



Kosten nopen tot centralisatie Analytische technieken in de klinische toxicologie

Dr. D.J. Touw, ziekenhuisapotheker,
klinisch farmacoloog
Hoofd laboratorium, Apotheek Haagse
Ziekenhuizen

Dr. G.R. de Ruiter
Anesthesioloog – intensivist,
Ziekenhuis Leyenburg, Den Haag

Prof. Dr. D.R.A. Uges, ziekenhuis-
apotheker, klinische en forensisch
toxicoloog-farmacoloog
Hoofd laboratorium, Apotheek
Academisch Ziekenhuis Groningen

Correspondentie:
Dr. D.J. Touw
Apotheek Haagse Ziekenhuizen
Postbus 43100
2504 AC Den Haag
tel 070-3217217
fax 070-3217156
mail d.touw@ahz.nl

Samenvatting

De klinische toxicologie is van oudsher het domein van de ziekenhuisapotheker. Deze bepaalt in overleg met de aanvrager welk onderzoek wordt uitgevoerd en adviseert de aanvrager aan de hand van de bevindingen. In de afgelopen decennia hebben zich grote ontwikkelingen voorgedaan in de analytische mogelijkheden in de klinische toxicologie. Was vroeger de dunnelaag chromatografie eventueel aangevuld met gaschromatografie de techniek waarmee intoxicaties analytisch werden benaderd, heden te dage heeft ieder (groter) ziekenhuisapotheker laboratorium de beschikking over immuno-assays waarmee in enkele gevallen een screenend onderzoek kan worden gedaan alsmede een hogedruk vloeistof chromatografisch systeem met een diode-array detector. Met deze laatste techniek is het mogelijk de meest voorkomende geneesmidde-

lenintoxicaties op te sporen en te kwantificeren.

Trefwoorden: toxicologie, analyse, intoxicatie, HPLC, GC

Inleiding

Iedere Nederlandse ziekenhuisapotheker krijgt regelmatig het verzoek om toxicologisch onderzoek te verrichten. Er bestaan diverse redenen om toxicologisch onderzoek te verrichten:

1. Er sprake is van het vermoeden van acute vergiftiging met onbekende stoffen;
2. Differentiaal diagnose tussen een vergiftiging en een schijnbare vergiftiging;
3. De ernst en de prognose van de vergiftiging vaststellen;
4. Onderzoek naar chronische exposities aan giftige stoffen en geneesmiddelen (toxische drug monitoring. (Bijvoorbeeld aluminium bij chronische hemodialyse);
5. Vaststellen van risicovol verslaafd gedrag (drugs, alcohol,

nicotine); dit kan ook gebeuren op verzoek van de bedrijfsarts (Workplace testing);

6. Confirmeren van hersendood (leeg EEG al dan niet veroorzaakt door een geneesmiddel);
7. Vragen omtrent gevaarlijke ontoelaatbare handelingen (b.v. syndroom van von Münchhausen by proxy, iatrogene vergiftiging; schending Arbo-wet);
8. Evaluatie van de behandeling of preventieve beslissingen.

Een klinisch farmaceutisch en toxicologisch laboratorium van een grote Nederlandse ziekenhuisapothek (zoals de Apotheek Haagse Ziekenhuizen of de apotheek van het Academisch Ziekenhuis Groningen) verricht per jaar circa 500 analyses gericht op het aantonen of uitsluiten van een intoxicatie. Hierbij zijn de drugsanalyses en de toxicologische drug monitoring niet meegerekend. Het nut van systematisch toxicologisch onderzoek hangt af van de communicatie tussen de aanvrager en het laboratorium dat het onder-



zoek uitvoert. De ziekenhuisapotheker dient kennis te hebben van klinische toxicologie; intoxicaties, de bijbehorende verschijnselen en de toxicokinetiek. Kennis van de toxicokinetiek naast de farmacokinetiek is onmisbaar. Het volgende voorbeeld moge dit illustreren: Bij een therapeutische hoeveelheid bedraagt de eiwitbinding van valproïnezuur 90% en lijkt hemodialyse niet effectief. Bij een ernstige intoxicatie (serumconcentratie >1000 mg/l) daalt de eiwitbinding door verzadiging tot slechts 30%. Hierdoor wordt enerzijds het toxisch effect extra met een factor 7 verhoogd (van 10% naar 70% ongebonden valproïnezuur) en is anderzijds dialyse wel effectief.

De Nederlandse ziekenhuisapothekers hebben een onlosmakelijk verband gelegd tussen de vraagstelling, de indicatiestelling, het analytisch-toxicologisch protocol, de toxicokinetiek en de advisering naar de clinicus. Deze vijf-eenheid ziet men terug in het KKGt extern kwaliteitsbewakingsprogramma Toxicologie, waarbij de deelnemers aan de hand van een casus moeten beslissen wat te bepalen en na de analyses hoe te adviseren omtrent de behandeling en prognose.

Er bestaat geen algemeen screenend onderzoek waarbij het totale scala van mogelijke intoxicaties in één onderzoek kan worden bestreken. Op basis van overleg met de arts waarbij de symptomen en de voorlopige diagnose van de patiënt dienen te worden besproken, dient de ziekenhuisapotheker een inschatting te maken van de stof(fen) die verantwoordelijk is (zijn) voor de intoxicatie. De reden waarom de arts denkt aan een mogelijke vergiftiging, de plaats waar de patiënt werd gevonden, zijn medische voorgeschiedenis en het klinisch beeld dienen de basis te vormen waarop de meest geëigende laboratoriumtechniek wordt gekozen. Mede op basis van de resultaten wordt besloten om naast een screenend onderzoek ook kwantitatieve bepalingen uit te voeren. Tenslotte wordt de behandelend arts

van advies gediend. Complicerende factor hierbij is dat de meeste casuïstiek niet bestaat uit een intoxicatie met een enkelvoudige stof, maar dat veelal combinaties van (genees)middelen zijn ingenomen. Het kan derhalve voorkomen dat een patiënt zich vergiftigt met een combinatie van een hoge dosis antidepressivum en een benzodiazepine. Het antidepressivum is bij overdosering epileptogeen, hetgeen door de benzodiazepine wordt onderdrukt. De patiënt zal hierbij in een diepcomateuze toestand worden aangeboden. Bestrijding van het coma door het benzodiazepine met de benzodiazepine-antagonist flumazenil kan epileptische insulten tot gevolg hebben. Aangezien bijna alle centraal werkende stoffen in overdosering convulsies teweeg kunnen brengen, kan het zinvol zijn routinematig op benzodiazepinen te screenen en bij afwezigheid daarvan diazepam profylactisch toe te dienen. De opleiding tot ziekenhuisapotheker voorziet dan ook, naast de verplichte postuniversitaire cursus klinische toxicologie, in een uitgebreide laboratoriumstage waarbij alle aspecten van de klinische toxicologie (diagnostiek, analyse, interpretatie, advisering, behandeling) aan de orde komen.

In het hieronder volgende stuk wordt een overzicht gegeven van de diverse laboratoriumtechnieken die de ziekenhuisapotheker ter beschikking staan, met hun sterke maar ook hun zwakke punten.

Analyseprotocol

Bij de aanpak van een toxicologisch onderzoek wordt veelal een vast protocol gehanteerd gericht op snelheid. In de toxicologie speelt tijd een belangrijke rol. Dit is van belang om zo snel mogelijk de juiste behandeling te starten en de gecontra-indiceerde behandeling te staken. (b.v. direct stoppen van obidoxim bij een thio-carbamaat- in plaats van een organofosfaat-intoxicatie). Daarnaast wil men de analist zo min mogelijk overuren laten maken. Tenslotte is het te verkrijgen materiaal niet

onbeperkt en zal men dus niet 'alles' kunnen bepalen.

De Nederlandse toxicologische ziekenhuislaboratoria gaan uit van serum of bloed als te analyseren materiaal. De drugs, laxantia en diuretica worden bijna altijd gescreend in urine. Slechts plantaardig materiaal (het zeer giftige *Taxus*) en paddenstoelen (b.v. *Amanita*) worden in maaginhoud bekeken.

Er bestaan een aantal voorproeven. De belangrijkste zijn de groepspecifieke immunoassays.

Daarnaast heeft de bepaling van pseudocholinesterase-activiteit bij vermeende organofosfaatvergiftiging (parathion) zijn nut bewezen. Voor een uitgebreide lijst van voorproeven wordt verwezen naar de nieuwe Clarke's, *Isolation and Identification of Drugs* (3e druk, eind 2002)

Monstervoorbewerking

Voor een aantal analytische technieken (b.v. dunnelaagchromatografie, gaschromatografie, vloeistofchromatografie) is monstervoorbewerking noodzakelijk. Deze bestaat in het algemeen uit een zure en/of alkalische extractie van circa 1 ml serum met een organisch oplosmiddel waarbij de extraheerbare stoffen zich in de organische laag verzamelen. Hierbij blijven met name de serum-eiwitten in de waterlaag achter. Door indampen van deze organische laag tot droog en vervolgens oplossen in enkele tientallen microliters van een oplosmiddel wordt een concentratiestap bereikt. Door deze voorbewerking neemt de gevoeligheid van de toegepaste analytische techniek sterk toe en kunnen ook lage concentraties van het te onderzoeken (genees)middel worden aangetoond. Een speciale extractie is die volgens collega Noten. Deze heeft als voordeel, dat er niet hoeft te worden ingedampt en zeer schone extracten oplevert.

Bij sommige met name hydrofiële stoffen kan een vaste stof extractie met behulp van een kolommetje de voorkeur hebben. Ook hier geldt, dat er geen enkele extractie bestaat die geschikt is voor alle potentieel giftige

Tabel 1. Beschikbaarheid immuno-assays voor toxicologisch onderzoek.

Geneesmiddel (groep)	Serum	Urine
Kwalitatief		
Benzodiazepinen	+	+
Barbituraten	+	+
Amfetamines	-	+
Opiaten	-	+
Cannabis	-	+
Methadon	-	+
Cocaine	-	+
Kwantitatief		
Carbamazepine	+	-
Fenytoïne	+	-
Fenobarbital	+	-
Valproïnezuur	+	-
Theofylline	+	-
Digoxine	+	-
Paracetamol	+	-

stoffen en hun actieve metabolieten.

Dunnelaag chromatografie

Tot voor circa 10 jaar was de dunnelaagchromatografie (DLC) de belangrijkste pijler van de systematische toxicologische analyse in de Nederlandse ziekenhuizen. DLC is een relatief ongevoelige methode waarbij zuur en alkalisch extraheerbare stoffen op een plaatje silicagel voorzien van een fluorescerende kleurstof worden gebracht. Deze methode wordt in de moderne Nederlandse ziekenhuislaboratoria nauwelijks meer toegepast.

Immuno-assays

De immuno-assays zijn met name geschikt voor grote series bepalingen ten behoeve van de therapeutische drug monitoring en de drugs of abuse. In een klinisch chemisch laboratorium worden de meeste endogene stoffen met deze techniek bepaald. Met het beschikbaar komen van immuno-assays, ontstond eveneens de mogelijkheid om ook laaggedoseerde stoffen zoals digoxine aan te tonen. Het principe van een immuno-assay berust op het feit dat een antilichaam tegen een bepaald geneesmiddel of geneesmiddelengroep competitief

reageert met het betreffende geneesmiddel en een gelabelde versie van het geneesmiddel (aanwezig in het reagens). Bij een hoge concentratie geneesmiddel is de concentratie gelabeld geneesmiddel in oplossing hoog en omgekeerd. Er is een verschil in eigenschappen tussen vrij gelabeld geneesmiddel en gebonden gelabeld geneesmiddel. Dit verschil kan vervolgens worden waargenomen. Binnen een bepaald concentratiebereik kan derhalve een uitspraak worden gedaan over de concentratie van het geneesmiddel. Immuno-assays kunnen specifiek zijn (b.v. paracetamol, theofylline, fenytoïne, carbamazepine, fenobarbital, valproïnezuur, digoxine) en groepsspecifiek (b.v. tegen benzodiazepinederivaten, tricyclische antidepressiva, amfetamines). Het voordeel van een immuno-assay is dat in het algemeen geen monstervoorbewerking noodzakelijk is. De analyse kan veelal direct op serum of urine worden uitgevoerd. Het voordeel van de specifieke antilichamen is dat snel een kwalitatieve en in een aantal gevallen semi-kwantitatieve uitspraak kan worden gedaan over een intoxicatie. Sommige immuno-assays zijn uitsluitend geschikt voor

serum en andere zijn uitsluitend geschikt voor analyses in urine. In verband met de selectiviteit van de antilichamen zijn deze in het algemeen niet uitwisselbaar (reagerend op de moederstof of juist de metabolieten. Voorbeeld: de cocaine immunoassay reageert op de benzoylecgoninemetaboliet in urine, maar niet op de moederstof cocaine in serum of speeksel). De groepsspecifieke immuno-assays hebben als nadeel dat er slechts een kwalitatieve uitspraak kan worden gedaan: Een sterk positieve reactie op benzodiazepinen zegt op zich niets. De cross-reactiviteit van elke benzodiazepine en van elk metaboliet is verschillend. Ook de gerapporteerde concentratie zegt niets: 0,5 nanomol/ml flunitrazepam is een mega-intoxicatie maar 0,5 nanomol/ml oxazepam is subtherapeutisch. Het moge duidelijk zijn dat de groepsspecifieke immuno-assays bij screening onderzoek van beperkte waarde zijn. Geen van de grotere ziekenhuislaboratoria beperkt zich dan ook tot toepassing van immuno-assays in de toxicologie. Aan de andere kant kan de te grote selectiviteit problemen opleveren. De ADH-immuno-assay op alcoholen reageert alleen op ethanol. De andere veel giftiger alcoholen (b.v. methanol, isopropanol en ethyleenglycol) worden op deze manier gemist. Vluchtige stoffen (waaronder genoemde alcoholen en aceton) moeten daarom altijd met behulp van gaschromatografie worden bepaald. (Zie tabel 1.)

Gaschromatografie

De gaschromatografie (GC) heeft met name zijn waarde bewezen bij de intoxicatie met organische oplosmiddelen en andere vluchtige verbindingen. Hierbij wordt meestal gebruik gemaakt van directe injectie of headspace analyse. Daarnaast wordt de GC soms toegepast bij intoxicaties met barbituraten, valproïnezuur, ethosuximide, benzodiazepinen en sommige andere geneesmiddelgroepen. Met GC wordt vooral de nu in de mode

zijnde rape en party drug gamma-hydroxyboterzuur (GHB) bepaald. Door keuze van een andere dan de specifieke vlamionisatiedetectie (FID) detector (b.v. stikstof-fosfor detectie of electron capture detectie) kan de gevoeligheid worden vergroot. Deze detectoren worden steeds meer vervangen door de bench-top massa-selectieve detector. De toepassing van capillaire GC leidde ertoe dat een hoge mate van scheiding tussen de verschillende componenten kan worden bereikt. Een belangrijke combinatie ten behoeve van toxicologisch onderzoek vormt de GC, met capillaire kolom (25-50 meter) en massaspectrograaf (MS) met een uitgebreide bibliotheek (40.000-100.000 relevante stoffen!). De GC-MS is breed inzetbaar. In vele landen, met name in de forensische toxicologie, vormt hij de ruggegraat van het toxicologisch onderzoek. Een nadeel is dat de meeste (genees-) middelen na extractie eerst moeten worden gederivatiseerd, om voldoende vluchtig te worden voor de GC-scheiding.

Zie kader 'Casus 1'

Vloeistofchromatografie

De toepassing van hogedruk-vloeistofchromatografie (HPLC) in het systematisch toxicologisch onderzoek is van relatief recente datum. Vloeistofchromatografie heeft in het algemeen

Casus 1:

Een vrouw van middelbare leeftijd wordt comateus het ziekenhuis binnengebracht. Ze lijdt aan een ernstige ademhalingsdepressie, acuut leverfalen en convulsies. Dat laatste is niet verwonderlijk omdat ze bekend is met epilepsie waarvoor ze valproaat en carbamazepine krijgt voorgeschreven. De behandelend arts vraagt toxicologisch onderzoek aan. De anti-epileptica worden met een immunoassay bepaald, evenals paracetamol. Valproaat en carbamazepine worden aangetoond in "thera-

Casus 2:

Een vrouw van 27 jaar wordt bij de Spoedeisende Hulp binnengebracht na een periode van trekkingen en bewustzijnsverlies. Op de SEH krijgt zij een hartstilstand en wordt met moeite succesvol gereanimeerd. Op een echo wordt een sterke verwijding van het rechter deel van het hart gezien en het CK-MB is verhoogd. Gedacht wordt aan een massale longembolie of een hartinfarct mogelijk gecompliceerd door epilepsie. Zij wordt beademd en overgeplaatst naar de Intensive Care, alwaar zij wederom een hartstilstand ontwikkelt. Tijdens de reanimatie wordt een externe pacemaker ingebracht. Het hart blijkt elektrisch nauwelijks prikkelbaar. In verband met de trekkingen wordt een pomp met clonazepam gestart. Gezien de leeftijd wordt

een geringer scheidend vermogen dan gaschromatografie. De klassieke vormen van detectie bij HPLC bestaan uit ultraviolette en visuele detectie bij een vaste of variabele golfte, fluorescentiedetectie en electrochemische detectie. Geen van deze detectietechnieken is echter dermate specifiek dat de HPLC breed ingezet kan worden in de toxicologie. De introductie van de diode-array

peutische" serumconcentratie en paracetamol is niet toxisch. Omdat dit het klinische beeld niet kan verklaren, wordt met GC-MS gescreend. De bibliotheek komt met een groot aantal toxische metaboliëten van carbamazepine, die het beeld wel kunnen verklaren. Buiten de carbamazepine-epoxide waren deze andere carbamazepine-metaboliëten onbekend in het laboratorium. Een GC-MS met uitgebreide bibliotheek is bij de oplossing van deze casus onontbeerlijk.

besloten maximaal te behandelen. De IC-arts besluit voor de zekerheid ook nog materiaal in te sturen voor toxicologisch onderzoek. HPLC-DAD onderzoek laat hoge concentraties cocaine en benzo-lecgonine in het bloed zien. De conclusie luidt nu cocaine intoxicatie. Een daarop gemaakte buik-overzichtsfoto en CT van het abdomen laten twee 'bolletjes' zien. Spoedoperatie volgt. In de buik worden 2 intacte bolletjes aangetroffen alsmede een gescheurd bolletje. Patiënte blijkt een week tevoren uit Curaçao te zijn aangekomen. Postoperatief blijkt de patiënte comateus met postanoxische myoclonien. Ondanks de slechte prognose bij een ernstige cocaine intoxicatie wordt een maximaal beleid gevoerd. Patiënte overlijdt na enkele dagen na vaststelling van de hersendood.

detector (DAD) deed het tij keren. De DAD is in staat om per piek in het chromatogram een totaal spectrum op te nemen. Door de combinatie van retentietijd van de piek en spectrum (of de absorptieratio's bij verschillende golflengtes) te vergelijken met een bibliotheek met referentiespectra (ratio's) kan een uitspraak worden gedaan over de identiteit van de gevonden component(en). In combinatie met een bekende extractieopbrengst is de gevonden component ook direct te kwantificeren. Deze techniek is bekend geworden onder de naam STIP (Systematische Toxicologische Identificatie Procedure). Met de STIP-techniek kunnen in principe de meeste extracteerbare componenten die tevens een spectrum bezitten in het ultraviolette of visuele golflengtegebied zowel kwalitatief als kwantitatief worden aangetoond, mits niet in al te lage concentraties. Voorwaarde is dat de DAD is aangesloten op software en dat de betreffende component in een bibliotheek is opgenomen met gegevens over extractie, retentie en spectrum. In Nederland

worden voor diverse detectoren/bibliotheken geneesmiddelbestanden onderhouden en aan collega's ter beschikking gesteld. De meeste grote ziekenhuisapothekelaboratoria hebben inmiddels wel een STIP-opstelling staan. Een ander voordeel van de DAD is dat componenten die in het chromatogram samenvallen op basis van het spectrum toch onderscheiden kunnen worden.

Zie kader 'Casus 2'

Een nieuwe ontwikkeling is de koppeling van een MS aan de HPLC. Probleem hierbij is dat de loopvloei-stof met de erin opgeloste componenten vervluchtigd moet worden teneinde een massaspectrum op te kunnen nemen. Daarom worden de fosfaatbuffers vervangen door azijnzuren of ammoniakbuffers. Het voordeel van de MS is de grotere mate van selectiviteit en toepasbaarheid (geen UV absorptie vereist) dan de DAD, zeker met een MS/MS-detector. In het eerste MS gedeelte wordt het hele geïoniseerde molecuul gedetecteerd en vervolgens wordt dit molecuul met elektronen beschoten tot kenmerkende fragmenten en gedetecteerd met de volgende MS-units (MSⁿ). Door deze hoge scheiding kan gebruik gemaakt worden van zeer eenvoudige extracties en zeer korte chromatografiekolommen c.q. tijden. Immers de scheiding vindt vooral plaats in het MS/MS gedeelte. Door het ontbreken van goede bibliotheken wordt de LC/MS nog slechts beperkt toegepast bij systematisch toxicologisch onderzoek. De mogelijkheden zijn wel veelbelovend. Wegens de hoge kosten zijn slechts enkele zieken-

huislaboratoria in het bezit van een LC-MS. De verwachting is dat over ca 10 jaar de LC/MS/MS de immunoassays, de klassieke HPLC en de GC grotendeels heeft verdrongen in de toxicologische analyse.

Metaal analyses

Uit bovenstaande beschrijvingen van de analytische technieken is duidelijk dat het in alle gevallen gaat om organische verbindingen, voldoende groot om een antilichaam tegen te maken of voldoende groot om signaal te geven bij vlamdetectie (in geval van GC) dan wel UV-detectie (bij HPLC). Metalen bezitten deze eigenschappen niet. Voor intoxicaties met metalen wordt gebruik gemaakt van de eigenschap dat metalen bij verhitting licht kunnen absorberen of emitteren (resp. Atoomabsorptiespectrofotometrie, AAS; en Atoomemissie spectrofotometrie, AES). Intoxicaties met metalen komen relatief zelden voor. De meest voorkomende zijn die met lithium en lood. Lithium afkomstig van lithiumbevattende preparaten die b.v. worden gebruikt bij bipolaire stoornissen en lood afkomstig van oosterse kruidenmengsels zoals b.v. Ayurveda en in bepaalde industrieën. Het bepalen van kwik uit amalgaanvullingen behoort meer toe aan de alternatieve geneeskunde. Een nieuwe ontwikkeling in de metaalanalyse is de Induced Coupled Plasma analyser. In deze ICP wordt in een argontoorts een temperatuur van 6000 – 8000°C opgewekt. Bij deze extreme temperatuur blijken ruim 70 elementen licht uit te zenden met golflengten van enkele picometers. Met behulp van een krachtige computer worden deze banden gescheiden en gekwan-

tificeerd. Met deze techniek kunnen vele elementen tegelijk bepaald worden. Ook de snelheid is veel groter. Sommige elementen kunnen veel beter met ICP worden bepaald (b.v. titaan uit implantaatschroeven) andere weer beter met AAS (b.v. nikkel uit geheugenstaal).

Beschouwing

Klinisch toxicologisch onderzoek kan een belangrijke rol spelen bij de diagnostiek en behandeling van patiënten. Sinds de introductie van de DLC in de analytische toxicologie is er een stormachtige ontwikkeling doorgemaakt. Nieuwe technieken zoals immunoassays, GC-MS, HPLC-DAD en HPLC-MS zijn achter-eenvolgende ontwikkelingen die de klinische toxicologie ten dienste staan. Voor de meeste grotere ziekenhuislaboratoria is voorlopig de HPLC-DAD een bereikbare techniek. Kleinere ziekenhuizen kunnen voor een screening in het algemeen toe met aspecifieke en specifieke immunoassays. Voor lastiger vragen is de HPLC-DAD de aangewezen techniek, gevolgd door GC-MS of HPLC-MS. De laatste technieken zijn in ons land echter nog beperkt beschikbaar. Wegens de enorme kosten gemoeid met de nieuwe technieken zullen mogelijk in 2010 de kleinere laboratoria nauwelijks meer toxicologisch onderzoek verrichten. De grotere centrale toxicologische ziekenhuislaboratoria zullen dan de beschikking hebben over een of meerdere LC-MS opstellingen, een GC-MS, een GC voor alcoholen en een ICP.

Literatuur

Op aanvraag