

Validatie van een methode voor de detectie en kwantificatie van lichaamsvreemde componenten via de LC-Q-trap

Louis Pieters, Laboratoriumgeneeskunde, UZ Leuven

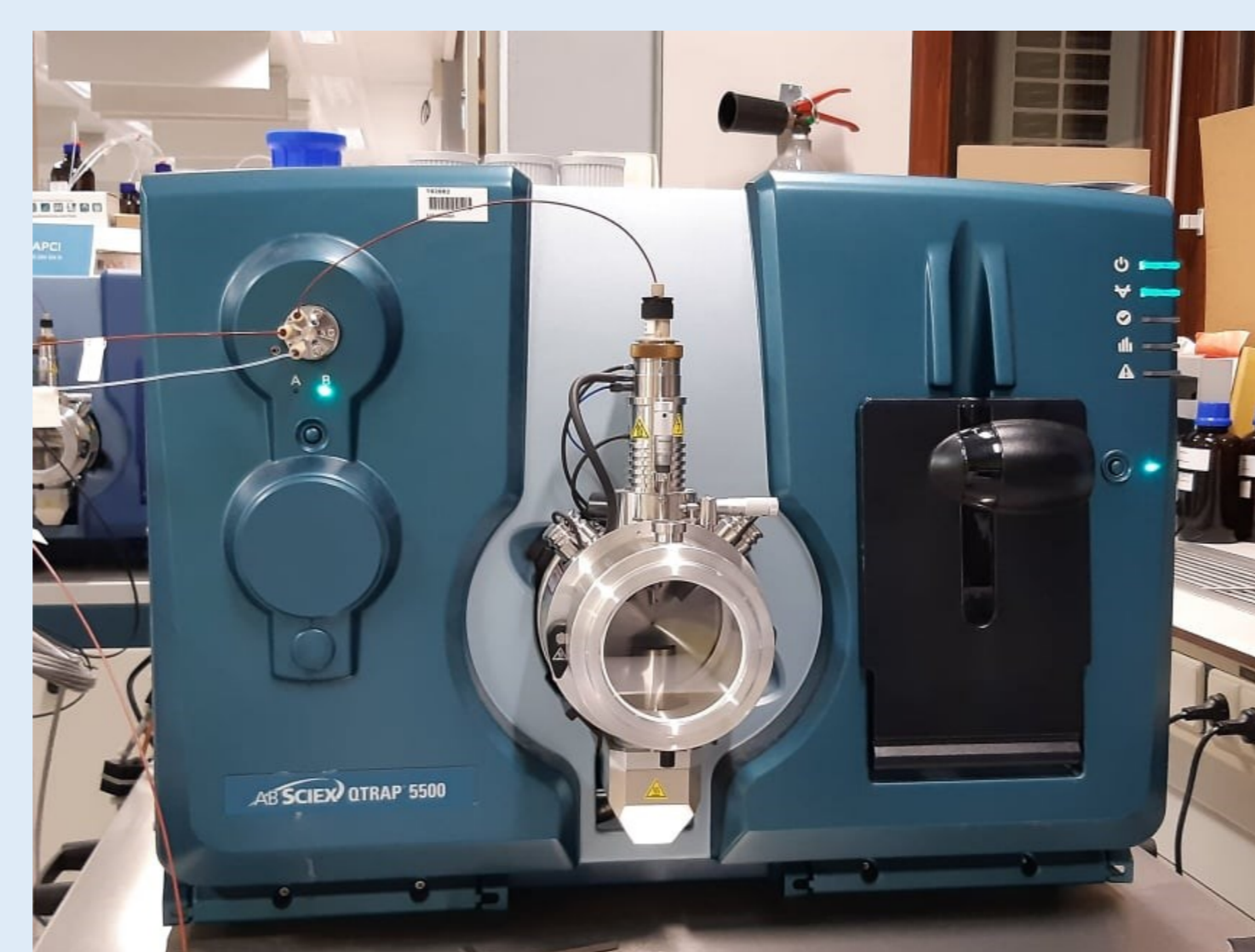


Inleiding

In een toxicologisch laboratorium wordt er gezocht naar lichaamsvreemde componenten zoals drugs of medicatie. Doordat er steeds meer drugs en medicatie worden ontdekt die niet bepaald kunnen worden met de huidige methode zullen ze toegevoegd moeten worden aan de huidige analyse methode.

De nieuwe methode die gevalideerd wordt bevat een hele lijst aan nieuwe componenten en het staaltypen wordt uitgebreid met plasmastalen.

De analyse wordt uitgevoerd op de Shimadzu vloeistof chromatograaf verbonden aan een Q-trap triple quad MS/MS systeem. Voor een validatie moeten een aantal experimenten uitgevoerd worden waarvan de intermediaire precisie, carry-over en LOD wordt besproken.



Antihypertensiva
Amlodipine
Amlodipine-M (dehydro)-35Cl
Bisoprolol
Propranolol
Diltiazem
Metoprolol
Nifedipine

NPS (Novel Psychoactive Substance)
3-methylmethcathinone (3-MMC)
4-methylethcathinone (4-MMC)
Fluoroamfetamine (FA)
Fluoromethamfetamine (FMA)

Methoden

Intermediaire precisie

Intermediaire precisie duidt op hoe dicht de resultaten bij elkaar liggen bij analyse van een staal in verschillende runs. Er werden 10 runs uitgevoerd met 5 patiëntenstalen en een mix van stalen. Na de runs wordt de gemiddelde concentratie van de componenten bepaald en de variatiecoëfficiënt.

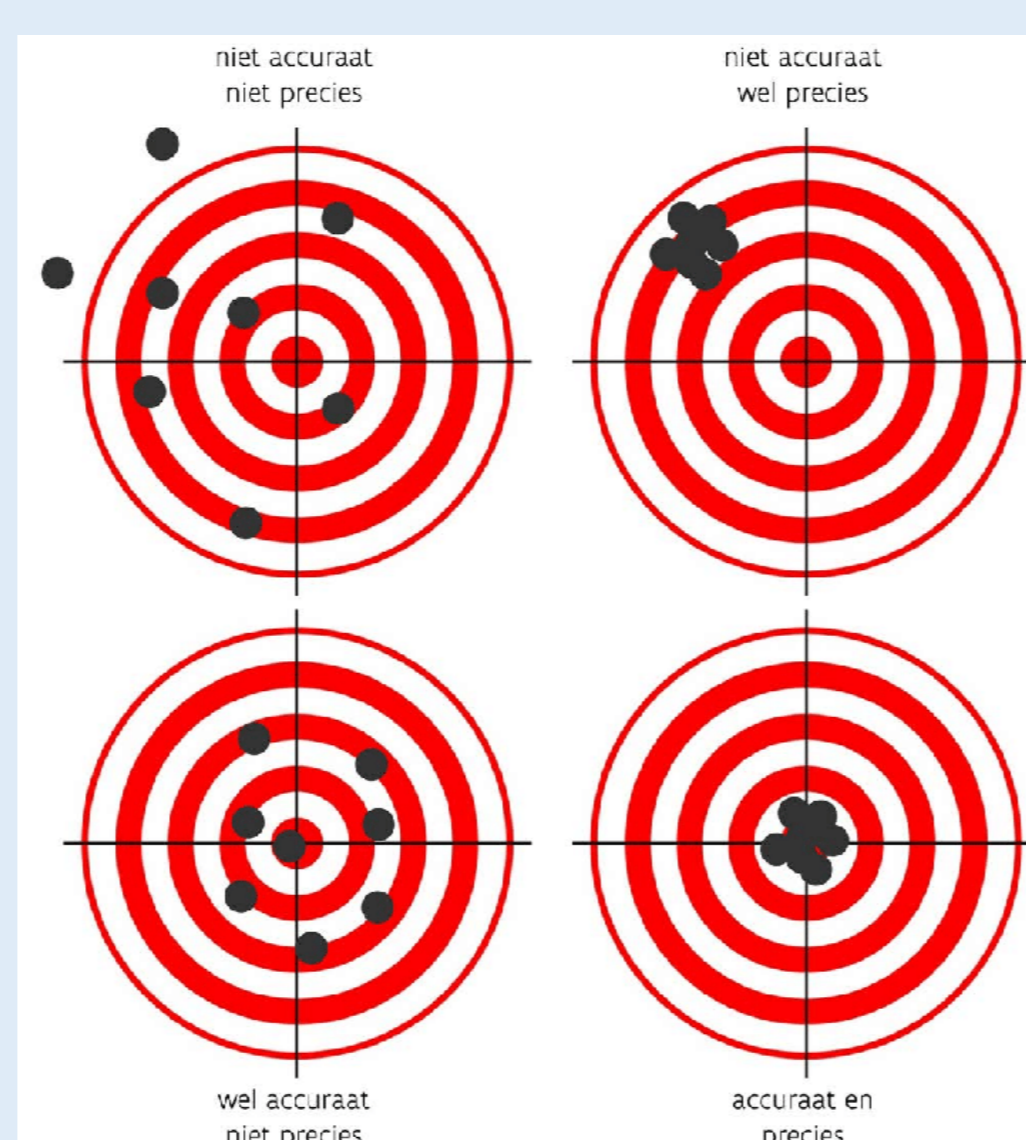
Carry-over

Carry-over is de invloed van een staal op de volgende stalen. De onderzochte componenten zijn: amfetamine, cocaïne, GHB, ketamine, MDMA, morfine en THC. Voor elke component werd een patiëntstaal onderzocht die een hoge concentratie bevat aan één van de componenten.

Tijdens het experiment wordt het staal eerst drie maal geïnjecteerd met daarna drie injecties in een blanco. Als er carry-over is zal deze zichtbaar zijn in de blanco injecties.

LOD

Limit of detection (LOD) is een belangrijk gegeven die ons verteld tot welke lage concentratie de component nog meetbaar is. Er worden twee verschillende mixen gemaakt van de hoogste concentratiepunten van de ijklijnen. Beide mixen worden tien maal verdund met blanco urine, daarna worden de mixen samengevoegd waardoor ze nogmaals tien maal verdund worden tot een finale verdunning van honderd. Deze verdunningen worden herhaald met blanco plasma. Over een periode van tien dagen werd er dagelijks een analyse uitgevoerd op alle verdunningen.



Resultaten

Carry-over

Bij het carry-over experiment waren cocaïne, ketamine, GHB en MDMA de meest vervuilende componenten, cocaïne is gekend voor zijn grote carry-over. Om de carry-over te verkleinen werd de spoelstap verlengd en de analyse herhaald. Dit had tot gevolg dat ketamine geen carry-over meer gaf. De MDMA en GHB carry-over was verwaarloosbaar.

Tabel 1: Resultaten van de carry-over experimenten in ng/mL

	Amfetamine	Cocaïne	GHB	Ketamine	MDMA	Morfine	THC
Area 1	80900000	17740000	25750000	1283000	113100000	14280000	161100
Area 2	80570000	17440000	25400000	1277000	113100000	14270000	145000
Area 3	81090000	17040000	25030000	1220000	111600000	14320000	136100
Blanco 1	0	118600	23980	0,00	300300	0	0
Blanco 2	0	113000	0	0,00	N/A	0	0
Blanco 3	0	112600	0	0,00	36230	0	0
% carry over	0,00%	0,04%	0,10%	0,00%	0,24%	0,00%	0,00%

Intermediaire precisie en LOD

Er zijn grote CV% waarneembaar, dit is waarschijnlijk door fouten in de resultaatverwerking waardoor de concentraties sterk verschillen tussen de runs. Met de resultaten van het LOD experiment kennen we ongeveer de LOD van de componenten. De exacte LOD hoeft niet bepaald te worden omdat de concentraties al laag zijn.

Tabel 2: Resultaten intermediaire precisie en LOD in ng/mL

componenten	C1	%CV	C2	%CV	C3	%CV	C4	%CV	C5	%CV	C6	%CV	C52	%CV	LOD	Meetbereik
Amfetamine	N/A	N/A	4529,5	34,65	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	965,64	16,6	N/A	N/A	<32	250-8000
Cocaïne	7,4495	76,66	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	<6,4	50-800
GHB	N/A	N/A	fout	fout	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	7812,5-250000
Ketamine	223,41	55,31	N/A	N/A	2963,8	21,62	N/A	N/A	N/A	N/A	140,16	31,91	N/A	N/A	<25	78,13-2500
MDMA	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	<32	250-16000
Morfine	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	93,96444	10,26%	<25	39,06-5000
THC	11,62	56,81	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	8,74	60,68	31,70333	42,11%	N/A	3,13-100

Conclusie

De resultaten van het carry-over experiment waren goed waardoor de huidige routine methode al werd aangepast zodat de huidige routine spoelstap verkort is naar acht seconden.

De resultaten van het precisie experiment waren niet acceptabel. De resultaatverwerking zal nog moeten verbeterd worden zodat er geen fouten meer zijn.

De methode is nog niet bruikbaar als routine en zal nog verbeterd moeten worden. Ook zullen andere experimenten nog uitgevoerd moeten worden om de validatie te voltooien.

Dankwoord

Dank aan alle laboranten van PT 2 voor de opleiding op toxicologie.

Speciale dank aan mijn stagementoren Ing. Nele Peersman en Apr. Klin. Biol. Nele Van den Eede voor hun professionele begeleiding.