléculaire (faible fragmentation à 20V) et un spectre contenant de nombreux fragments (forte fragmentation à 80V). Les deux spectres obtenus étaient ensuite combinés pour obtenir un spectre « hybride » contenant à la fois les fragments et l'ion pseudo-moléculaire. Une bibliothèque d'environ 1200 spectres avait été construite à l'époque.

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 intensité 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. 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. 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.

6) Conclusion

	CL-DAD	CG-MS	CL-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 inconvénients (voir tableau 1) et il est possible qu'une famille de molécules ne soit détectée que par une seule de ces méthodes.

Le travail de Saint-Marcoux et al. (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.

		chloralose, methotrexate, mycophenolic acid, noscapine, nitrendipine, simvastatine, tianeptine	8.3%	LC-MS 75.0%
GC-MS 65.5%	11.9%	acetaminophen (10) 38.1%	16.6%	HPLC-DAD 71.4%
8.3%	ibuprofen, levomepromazine, meprobamate, mianserin, phenobarbital (5), phenytoin	amino-7-flunitrazepam, amitriptyline, carbamazepine, chlordiazepoxide, clonazepam, dextropropoxyfen, diazepam, EDDP, fluoxetine, indomethacine, methadone, midazolam (2), nordiazepam (4), mianserin, niflumic acid, phenobarbital, zolpidem (2),		9.5%
ethosuximide, hydroxychloroquine, ibuprofen, lidocaine(2), meprobamate, valproic acid		acetaminophen (2), 7.1%		bromazepam (2), cefoxitin, chlordiazepoxide, nordiazepam, oxazepam (2), salicylic acid
		cyamemazine (2), nordiazepam (2)		

Figure 16 : pourcentage des molécules détectées par une, deux ou les trois méthodes de screening

Ainsi, la méthode « parfaite » permettant de détecter tous les xénobiotiques existant avec une spécificité et sensibilité infaillibles n'existe pas. C'est pourquoi il est souvent intéressant de combiner les trois méthodes afin de combler les lacunes et d'éviter de rendre à tort un faux négatif. Toutefois, la LC-MS/MS tend actuellement à devenir la référence en matière de screening.

Partie 2 :

Travaux personnels

A) Stratégie globale

Le travail s'est appuyé, dans une phase préliminaire, sur un **mélange de référence de 16 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 16 molécules ; le pari étant fait que si ces conditions étaient capables d'éluer ce panel de composés, elles pourraient être capables d'éluer la plupart des composés.

Ces 16 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 est possible de déterminer le temps de rétention des molécules. Pour cela, il suffit de faire passer la molécule d'intérêt dans la colonne chromatographique. Cette étape permet de **déterminer le temps de rétention des composés**. Il est également possible lors de cette étape d'obtenir des spectres de masse. Ces derniers seront enregistrés pour chaque molécule. En chromatographie liquide, il est primordial de travailler avec des substances de références afin de s'assurer du bon fonctionnement du système. Avant de commencer l'étape de détermination des temps de rétention il a donc été nécessaire d'introduire **plusieurs étalons internes** dans la méthode.

En ce qui concerne l'acquisition spectrale, il a fallu déterminer 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 VI de cette partie).*

Les développements se sont faits, dans un premier temps, à partir de solutions pures, sans extraction des molécules à partir d'échantillons biologiques (sang, urine, cheveux,...). L'étape suivante a été la mise au point d'une méthode d'extraction adaptée au screening. Celle-ci devait permettre d'extraire un maximum de composés (certainement plusieurs milliers de composés, à terme, dans la bibliothèque !) avec le meilleur rendement possible. Il va de soi qu'il s'agissait de trouver le meilleur compromis.

Tout ou partie de ces développements a été réalisé en collaboration avec l'équipe Shimadzu de Shimadzu Franc 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).

Ces différentes étapes du développement du screening sont résumées dans la figure 17 ci-dessous.

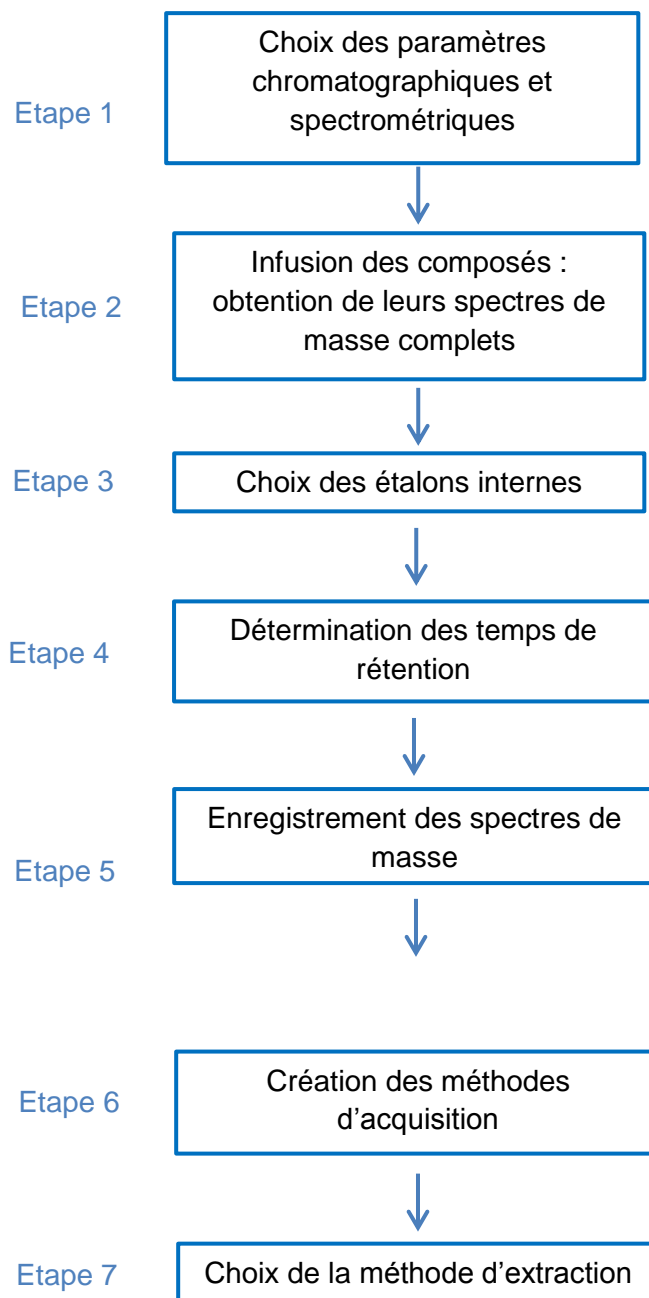


Figure 17 : étapes de développement de la méthode de screening

I) Système LC-MS/MS

Le système est composé 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 2.7 μ m 2.1x100mm.



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

7) 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
Amiodarone	Anti-arythmique de classe III	ESI +, masse moléculaire élevée
Aténolol	β -bloquant	ESI +
Benzoylecgonine	Stupéfiant (principal métabolite de la cocaïne)	ESI +, polaire
Brodifacoum	Rodenticide	ESI + ou -
Buprénorphine	Agoniste/antagoniste morphinique	ESI +, se fragmente peu
Citalopram	Antidépresseur (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine)	ESI +
Halopéridol	Neuroleptique	ESI +
Morphine	Antalgique	ESI +, polaire
Nordiazépam	Benzodiazépine	ESI +
THC-COOH	Stupéfiant (métabolite du cannabis)	ESI + ou -, très apolaire
Tramadol	Antalgique	ESI +, se fragmente peu
Amphétamine	Stupéfiant	ESI +, masse moléculaire faible
Acide 2 4-dichlorophenoxyacétique	Pesticide	ESI -
Acide salicylique	Antalgique	ESI -
Phénobarbital	Barbiturique	ESI -
Diméthylphosphate	Pesticide	ESI -, très polaire

Tableau 2 : mélange des 16 molécules de référence

Différentes phases stationnaires et phases mobiles, gradients, débit,... ont été testés afin de déterminer les conditions assurant une séparation optimale des 16 molécules du mélanges. 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	50°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	5
	2.00	40
	10.50	100
	13.00	100

Tableau 3 : paramètres chromatographiques retenus

8) Choix des paramètres de la source d'ionisation

Le mélange de 16 molécules a également été utilisé pour cette étape.

Les paramètres retenus sont résumés dans le tableau 4.

Interface temperature	300 °C
Interface voltage	4 kV
Heating gas	10 L/min
Drying gas	10 L/min
Nebulization gas	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 18 ci-dessous.

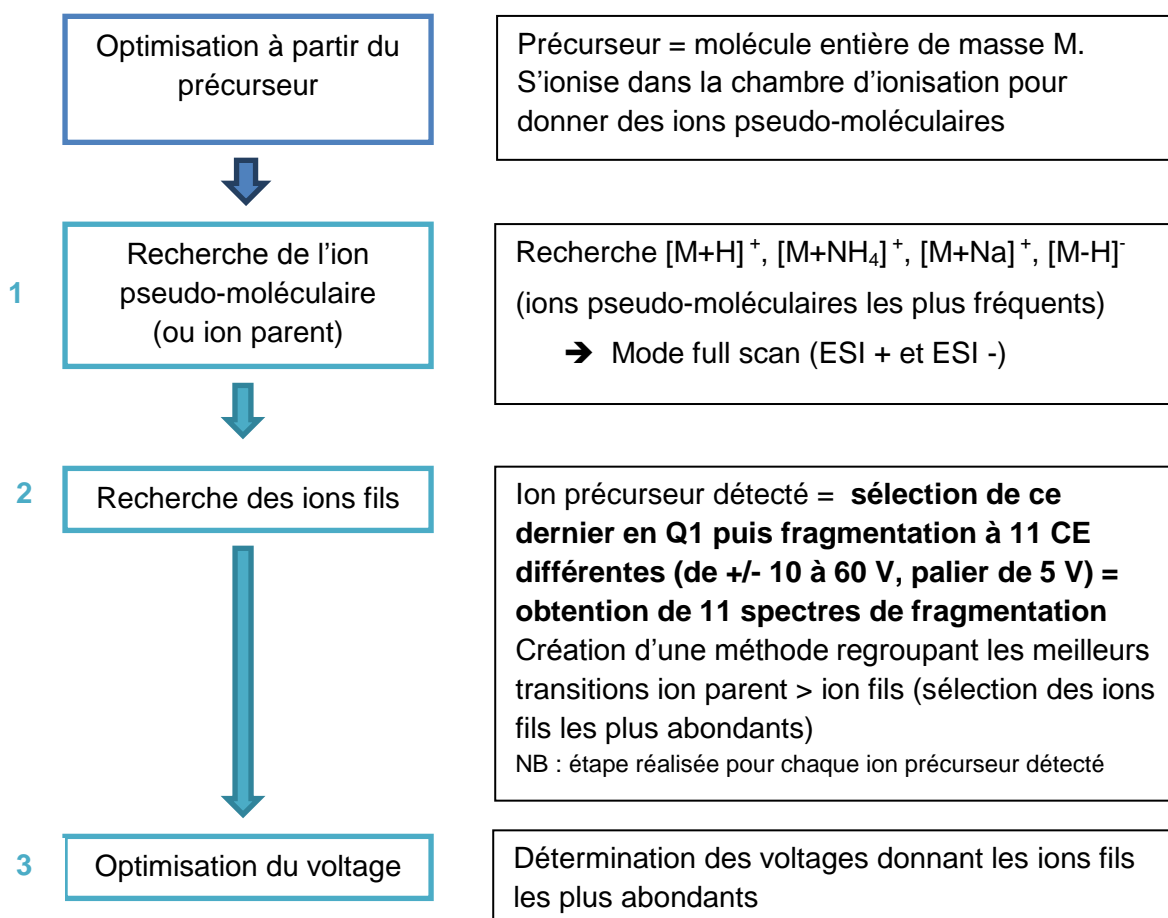


Figure 18 : principe d'une infusion à partir de l'ion pseudo-moléculaire

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	6	= sélection des 6 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 SelectPre (SelectionPrecurseur) 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 19 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 $[M-H]^-$.

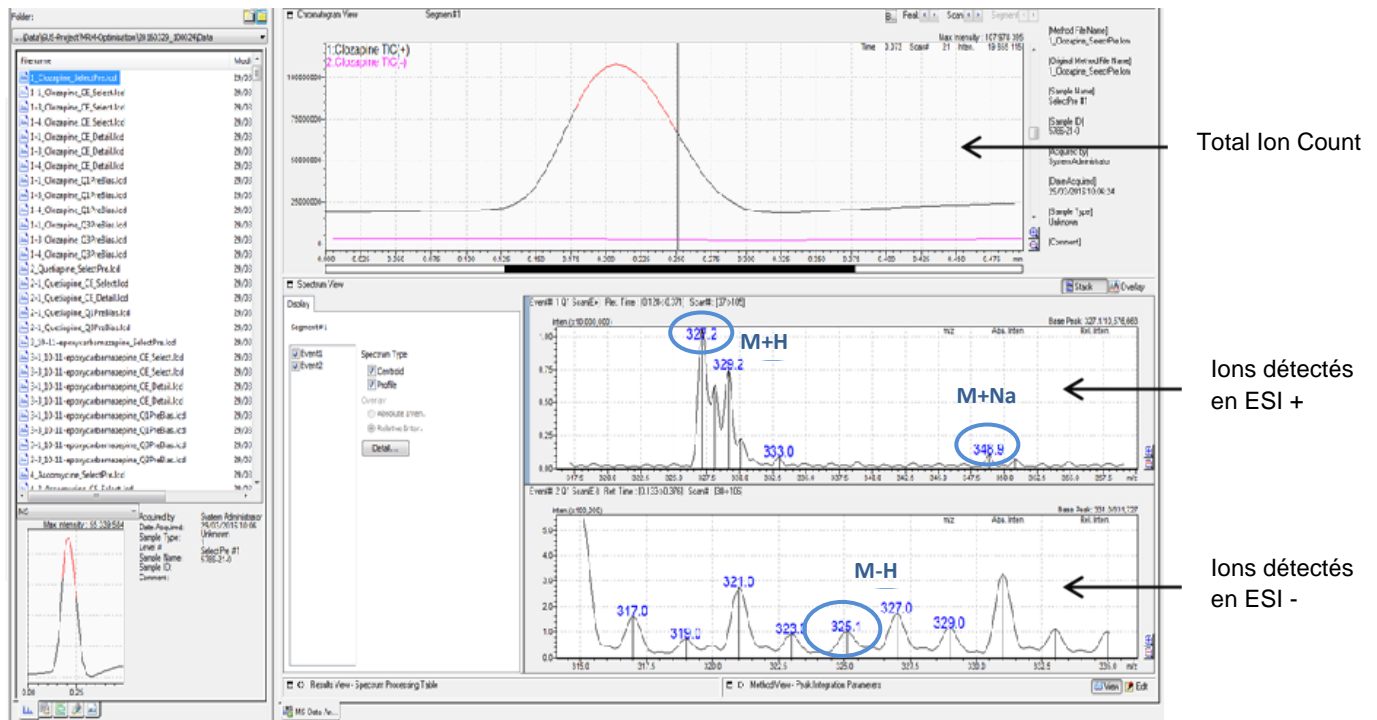
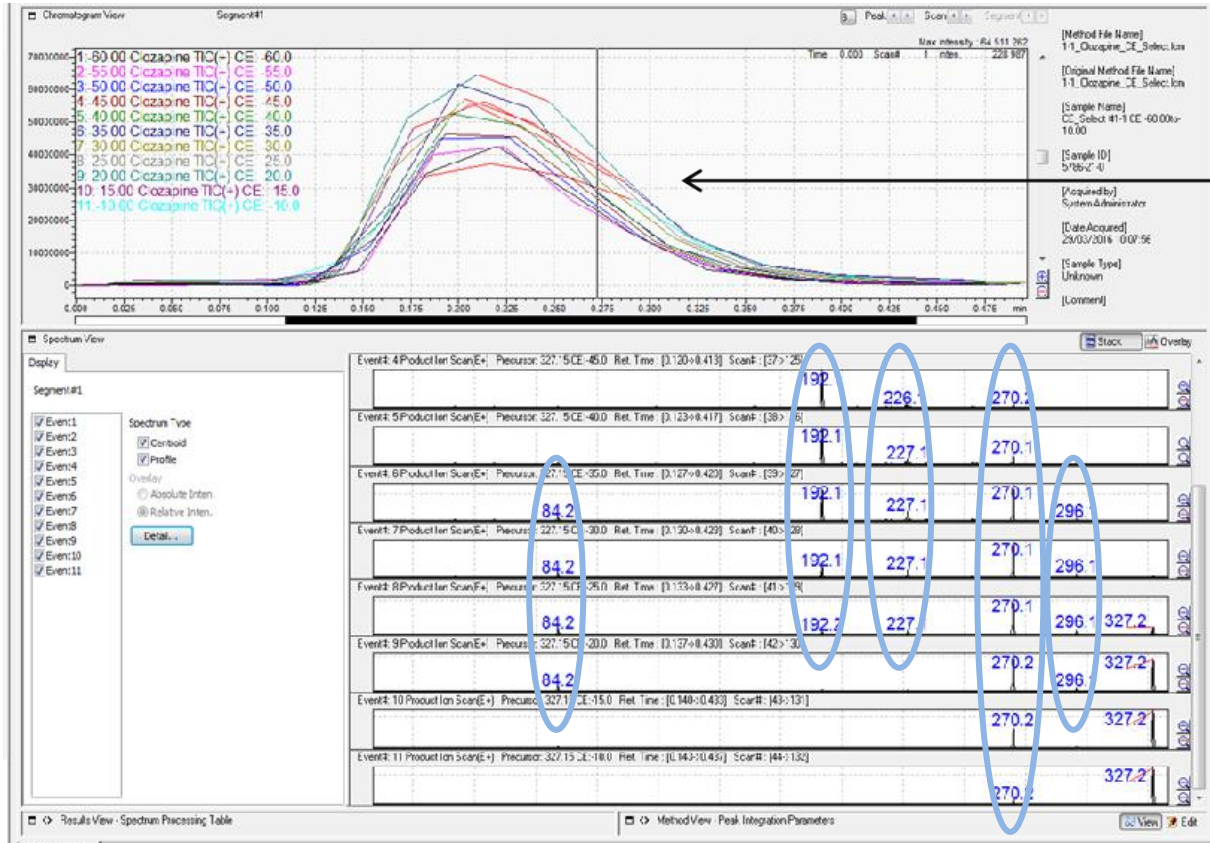


Figure 19 : SelectPre de la clozapine

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 20 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 fils 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 20 : CE_Select du $[M+H]^+$ de la clozapine

Au contraire, si on regarde le CE_Select du $[M+Na]^+$ (cf. figure 21) 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 $[M+Na]^+$.

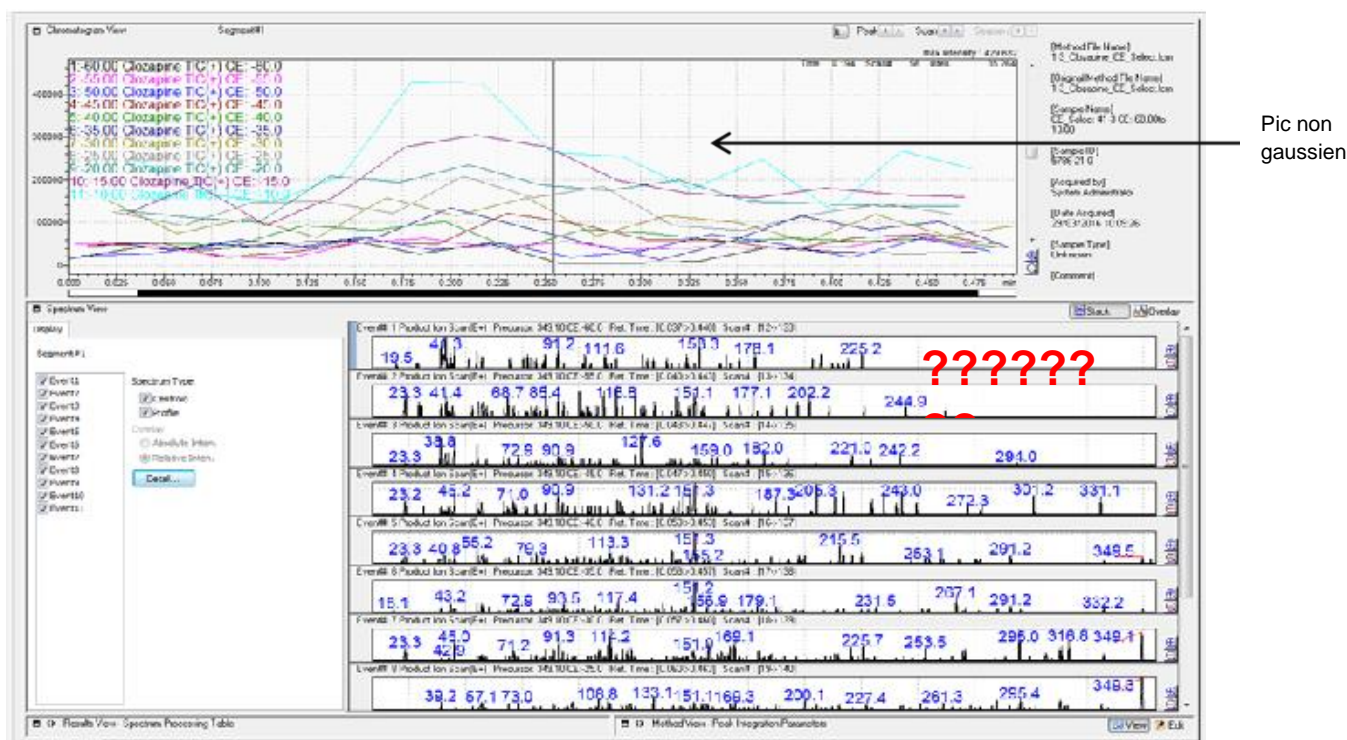


Figure 21 : CE_Select du $[M+Na]^+$ de la clozapine

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 dit « complets » puisqu'ils comprennent l'ensemble des fragments obtenus à toutes les énergies de collision.

Les spectres de masse enregistrés de cette manière ont ensuite servis de référence pour la détermination des temps de rétention lors de la phase suivant du développement. (voir paragraphe VII.4 comparaison à la bibliothèque de spectres de masse).

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 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 $\text{Cl}^{37} = 37,5\%$ 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 $[\text{M}+\text{H}^+]$ mais un $\text{M}+\text{H}+2$ (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 23 ci-dessous.

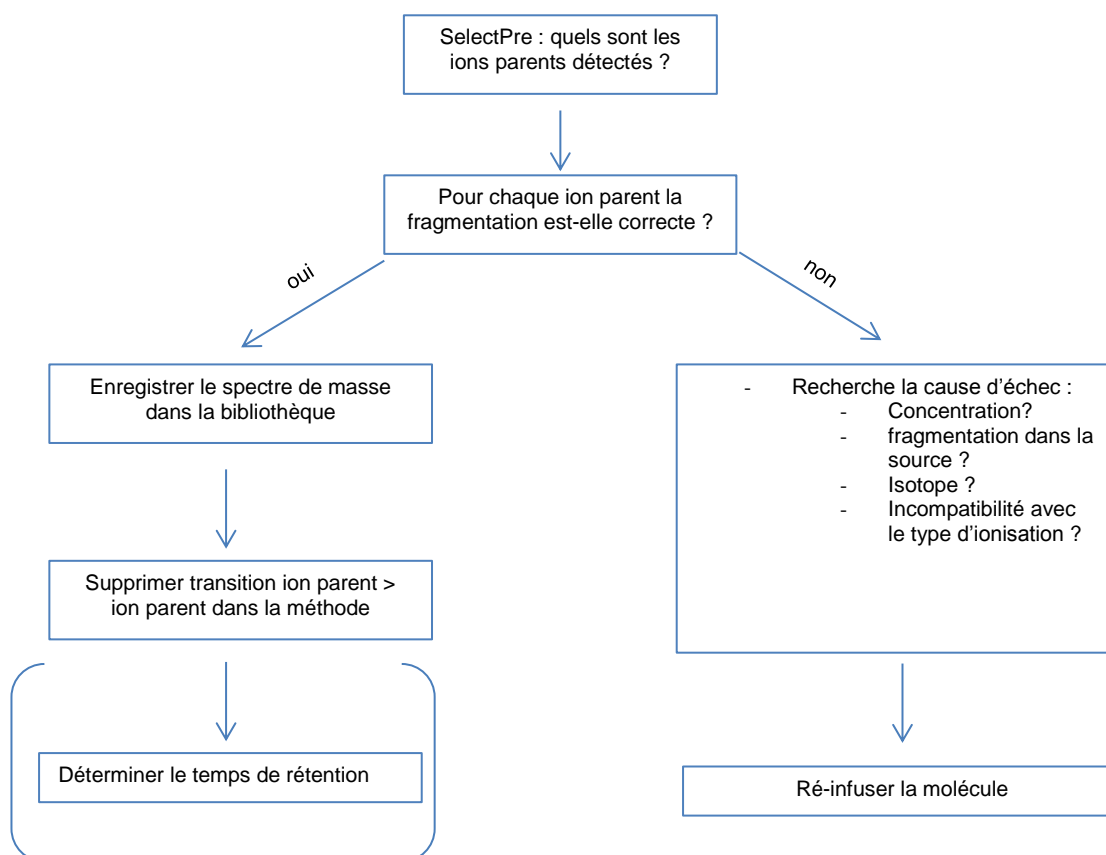


Figure 22 : organigramme décisionnel du traitement des résultats de l'infusion

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
- Etre 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.

Au départ, 12 étalons internes ont été sélectionnés selon les critères cités précédemment. Les **10 étalons internes** répondant le mieux ont été gardés. 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
Sotalol-D ₆	Anti-hypertenseur, beta-adrenergique antagoniste	3,17	ESI +
Morphine-D ₃	Analgésique opioïde	3,23	ESI +
Acetobutolol-D ₅	Anti-hypertenseur, beta-adrenergique antagoniste	4,24	ESI +
Benzoylcgonine-D ₃	Métabolite de la cocaïne	4,58	ESI +
Topiramate-D ₁₂	Anticonvulsivant	5,32	ESI +
Letrozole-D ₄	Agent antinéoplasique	6,9	ESI -
Desmethyflunitrazepam-D ₄	Benzodiazépine	7,05	ESI +
Mianserine-D ₃	Antidépresseur	7,08	ESI +
Clonazepam-D ₄	Benzodiazépine (anticonvulsivant)	7,35	ESI -
Diazepam-D ₅	Benzodiazépine (anxiolytique)	8,99	ESI +

Tableau 6 : caractéristiques des 10 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 dans un mélange). Ils contenaient :

- Des molécules à une concentration de 100 µg/L,
- sans aucun ion pseudo-moléculaire en commun pour éviter les interférences.
- Les dix 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 étaient enregistrés.

Les résultats se présentaient sous la forme suivante :

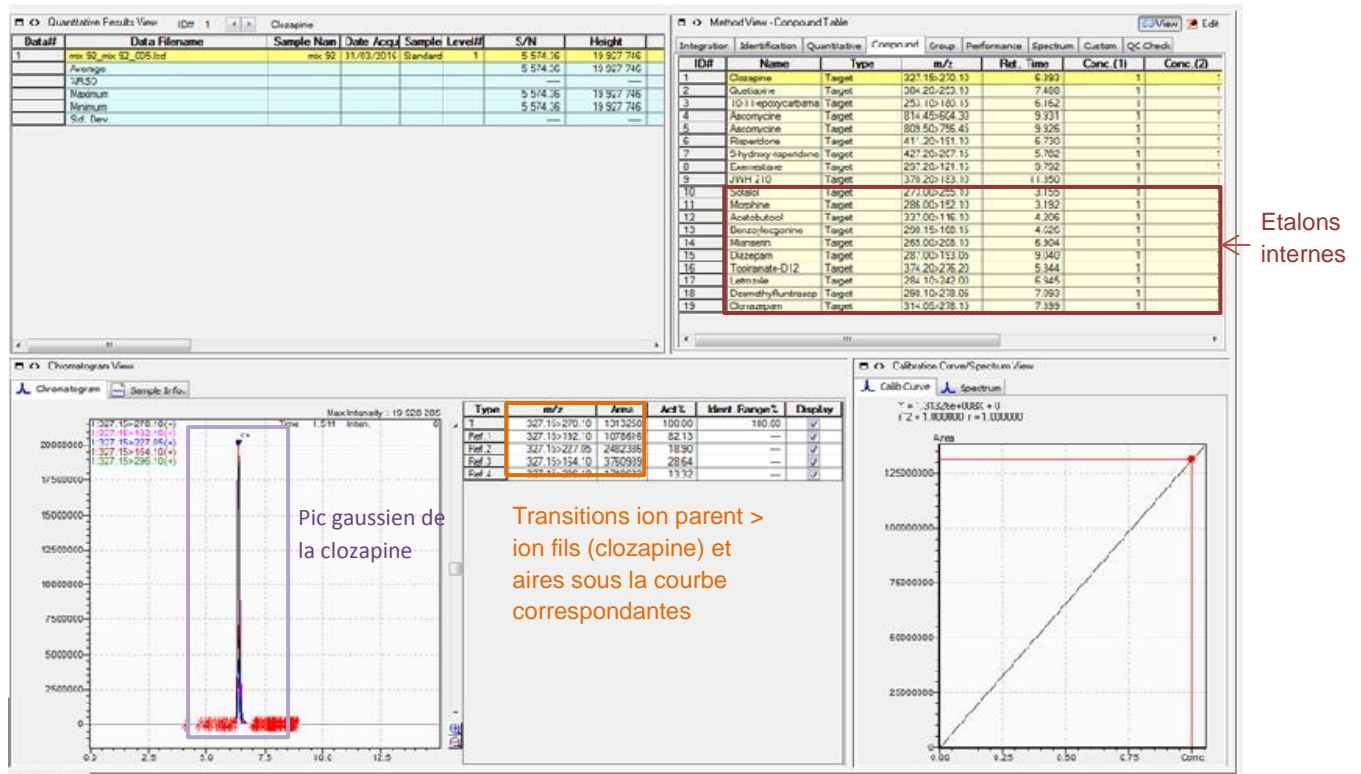


Figure 23 : chromatogramme de la clozapine

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. La figure 24 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 25), 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.

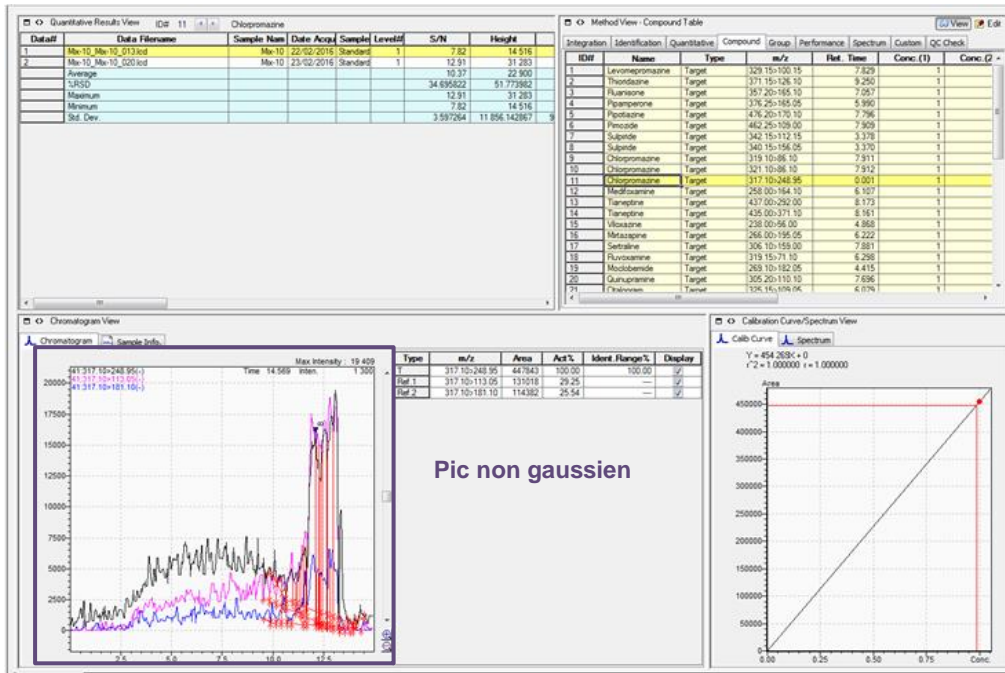


Figure 24 : chromatogramme de la chlorpromazine

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 devaient être basée sur leur aire sous la courbe.

La figure 26 synthétise la stratégie mise en place pour le traitement des résultats.

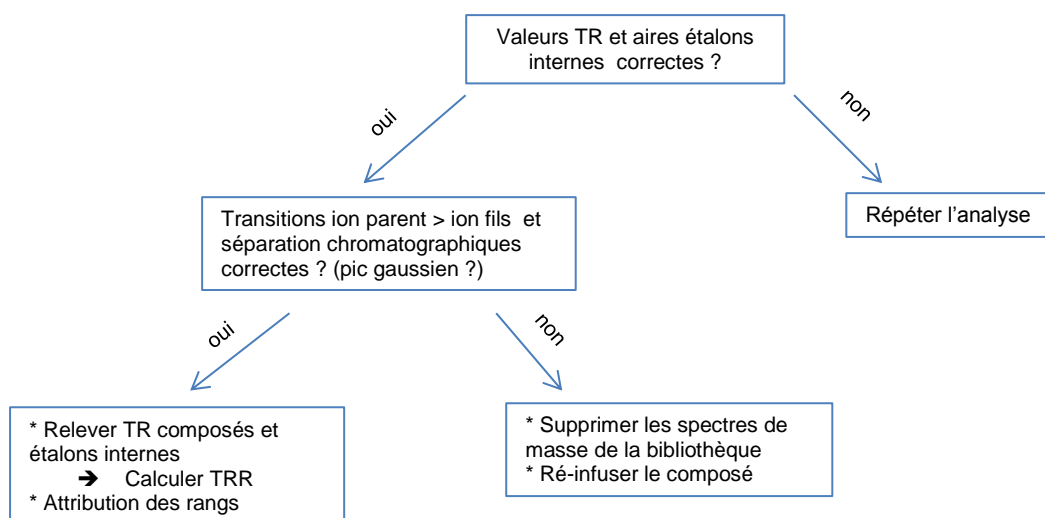


Figure 25 : organigramme décisionnel du traitement des résultats des temps de rétention

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 27 ci-dessous.

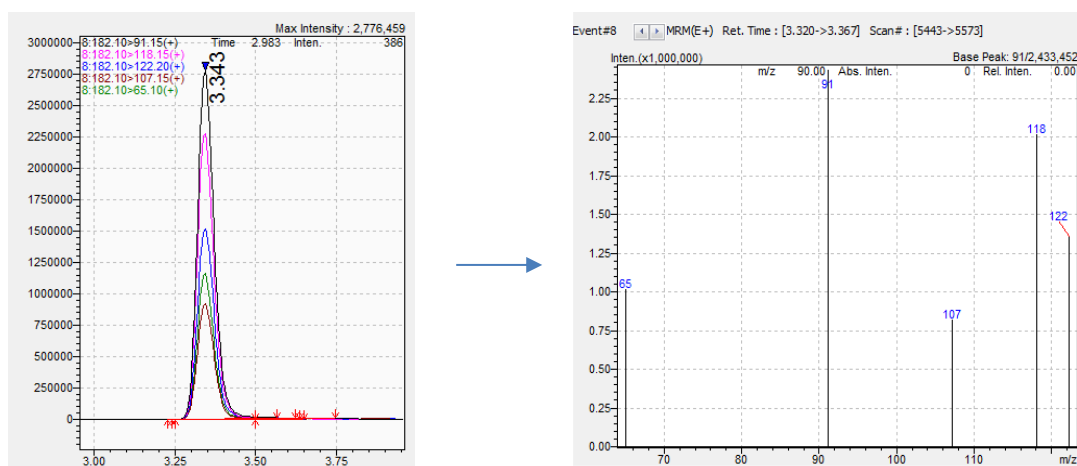


Figure 26 : construction d'un spectre de masse à partir des intensités d'un pic chromatographique

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 a de référence lors de la création de 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
- Une bibliothèque de spectre de masse regroupant les différentes transitions ion parent > ion fils 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 (=MS¹). Le spectre de masse acquis permet de visualiser les différents ions formés dans la source et leur intensité (cf. figure 28).

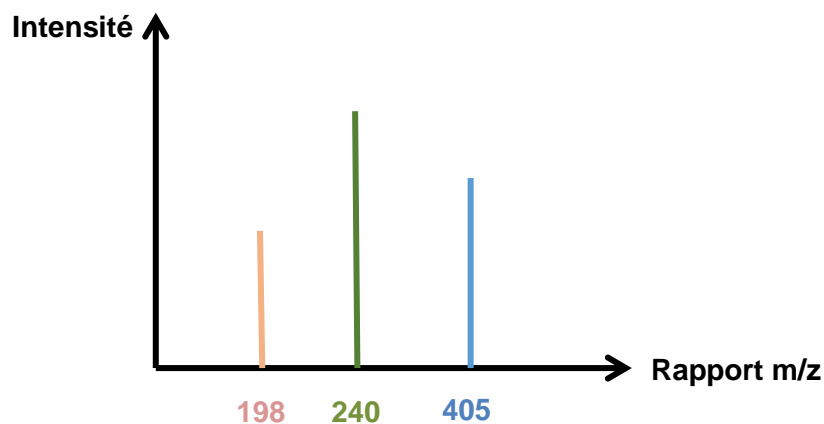


Figure 27 : intensité des ions en fonction de leur rapport m/z

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 (=MS²) à 3 énergies de collision différentes : une faible (+/- 10V), une moyenne (+/- 35V) et une forte (+/- 55 V). On obtient ainsi 3 spectres de masse complets avec théoriquement les informations suivantes :

- Énergie de collision faible : visualisation de l'ion pseudo-moléculaire
- Énergie de collision moyenne : visualisation des ions fils des molécules se fragmentant aisément
- Énergie 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 déclenchée. 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. Dans un premier temps, un mode SIM est appliqué, consistant à sélectionner un ion parent spécifique en Q1 puis à le fragmenter dans la cellule de collision. Un seul ion fils est analysé en Q3. Son principe est schématisé dans la figure 29.

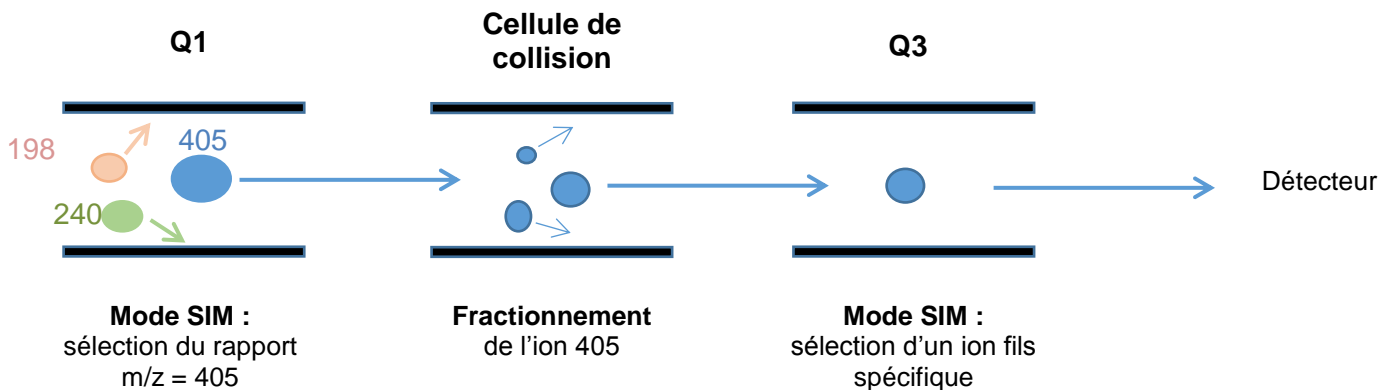


Figure 28 : principe d'une MRM

La relation ion parent > ion fils est appelée transition MRM. Il est possible de suivre plusieurs transitions MRM dans une même molécule.

NB : les méthodes créées pour la détermination des TR étaient donc des méthodes suivant des transitions 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).

9) 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 6) 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 recherche et les PIS ne 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 (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

La comparaison de ces quatre méthodes est schématisée dans la figure 30.

a) Aspects qualitatifs et quantitatifs

Le GUS est méthode purement qualitative : les trois spectres de masse obtenus lors d'une méthode GUS sont comparés aux spectres de masse de la bibliothèque.

Pour les méthodes MRM, MRM spectrum mode et MTS, il est possible de suivre les transitions MRM au cours du temps, « au fur et à mesure que la molécule sort de la colonne ». Les transitions MRM vont donc suivre un profil gaussien et les aires sous la courbe seront proportionnelles à la concentration de la molécule. Les méthodes MRM, MRM spectrum mode et MTS sont donc à la fois qualitatives et quantitatives.

b) Spécificité

Les spectres obtenus en GUS (PIS) sont par essence plus riches que ceux obtenus en MRM : tous les ions fils potentiels sont présents dès lors qu'ils sont détectés. Une méthode GUS est donc plus spécifique qu'une méthode MRM.

Une méthode MRM spectrum mode qui augmente significativement le nombre de transitions permet théoriquement de combler ce manque de spécificité.

Les méthodes MTS ont certainement la meilleure spécificité. Elle permet d'obtenir les PIS, comme pour le GUS, mais y ajoute l'information sur les transitions ions parents – ions fils.

c) Sensibilité

Les méthodes d'acquisition utilisant les MRM vont tenir compte de la présence de l'ion pseudo-moléculaire quelle que soit son intensité. Au contraire, l'acquisition en GUS dépend de l'intensité. En GUS, il est possible de détecter un ion pseudo-moléculaire dans le spectre de masse MS¹ sans que celui-ci ne soit retenu pour une acquisition MS². Une méthode MRM est donc plus sensible qu'une méthode GUS.

Dans le cadre d'une méthode MRM, MRM spectrum mode ou MTS on ne trouve cependant que les molécules comprises dans la méthode : « on ne trouve que ce qu'on le cherche ».

Le GUS permet, lui, de faire une recherche large des molécules, sans a priori. Il est d'ailleurs possible de trouver une molécule sans correspondance avec la bibliothèque (exemple de nouvelles substances dopantes non identifiées), puis de réaliser d'autres analyses pour l'identifier.

Chaque méthode a donc ses avantages et ses inconvénients. Il peut donc être intéressant de combiner certaines d'entre elle afin d'être le plus performant possible.

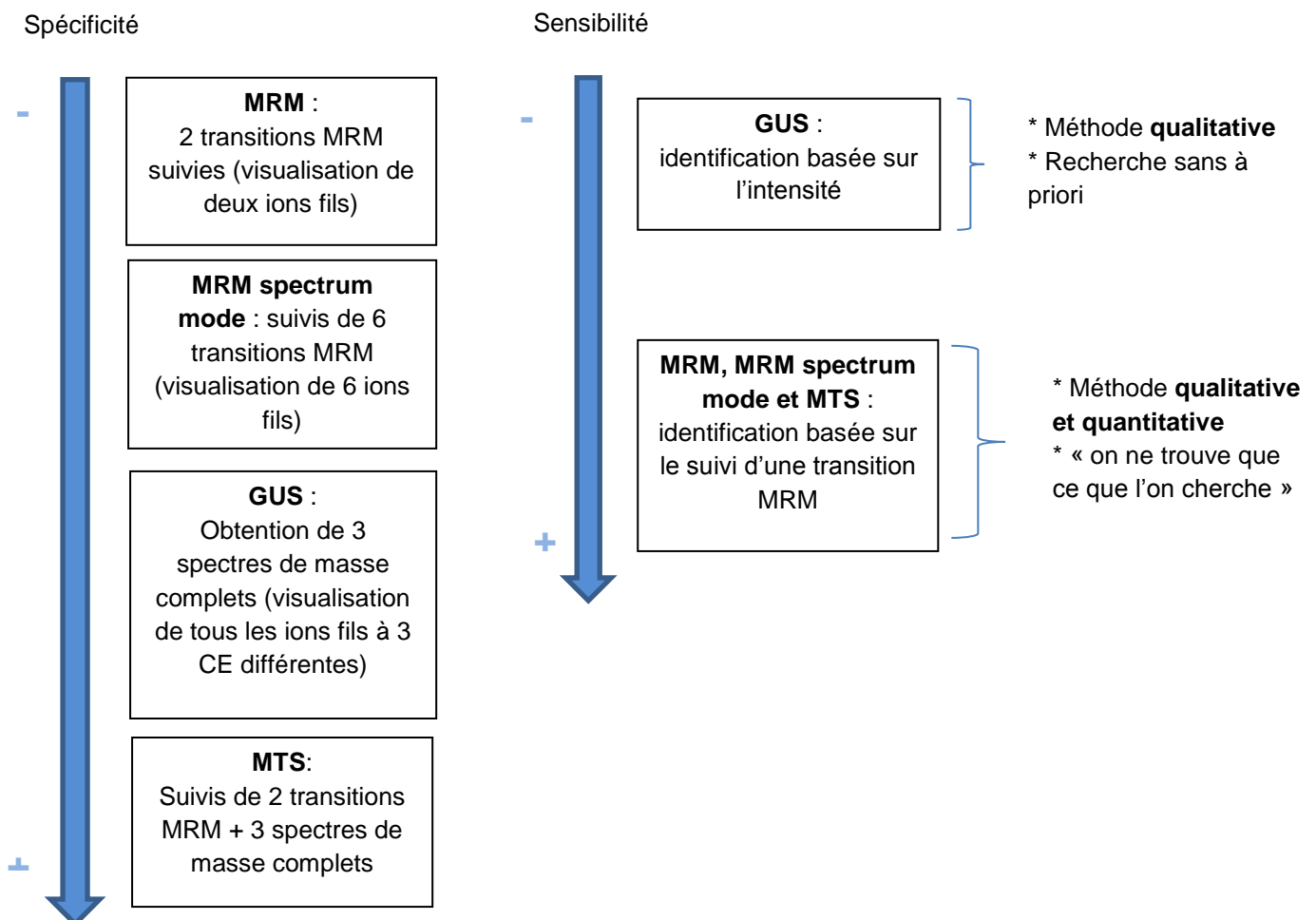


Figure 29 : comparaison des méthodes GUS, MRM, MRM-SpM et MTS

VIII) Choix de la méthode d'extraction

Fort de l'expérience du service, une méthode d'extraction basée sur les sels QuEChERS a été choisie (Dulaurent et al.). QuEChERS est un acronyme de Quick (rapide), Easy (facile), Cheap (peu cher), Effective (efficace), Ruggest (robuste) et Safe (sûr)). La méthode se veut donc rapide, robuste et pas cher !

Les sels QuEChERS permettent une extraction liquide/liquide des molécules partir de matrices biologiques telles que le sang, l'urine, le sérum ou le plasma.

Le principe de l'extraction est résumé dans la figure 31 ci-dessous.

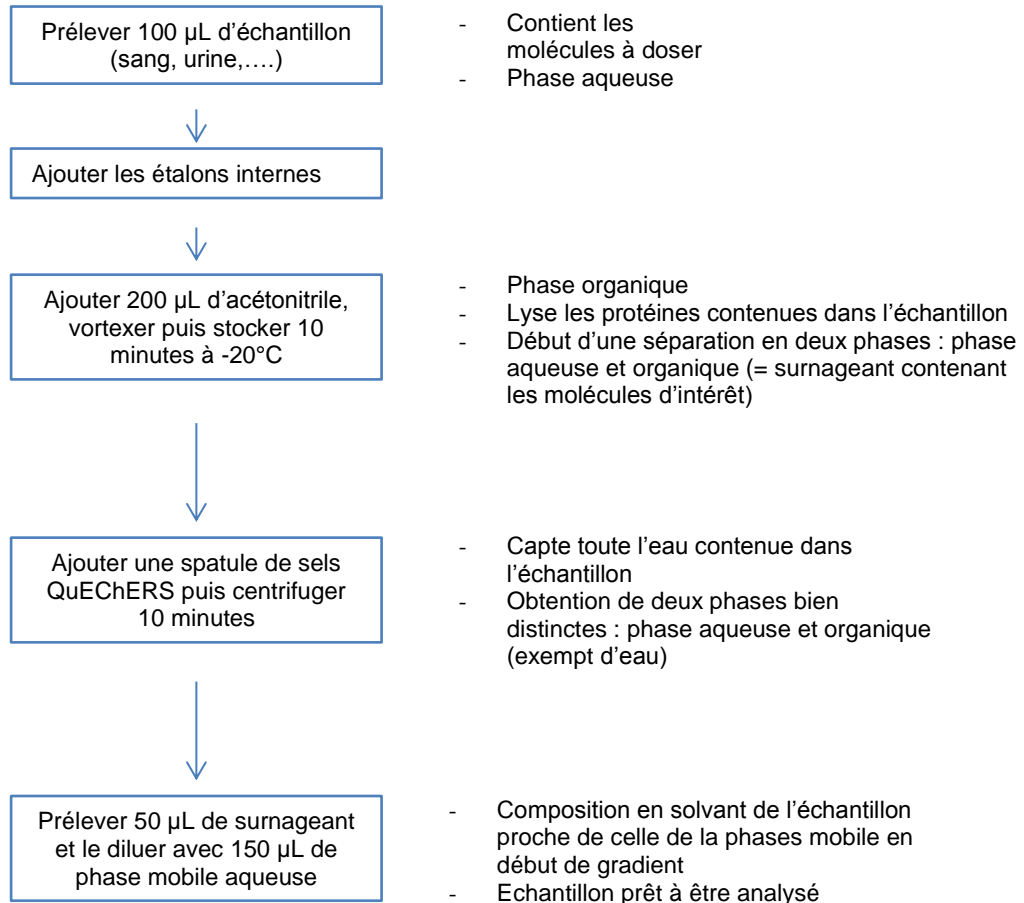


Figure 30 : principe de fonctionnement d'une extraction par les sels QuEChERS

B) Résultats

I) Construction d'une librairie de spectres de masse et de transitions MRM pour plus de 1 250 composés

Cette étude a fait l'objet de la rédaction d'une note d'application de la part de Shimadzu, présentée ci-dessous.

Une 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+NH₄]⁺, [M-H]⁻, etc....) aux deux mode d'ionisation (positif et négatif).

La librairie de spectres de masse 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 Chempider URL, l'InChi et l'InChIKey.

Cette base de données contient donc tous les outils nécessaires pour le développement de méthodes de screening ciblées ou non ciblées.

**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

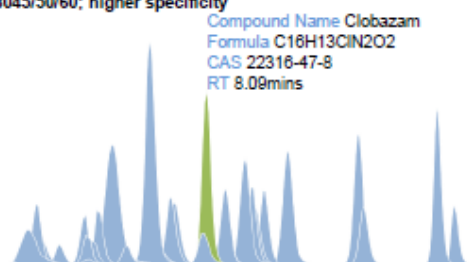


Figure. 1 Benzodiazepines targeted screening by MTS highlighting clobazam

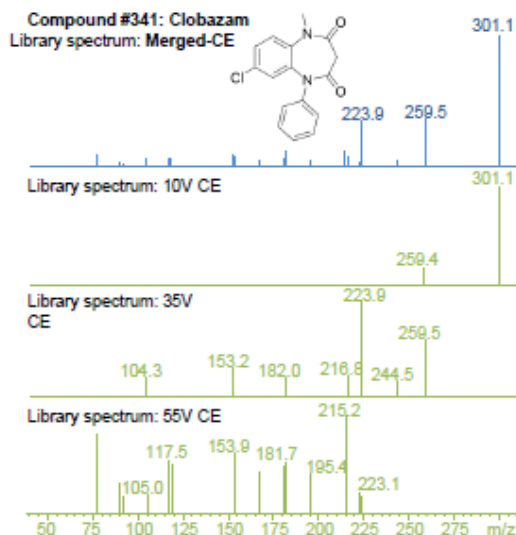


Fig 2 Each certified reference material was acquired with 3 different collision energies to generate an information rich merged-CE spectrum which can be used in library matching and compound verification.

**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-Methylenedioxypropyvalerone	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-pyrrolidinobutiophenone	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	C10H11ClN4	318.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
80	Acetazolamide	59-68-5	C4H8N4O3S2	278.16	ESI +	[M+H] ⁺	9
81	Acetyldigoxin	1111-39-3	C43H86O14	351.17	ESI +	[M+Na] ⁺	2
82	Acetyldigoxin	5355-48-8	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	C12H9ClN2O3	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	C14H20ClNO2	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	84-98-8	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	C8H12ClNO	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	C17H12Cl2N4O	358.04	ESI +	[M+H] ⁺	5
107	Alpidem	82628-01-5	C21H23Cl2N3O	403.12	ESI +	[M+H] ⁺	5
108	Alprazolam	28981-97-7	C17H13ClN4	308.08	ESI +	[M+H] ⁺	5
109	Alprazolam-D5	125229-61-0	C17H8ClN4D5	313.11	ESI +	[M+H] ⁺	2
110	Alprenolol	13655-52-2	C15H23NO2	249.17	ESI +	[M+H] ⁺	5
111	Althiazide	5588-16-9	C11H14ClN3O4S3	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	C28H42Cl2N4O2	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	C8H8ClN7O	229.05	ESI +	[M+H] ⁺	15
121	Amino-4-chloro-6-benzene-1,3-disulfonamide	121-30-2	C6H8ClN3O4S2	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	C20H25ClN2O5	408.15	ESI +	[M+H] ⁺	8
131	Amobarbital	57-43-2	C11H18N2O3	226.13	ESI -	[M-H] ⁻	3
132	Amodiaquine	86-42-0	C20H22ClN3O	355.15	ESI +	[M+H] ⁺	10
133	Amoxapine	14028-44-5	C17H16ClN3O	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	30360-66-6	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	2642-71-9	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	C15H17N5O6S2	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	55268-75-2	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	77-38-1	C14H11ClN2O4S	338.01	ESI -	[M-H]-	20
321	Chlorthion	500-28-7	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	C10H18N6S	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	Clofentezine	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	C19H18ClNO4	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	33871-46-4	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	58-72-4	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	C9H13ClN6	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	C11H14ClN5	251.09	ESI +	[M+H] ⁺	10
382	Cycloheximide	66-81-9	C15H23NO4	281.16	ESI +	[M+NH4] ⁺	10
383	Cyclothiazide	2259-96-3	C14H16ClN3O4S2	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	C18H34O3Sn	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	C15H18ClN3O	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	C12H12ClNO	221.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
407	Deltamethrin	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	C15H11ClN2O2	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	C15H10ClFN2O	288.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
416	Desalkylflurazepam-D4	1286430-01-0	C15H8ClFN2OD4	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	C18H21ClN2	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	C16H15Cl2N	291.06	ESI +	[M+H] ⁺	5
429	Desmethylsibutramine	259731-39-0	C16H24ClN	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] ⁰	4
433	Dexamethasone	50-02-2	C22H29FO5	392.20	ESI +	[M+Na] ⁺	5
434	Dexchlorpheniramine	25523-97-1	C16H19ClN2	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	C14H17ClNO4PS2	393.00	ESI +	[M+H] ⁺	15
440	Diazepam	439-14-5	C16H13ClN2O	284.07	ESI +	[M+H] ⁺	10
441	Diazepam-D5	65854-76-4	C16H8ClN2OD5	289.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
442	Diazinon	333-41-5	C12H21N2O3PS	304.10	ESI +	[M+H] ⁺	5
443	Diazoxide	364-98-7	C8H7ClN2O2S	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	170.96	ESI +	[M+H] ⁺	5
447	Dichlofluanid	1085-98-9	C9H11Cl2FN2O2S	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	Diethyldithiophosphate (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	Dimethyldithiophosphate (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	86230-04-4	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-H] ⁻	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-H] ⁻	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	40054-89-1	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-sulfoxide	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	114389-43-6	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	15686-81-0	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-H] ⁻	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	C12H4Cl2F8N4OS C12H4Cl2F8N4O2	435.94	ESI -	[M-H] ⁻	5
596	Fipronil sulfone	120068-36-2	S	451.93	ESI -	[M-H] ⁻	5
597	Flazasulfuron	104040-78-0	C13H12F3N5O5S	407.05	ESI +	[M+H] ⁺	5
598	Flecainide	54143-55-4	C17H20F8N2O3	414.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
599	Floccumafen	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	C18H8Cl2FN5O	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	C41H84O14	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	Isoprenphos	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	Levomopromazine	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	Norflouxetine	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	C18H17NO3	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	C17H12ClF2N2O	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	30286-75-0	C19H26NO4	332.19	ESI +	[M+H] ⁺	5
947	Oxomemazine	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	Pentedrone	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	Pirimicarb	23103-98-2	C11H16N4O2	238.14	ESI +	[M+H] ⁺	5
1015	Pirimicarb-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	C14H15Cl2N3O5	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	95737-68-1	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
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) Evaluation de la méthode GUS

Evaluation de la méthode pour les principales molécules médicamenteuses rencontrées en toxicologie hospitalière

Poster présenté à:

64th ASMS Conference, June 5 – 9, 2016, San Antonio, Texas

Dans cette étude, nous avons testé la capacité de la méthode GUS à détecter et à quantifier les principales molécules médicamenteuses détectées lorsque des demandes de screening parviennent au laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Limoges.

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 de la méthode d'extraction).

Pour l'acquisition spectrale, les PIS (MS2) étaient déclenchés sur la base de la transition MRM de rang 1. On obtenait ainsi trois spectres de masse complets pour les 3 énergies de collision (10, 35, 55V) (voir VII Création des méthodes d'acquisition).

Parmi les 24 molécules, 21 ont été détectées à la plus faible concentration.

Même à une concentration élevée (500 µg/L), cette méthode GUS ne permettait pas de mettre en évidence l'oxazépam.

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

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	
Levomepromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	100.15	-12.00	-21.00	-22.00	7.83	
Levomepromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	58.05	-12.00	-36.00	-10.00	7.83	
Levomepromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	242.05	-12.00	-22.00	-16.00	7.83	
Levomepromazine	60-99-1	C19H24N2OS	[M-H]-	329.17	167.10	-12.00	-61.00	-17.00	7.83	
Levomepromazine	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.

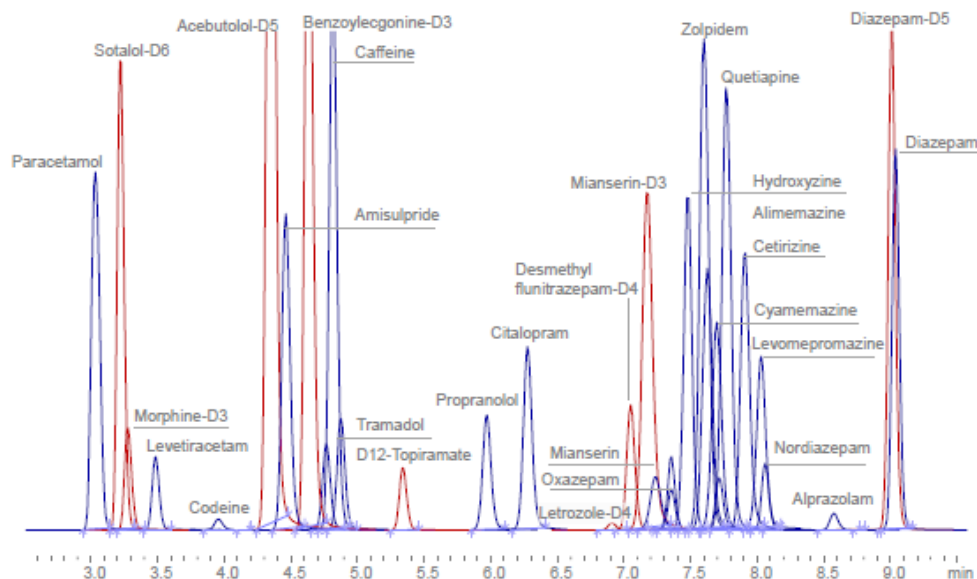


Figure 1. A whole blood sample was spiked with a panel of drugs which are commonly encountered in routine forensic toxicology and extracted using a QuEChERS method. The triple quadrupole mass spectrometer acquired full scan and MRM data throughout the analysis switching polarity with a speed of 5msecs. 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.

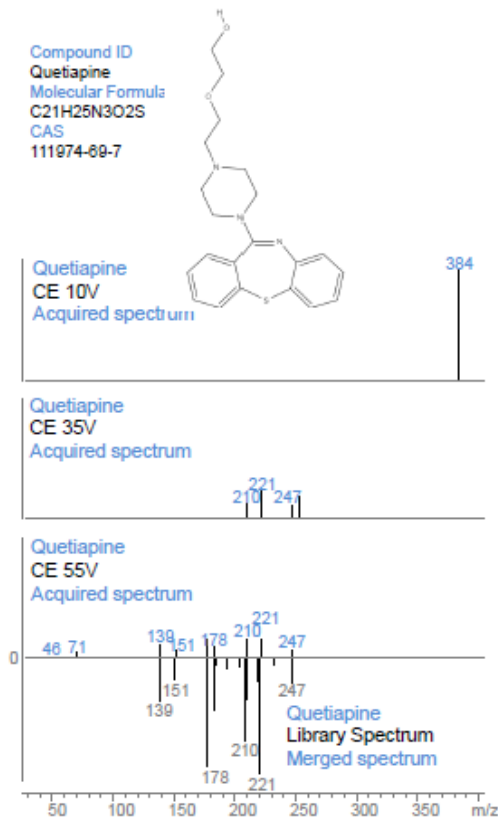


Figure 2. Intensity triggered product ion spectrum for quetiapine spiked into a whole blood sample at a high level toxicological sample (corresponding to a concentration of 0.5mg/L). Product ion spectra are shown for each of the three collision energies (10, 35 and 55V) together with a merged spectrum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

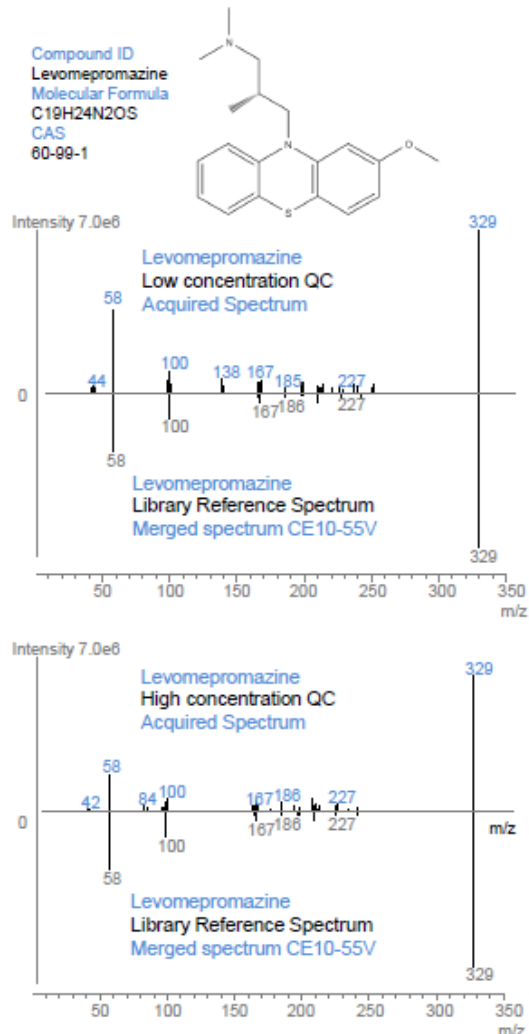


Figure 3. Merged product ion spectra (CE 10-55V) for levomepromazine spiked into whole blood at a low concentration QC (100ug/L) and a high concentration QC (500ug/L). Both spectra result in a high library match score despite the difference in concentration levels.

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.

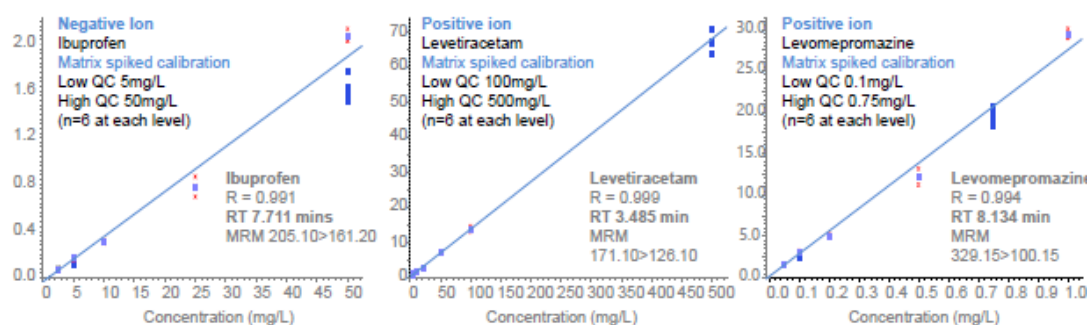


Figure 4. Calibration curve data for ibuprofen (negative ion mode, calibration range 2-50mg/L), levetiracetam (positive ion mode, calibration range 5-500mg/L) and levomepromazine (positive ion mode, calibration range 0.05-1.0mg/L) spiked into whole blood and extracted using QuEChERS.

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 ^R	5 - 50	0.973
Levetiracetam	3.49	10.0	6.6	1	50.0	3.6	Sat ^R	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.

III) Evaluation de la méthode MTS

L'évaluation de la méthode MTS a fait également l'objet d'une note d'application de la part de Shimadzu présentée ci-dessous.

Dans cette étude, une méthode MTS mesurant 32 étalons internes deutérés et 90 composés comprenant 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, validées selon la norme 15189 et utilisées en routine dans le laboratoire : la première dédiée à la quantification des « CAO » et la seconde à la quantification des benzodiazépines.

24 échantillons sanguins de patients 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).

Les résultats quantitatifs obtenus entre ces deux approches sont proches de l'identique.

Une méthode MTS générique a donc été développée permettant d'identifier et quantifier à la fois les « CAO » et les benzodiazépines en une seule analyse (gain d'efficacité). De plus, la méthode MTS permet de réduire les faux négatifs et d'augmenter le niveau de confiance dans l'identification des composés en fournissant à la fois des informations provenant de l'acquisition MRM et des produits ion scan.

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.

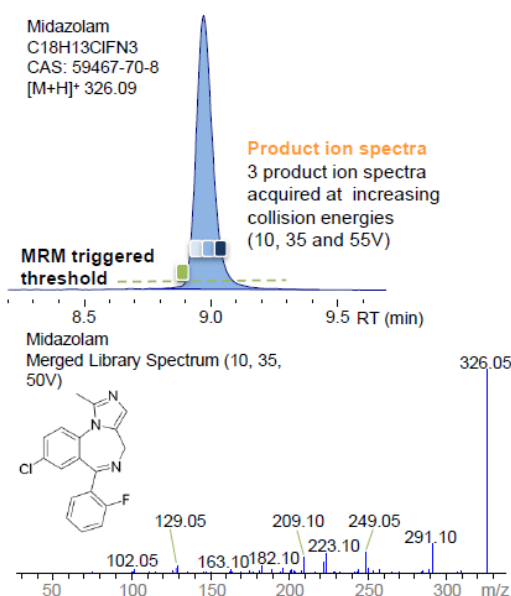


Figure 1 MRM threshold triggered product ion scans acquired at low, medium and high collision energies (corresponding to 10, 35 and 55V) are merged together to create a library searchable spectrum for midazolam. This approach increases the fragment ion information for each target and helps reduce false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

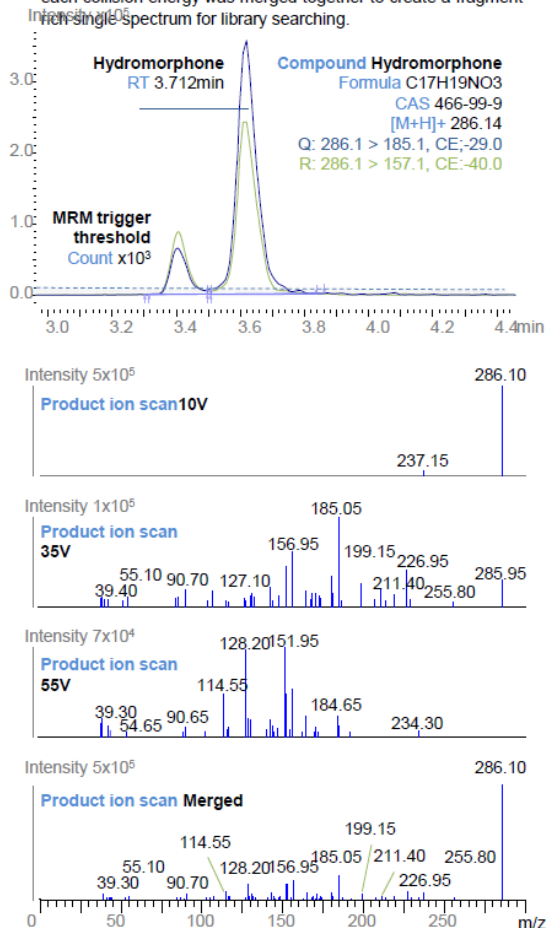


Figure 2. MS/MS acquisition data for hydromorphone. Above a predefined MRM intensity threshold, product ion scans are triggered acquiring scan data at different collision energies (10, 35 and 55V). For library based identification, the product ion scans from each collision energy are merged together.

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

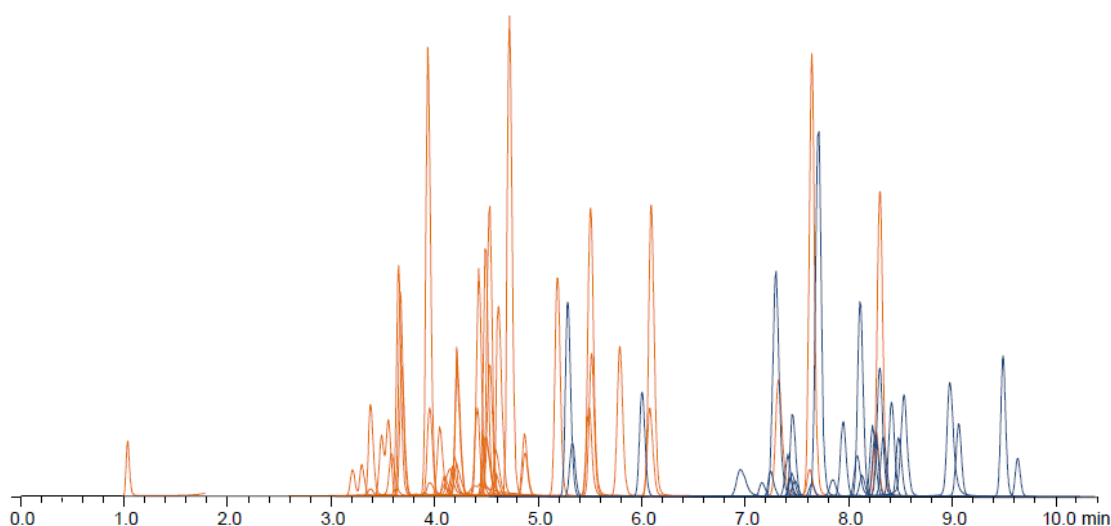


Figure 3. MRM chromatograms for 35 Benzodiazepines (blue trace) separated in under 10min (Table 4 lists each benzodiazepine in the test panel). The mobile phase composition was based on a previously published method with the aim of accommodating a broad chemical space for both positive and negative modes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

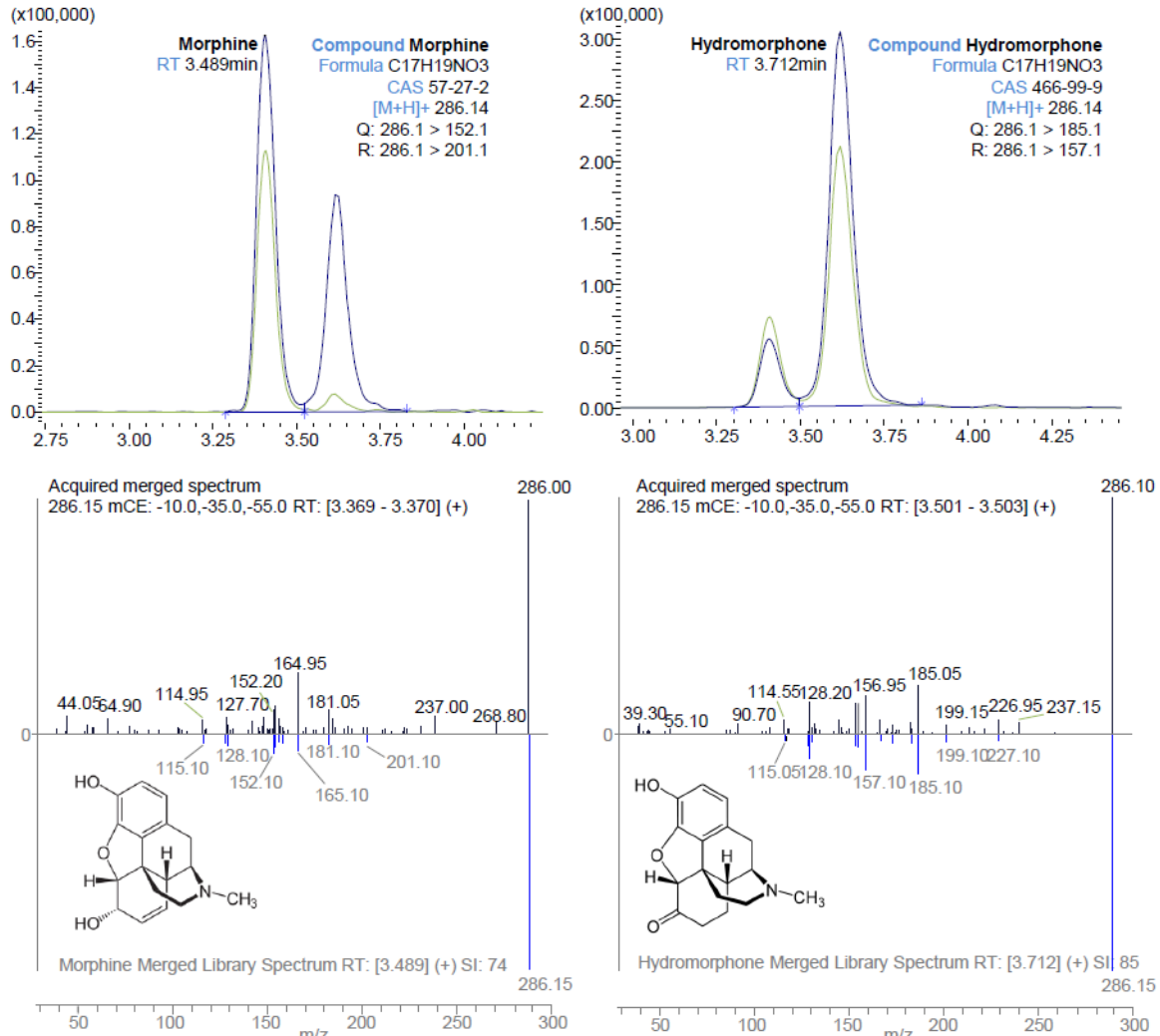


Figure 4. MRM triggered product ion scan MS/MS data for morphine and hydromorphone extracted from blood samples using a QuEChERS extraction protocol. The identification of isobaric compounds such as morphine and hydromorphone in blood samples was confirmed by matching acquired product ion spectrum data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

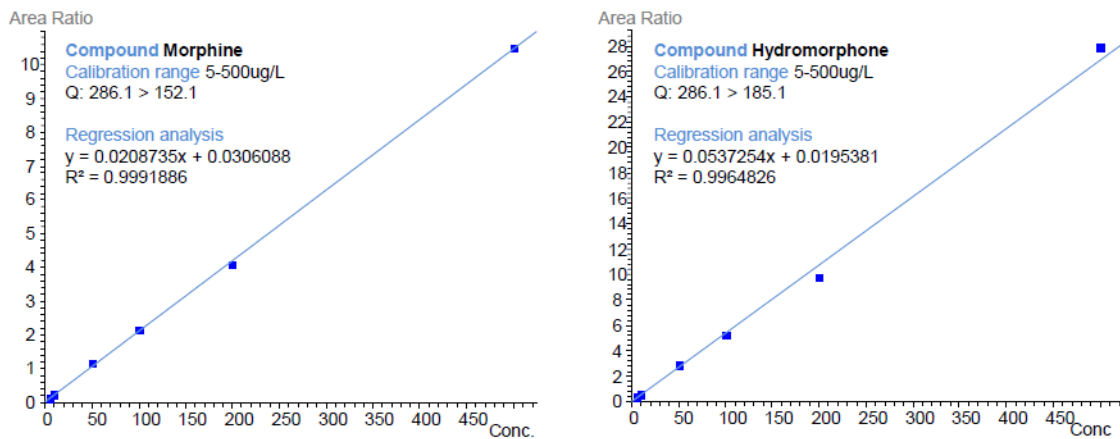


Figure 5. Calibration curve data for morphine and hydromorphone extracted from blood samples (calibration range 5-500ug/L). As the MS/MS method uses MRM triggered product ion scans the quantifier ion was used to generate the calibration curve for target compounds.

Method performance

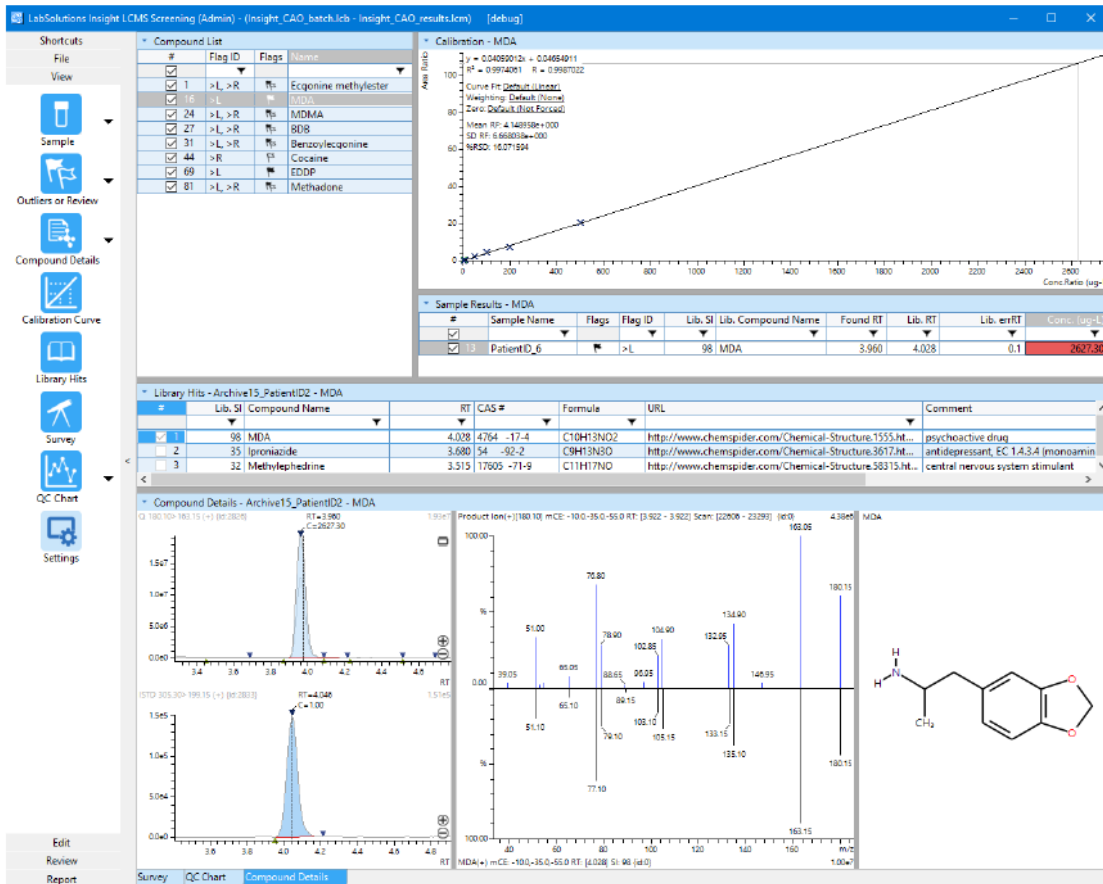


Figure 6. Insight software helps to accelerate data review-by-exception, in this case a reporting flag was enabled to filter drug concentration when measured above a set value. MDA was identified by matching the merged product ion scan data and retention time with a reference library of spectra and retention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

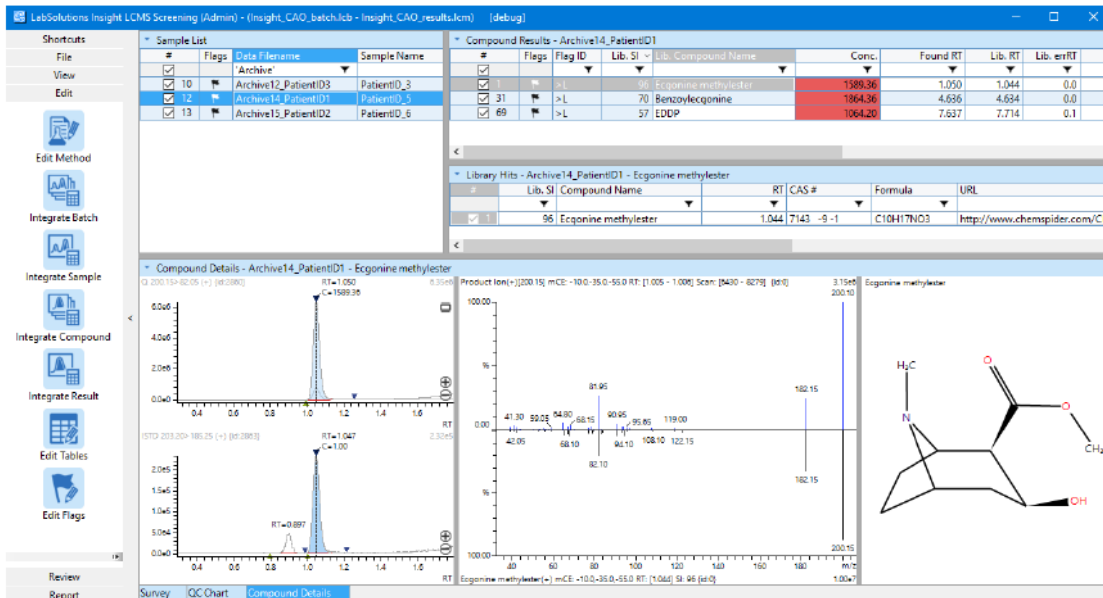


Figure 7. To help differing needs in data review the data browser can be simply changed to show or hide alternative data views. In this blood sample, egonine methylester resulted in a similarity score of 96 with the reference library.

■ 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 $r^2 > 0.99$).

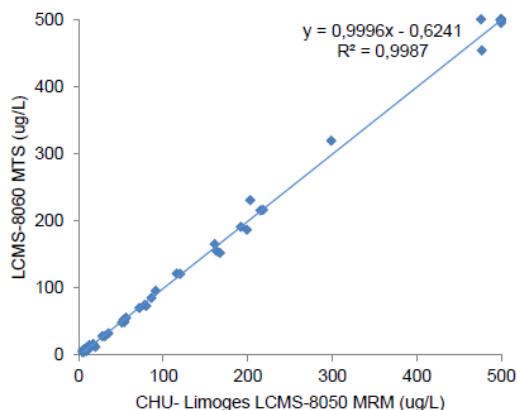


Figure 8. Regression analysis comparing the results from 24 patient blood samples acquired using the LCMS-8060 MTS method with library searching to a conventional LCMS-8050 MRM method. (Results reported from compounds with complementary ISTD compounds using internal standard calibration curve).

■ 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

First Edition: January, 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, 2015

Discussion - Conclusion

Mes travaux de thèse ont entamé un chantier important : développer une ou plusieurs bibliothèques contenant l'information spectrale d'un très grand nombre de xénobiotiques afin de mettre au point différentes procédures de screening.

Dans un premier temps, sur la base d'un panel représentatif de molécules, nous avons pu 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 10 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 important 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.

Nous avons développé une méthode d'extraction sur la base de sels QuEChERS. Cette méthode est de plus en plus appliquée dans les laboratoires de pharmacologie-toxicologie. Fort d'une bonne expérience pour des applications telles que la recherche et le dosage de pesticides, de stupéfiants et de benzodiazépines au sein du laboratoire, nous avons décidé de tester cette approche sur un panel représentatif de molécules, notamment les principales molécules médicamenteuses détectées en toxicologie hospitalière.

Cette méthode 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.

Au total, la préparation nécessite moins de 45 minutes, même pour un opérateur peu expérimenté. Couplé un temps de chromatographie de 15 minutes, la procédure permet donc de rendre des résultats au bout d'un peu plus d'une heure pour l'analyse d'un échantillon de patient.

Schématiquement, il existe des screening dits « ciblés » pour lesquels seules les molécules appartenant à une liste prédéfinie sont recherchées, et des screenings dits « non ciblés » qui tentent de détecter tout composé présent dans l'échantillon. Quelle que soit l'approche, une fois le composé détecté, son information spectrale est comparée à une information spectrale déjà contenue dans une bibliothèque.

Les méthodes « ciblées » (MRM et MTS) ont longtemps été limitées par les performances propres aux spectromètres et par les performances des logiciels de retraitement des données. Longtemps, elles se sont limitées à quelques dizaines de molécules, au mieux. En l'état, les approches « MTS » ou « MRM spectrum mode » que nous avons développées sur un système LC-MS/MS de dernière génération sont susceptibles de rechercher, simultanément, des centaines de molécules.

Il demeurera cependant toujours un avantage précieux pour l'approche « non ciblée » (GUS) : elle peut détecter une substance qui ne figure dans aucune bibliothèque. Dans ce

cas de figure, d'autres analyses peuvent être envisagées pour identifier une molécule. Ce point est important en toxicologie médico-légale.

Historiquement, un screening sert à détecter une molécule avant que ne soit mise en œuvre une méthode de dosage spécifique. Par exemple, classiquement au sein du laboratoire, un antidépresseur peut être détecté au screening, puis une méthode de dosage par LC-MS/MS est réalisée.

Nous avons développé des méthodes d'acquisition permettant de quantifier des molécules d'intérêt dès lors que celles-ci sont détectées. Les premiers résultats obtenus pour un panel représentatif de molécules d'intérêt sont très encourageants.

Une telle approche permet de diminuer considérablement le temps de rendu des résultats, dans la mesure où la quantification peut être réalisée dès le retraitement des données.

Nos résultats n'ont fait l'objet d'aucune validation, au sens « Assurance Qualité » du terme. Le but était, jusqu'ici, d'étudier la faisabilité de construire des méthodes d'acquisition et d'évaluer leurs performances. Pour valider ces méthodes, il sera nécessaire de travailler sur un encore plus large panel de molécules présentant des caractéristiques très diverses en termes de polarité/apolarité, classes pharmacologiques, mode d'ionisation, masses moléculaires, etc... Il s'agit, bien entendu, de s'imposer des contraintes pour évaluer au mieux la sensibilité et la spécificité des méthodes d'acquisition. Ce panel servira également à évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode d'extraction ainsi que les effets de matrice, les limites de quantification, les limites de détection des molécules....

La question de la qualification opérationnelle du système (c'est-à-dire la vérification de ses performances avant chaque utilisation) doit être également posée. Cette dernière pourrait être évaluée par l'injection quotidienne du mélange de référence des 16 molécules que nous avons initialement choisies. Cela nous permettra notamment de déterminer à quelle fréquence les droites de calibration doivent être réalisées pour assurer une quantification suffisamment précise des molécules détectées.

Enfin, à ce jour nous avons reçu un nouveau système automatisé de préparation d'échantillons doit également être testé : le CLAM-2000 (Shimadzu). Ce système est capable de réaliser une extraction à partir d'un échantillon biologique liquide et d'injecter directement l'extrait dans le système LC-MS/MS. D'autres méthodes d'extractions seront donc à développer sur le CLAM-2000.

Bibliographie

Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B (2005) Residue analysis of 500 high priority pesticides : better by GC-MS or LC-MS/MS?

Capolaghi B, Moulsmas M, Houdret N, J. Baud F (2000) Stratégie analytique en toxicologie d'urgence.

Dulaurent S, Moesch C, Marquet P, Gaulier J.M, Lachâtre G (2010) Screening of pesticides in blood with liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry.

Dulaurent S, El Balkhi 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 metabolites in whole blood.

Lambert W, Van Bocxlaer J, De Leenheer A (1997) Potential of high performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology.

Marquet P (2002) Is LC-MS suitable for a comprehensive screening of drug and poison in clinical toxicology ?

Maurer H (2005) 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.

Ritnerr M, Pragst F, Bork W, Neumann J (2001) Screening method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry.

Saint-Marcoux F, Lachâtre G, Marquet P (2003) Evaluation of an improved General Unknown Screening procedure using liquid mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high performance liquid chromatography diode array.

Sauvage F.L, Saint-Marcoux F, Duret B, Deporte D, Lachâtre G, Marquet P (2006) Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry.

Szymanski G (2013) Validation d'une méthode de Multi-Target-Screening par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem et étude de l'utilisation des résultats de criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble.

Tenczer J, Lappenberg-Pelzer M, Schneider V, Demme U, Köppel C (1994) Fatal poisoning with detajmium : identification of detajmium and its metabolites and artefacts by gas chromatography-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography.

Turcant A, Premel-Cabic A, Cailleux A, Allain P (1991) Toxicological screening of drugs by microbore High Performance liquid chromatography with photodiode-array detection and ultraviolet spectral library searches.

Venise N, Marquet P, Duchoslav E, Dupuy J.L, Lachâtre G (2003) A General Unknown Screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry.

Vogeser M, Seger C (2008) A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory – goals for further developments.

Weinmann W, Stoertzel M, Vogt S, Wendt J (2001) Tune compounds for electrospray ionization / in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching.

Webographie

- « 123bio.net - Cours - Chromatographie d'adsorption ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://www.123bio.net/cours/chromato/adsorption.html>.
- « Bristol University - High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS) ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>.
- « Centre de biophysique moléculaire - UPR 4301 - ESI : Electrospray Ionization ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?article127>.
- « chapitre4.pdf ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://www.icsn.cnrs-gif.fr/IMG/pdf/chapitre4.pdf>.
- « Chromatographie en phase liquide-5-Chromatographie-liquide-haute-performance-HPLC.pdf ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://www.pharmaetudes.com/ressources/cours%20internat/section1/5-Chromatographie-liquide-haute-performance-HPLC.pdf>.
- « LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP OU HPLC)-Chimie Etudiants3.pdf ». Consulté le 14 juin 2016. http://moodle.univ-lille2.fr/pluginfile.php/75669/mod_resource/content/1/Chimie%20Etudiants3.pdf.
- « Les différents modes de chromatographie liquide ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A62.html>.
- « Les forces éluantes des phases mobiles en HPLC ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/force-eluante.php>.
- « Solvents Miscibility Chart - Labtools - Scharlab S.L. The Lab Sourcing Group ». Consulté le 14 juin 2016.
<http://www.scharlab.com/tabla-reactivos-mezclabilidad.php>.
- « Spectrométrie de masse ». Consulté le 14 juin 2016. <http://jflemen.iutlan.univ-rennes1.fr/CHIMIE/SPECMAS/specmas3.htm>.
- « UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE DE LILLE 1 ». Consulté le 14 juin 2016. <https://ori-nuxeo.univ-lille1.fr/nuxeo/site/esupversions/4193a57f-a1a1-46c4-af17-e3feaeada7c3>.

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Mise au point d'une méthode de recherche large de xénobiotiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Dans de nombreux contextes, 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 (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 de méthodes quantitatives spécifiques. 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). Notre objectif était de développer des méthodes de screening sur un spectromètre de masse en tandem de dernière génération (modèle 8060 ; Shimadzu).

Une bibliothèque regroupant les paramètres spectraux et chromatographiques d'environ 1 300 molécules a été construite. Sur la base de cette bibliothèque, trois méthodes d'acquisition ont été développées : une méthode MRM classique, une méthode MRM dite « spectrum mode » (permettant de construire un spectre de masse où chaque ion fils a été obtenu à une énergie de collision optimale) et une méthode MTS. Une méthode d'extraction commune basée sur l'utilisation des sels QuEChERS a été développée pour permettre l'analyse d'échantillons sanguins et urinaires. Pour les trois méthodes d'acquisition, de très bonnes performances qualitatives (capacité à détecter les molécules), mais également quantitatives (mesure des concentrations après acquisition) ont été démontrées pour un très large panel de molécules d'intérêt.

Mots-clés : screening, chromatographie, spectromètre de masse en tandem, MTS, MRM, MRM spectrum mode, QuEChERS

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

A screening is the first analysis carried out when the nature or the presence of a drug is totally unknown, which is often the case in clinical and forensic toxicology. Usually, a screening precedes more specific analyses allowing the quantitation of the molecules. When using LC-MS/MS, screening can be "targeted" (multi-target screening; MTS) or untargeted (General Unknown Screening ; GUS). The purpose of this project was to develop different screening approaches using a modern tandem mass spectrometer (model 8060, Shimadzu). A library with spectral and chromatographic parameters of about 1300 compounds was built. Using this library, three acquisition methods were developed : a MRM (Multiple Reaction Monitoring) method, a MRM spectrum mode method (which allows to obtain spectral information acquired at multiple collision energies), and a MTS method. A QuEChERS extraction was developed to analyze blood and urine samples. The three methods gave pretty good qualitative and quantitative results for various classes of compounds (illicit drugs, medicines, pesticides...).