



EXTRACT

JAARGANG 2018

03 TOXICOLOGISCHE
SCREENING

15 TOXCURSUS
UMC UTRECHT

21 GLYCOLEN

Woord van de redactie

Beste leden, collega's,

Op onze website zag ik dat de laatste versie van het extract alweer drie jaar geleden is uitgebracht. Dat is jammer, het zou mooi zijn als we ons mooie verenigingsblad jaarlijks kunnen uitgeven. Hier is natuurlijk wel kopij voor nodig, en gezien het aantal analisten wat op congressen als het IATDMCT, de KKGt discussiedag en de ALV symposiummiddag (poster)presentaties geeft moet er vaker een Extract uitgegeven kunnen worden. Vergeet het Extract dus niet na een presentatie op zo'n mooi congres!

Voor mij is het Extract ook meer dan een verzameling analysemethoden. Het is ook leuk om te lezen wat er speelt binnen de vereniging én de laboratoria. Onlangs kwam ik de stapel extracten tegen die ik nog altijd bewaard heb, dat leverde zomaar weer een uur vertraging op in de opruimwerkzaamheden waar ik op dat moment mee bezig was. Niet zozeer omdat het niet echt mijn favoriete bezigheid is, maar gewoon omdat ik dan toch de stapel door ga zitten lezen. De artikelen laten mooi zien welke analytische ontwikkelingen de ziekenhuisapothekelaboratoria hebben doorgemaakt, maar ook hoe onze vereniging veranderd is.

Zo las ik in een aantal edities terug dat er zorgen waren omtrent het aantal actieve leden in commissies en bestuur, en de ontwikkeling van de cursussen. Twee punten die de laatste jaren veel aandacht hebben gehad. Mooi om te zien is dat het aantal actieve leden flink toegenomen is,

de commissies en het bestuur zijn goed bezet en daarnaast worden de georganiseerde activiteiten goed bezocht. Uiteraard is het bezoeken van de activiteiten leuk, interessant en informatief voor de leden zelf, maar ook een beloning voor de organiserende commissies.

Dit geldt niet in de laatste plaats voor de cursussen, het opzetten en uitrollen van de nieuwe cursussen heeft veel tijd en energie gekost. En daarnaast is er een nieuwe locatie voor de praktijkcursus bijgekomen, het UMC Utrecht. De eerste edities van de farmaceutische analyse en praktijk cursus waren direct succesvol. In juni ontvingen de eerste negen studenten hun certificaat voor de farmaceutische analyse en juni 2017 volgden tien analisten de praktijkcursus.

De komende jaren zullen wat betreft veranderingen niet minder zijn. Fuserende ziekenhuizen, zelfstandige laboratoria, het zorglandschap in zijn algemeenheid, het gaat allemaal ook de wereld van de ziekenhuisapothek raken. Ik ben benieuwd hoe dit zich ontwikkelt en hoe wij als vereniging hier in mee veranderen. Hopelijk kan ik dat over een aantal jaar weer teruglezen in een stapel Extracten en mezelf weer even een uur ontheffen van opruimwerkzaamheden.... bedankt alvast!

Veel leesplezier, namens het bestuur,

Jeroen den Burger

■ Het Bestuur (secretariaat@nvkfaz.nl)

Ragna Edelman-Meenhorst, Tergooi Ziekenhuis, Blaricum, Voorzitter
Vincent Attevelt, Universitair Medisch Centrum, Utrecht, Penningmeester
Christa Westra, Apotheek Haagse Ziekenhuizen, Den Haag, Secretaris
Jeroen den Burger, OLVG, Amsterdam, Bestuurslid
Henri Robben, Isala, Zwolle, Bestuurslid
Maaïke van Dijk-Nollet, Ziekenhuis Rivierenland, Tiel, Bestuurslid

■ Analyse- en KAM commissie

Erik Olyslager, Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn, Voorzitter
Marie-Therese Vries-Koenjer, Isala, Zwolle, Commissielid
Jeroen den Burger, OLVG, Amsterdam, Afgevaardigde bestuurslid

■ Activiteitencommissie

Annelies Egas, Universitair Medisch Centrum, Utrecht, Voorzitter
Cyrien Linders, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven, Secretaris
Marieke Nooijen, VU Medisch Centrum, Amsterdam, Commissielid
Inge Wilbrink-Pijffers, Deventer ziekenhuis, Commissielid
Henri Robben, Isala, Zwolle, Afgevaardigde bestuur

■ Opleidingscommissie (opleidingen@nvkfaz.nl)

Yvette Nijman-Huisman, St. Jansdal, Harderwijk, Voorzitter
Femy Smit, Medisch Centrum Leeuwarden, Secretaris
Klaas Stienstra, UMC Utrecht, Commissielid
Petra Beunk-Ambrawo, Deventer ziekenhuis, Commissielid
Willemien Katier-Overbeek, Medisch Spectrum Twente, Commissielid
Christa Westra, Apotheek Haagse Ziekenhuizen, Den Haag, Afgevaardigde bestuur

■ Websitecommissie (site@nvkfaz.nl)

Paul Zijlstra, LUMC, Leiden, Voorzitter
Henri Robben, Isala, Zwolle, Afgevaardigde bestuur
Paul Verduin, Meander Medisch Centrum, Amersfoort, Commissielid
Cyrien Linders, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven, Afgevaardigde activiteitencommissie
Erik Olyslager, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn, Afgevaardigde analysecommissie
Klaas Stienstra, UMC, Utrecht, Afgevaardigde opleidingscommissie

■ Adviseurs

Opleidingen
Dr. E.J.F. Franssen; ziekenhuisapotheker, verbonden aan het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis te Amsterdam.

Farmacokinetie
Prof. Dr. D.J. Touw, PharmD, PhD, Hospital Pharmacist - Clinical Pharmacologist /Toxicologist ERT, verbonden aan het Universitair Medisch Centrum Groningen.

Toxicologie
Prof. Dr. D.R.A. Uges; ziekenhuisapotheker, klinisch-forensisch toxicoloog.

Kwaliteitscontrole
Drs. O.S.N.M. Smeets; Wetenschappelijk Instituut Nederlandse Apothekers (WINAP) te Den Haag.

Veiligheid en arbeidsomstandigheden
vacant

INHOUDSOPGAVE

HET BESTUUR	01
VOORWOORD	01
TOXICOLOGISCHE SCREENING	03
TDM VAN MAB'S OP LC-MSMS PLATFORM	10
TUSSENSTAND BELEID NVKFAZ	06
TOXTYPER SCREENING	08
TOXCURSUS UMC UTRECHT	15
MEETONZEKERHEID VLG'S ISO	17
GLYCOLEN	20
FLUCLOXACILLINE	22
VAKBONDSNIEUWS	26
TOXICOLOGISCHE SCREENING OP DE LC-MS EXACTIVE	27
EXTRACTIEPROBLEMEN MET DICHLOORMETHAAN	31
COLOFON	

Toxicologische screening met t-SRM QED-MS/MS

S.M.Bosman, N.A.Stienstra, A.C.Kooij-Egas, E.M.van Maarseveen
Klinisch Farmaceutisch Laboratorium, UMC Utrecht

Samenvatting:

Dit artikel beschrijft een semi-kwantitatieve toxicologische screening op LC-MS/MS met een snelle monstervoorbewerking, korte analysetijd, lage detectiegrens en hoge selectiviteit door gebruik te maken van een geautomatiseerde match op basis van full MS2 spectra met behulp van software.

Introductie:

Een toxicologische screening wordt uitgevoerd als er een (verdenking op) acute intoxicatie door geneesmiddelen, drugs en/of vergiften is bij een patiënt, welke zich meestal op de eerste hulp presenteert. Een robuust systeem dat snel en accuraat componenten identificeert met hoge sensitiviteit en specificiteit is wenselijk gezien de potentieel ernstige gevolgen van een intoxicatie.

Om de bestaande toxicologische screening sneller en accurater uit te kunnen voeren was er in het UMC Utrecht vraag naar een nieuwe analysemethode. Voorheen was de voorbewerking een vloeistof-vloeistof extractie met HPLC-DAD, genaamd STIP (Systematische Toxicologische Identificatie Procedure). Deze methode is tijdrovend zowel qua opwerking als analysetijd. Tevens ontbeert deze methode de gevoeligheid om vele componenten te detecteren bij klinisch toxicologische concentraties en is er veel materiaal nodig. Zodoende is er een nieuwe analysemethode ontwikkeld gebaseerd op een application

note van de LC-MS/MS leverancier (ThermoFisher Scientific)¹ gebruikmakend van minder materiaal, een eenvoudigere opwerking en snellere uitwerking ten opzichte van HPLC-DAD. Deze methode wordt hieronder beschreven.

Materiaal/Methode:

De monstervoorbewerking was een snelle opschoning met Phree tubes® voor fosfolipidenverwijdering om matrixeffect te minimaliseren. De analyse vond plaats met t-SRM (timed-selected reaction monitoring) in combinatie met QED-MS/MS (Quantitation Enhanced data dependent MS/MS).

Chemicaliën en reagentia

Water ULC/MS grade was van Biosolve (Valkenswaard, Nederland). Ammoniumformaat, Acetonitril met 0.1% mierenzuur ULC/MS grade en coffeïne¹³C₃ zijn ingekocht bij Sigma Aldrich (Steinheim, Zwitserland). Mierenzuur was afkomstig van Merck (Darmstadt, Duitsland). Blanco humaan serum werd ingekocht bij Bio-rad (Irvine, Verenigde Staten). De Phree Phospholipid Removal Tabbed 1ml Tubes kwamen van Phenomenex (Utrecht,

Nederland). Haloperidol-d₄ was van Santa Cruz (Huissen, Nederland) en Amiodaron-d₄ was van Artmolecule (Poitiers, Frankrijk)

Apparatuur

De analyse werd ontwikkeld op een triple quadrupole Quantum Access Max LC-MS/MS met een Dionex Ultimate 3000 pomp, autosampler en kolomcompartiment. De apparatuur en de softwarepakketten Xcalibur en TOXID zijn afkomstig van Thermo Fisher Scientific.

Chromatografie

De kolom was een Hypersil Gold aQ, 1.9 µm, 150x2.1 mm van Thermo Fisher Scientific (Breda, Nederland). De kolomtemperatuur was 50°C. De mobiele fase bestond uit 10mM ammoniumformaat in 0.1% mierenzuur in water (A) en 0.1% mierenzuur in acetonitril (B). Het gradiënt bestond uit 95%A en 5%B, na 0.5 min nam B van 5% naar 95% toe tot 12.48 min. Bij 12.50 min nam B weer af tot 5% tot 13 min en in de laatste 2 minuten werd er in de beginsamenstelling gestabiliseerd. De flow was 300 µl/min en het injectievolume was 10 µl.

MS/MS instellingen

Er werd met t-SRM in combinatie met QED-MS/MS gemeten met de volgende instellingen: Capillary Temperature 270°C, Vaporizer Temperature 350°C, Sheath Gas Pressure 35.0 AU, Ion Sweep Gas Pressure 0.0, Aux Valve Flow 15.0, Positive Polarity -3500 en Negative Polarity -3200.

Opwerking

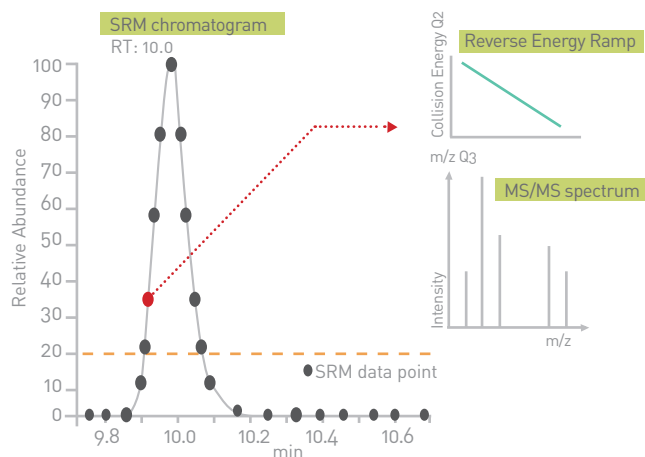
Er werd 300 µl 1% mierenzuur in acetonitril midden in een Phree tube gepipetteerd. Vervolgens werden 50 µl interne standaard (haloperidol-d₄ 0,05 mg/L, amiodaron-d₄ 0,75 mg/L en coffeïne¹³C₃ 1 mg/L in acetonitril) en 100 µl blanco/monster toegevoegd en 30 seconden gevortexd. Tot slot vond er een filtratie plaats, werd het extract droog gedampt en opgelost in 100µl 5-95 v/v 0.1% mierenzuur in acetonitril/water, hiervan werd 10 µl geïnjecteerd op het LC-MS/MS systeem.

Ontwikkeling methode LC-MS/MS

De methode werd eerst ontwikkeld voor tien stoffen geselecteerd op basis van een grote verscheidenheid aan eigenschappen tussen deze stoffen, zoals zuur/base, lage/hoge log P en lage/hoge eiwitbinding. Daarna zijn de overige componenten toegevoegd. De instellingen met betrekking tot de massa transitities, botsingsenergie en tubelens kwamen van routine-analyses, uit data van infuseren van de component of zijn uit de literatuur verkregen. Vervolgens is een hoogtherapeutische concentratie aangemaakt in eindoplossing en is er 10 µl van deze eindoplossing geïnjecteerd op de LC-MS/MS.

Met deze oplossing werden de retentietijd, trigger en full-scanspectrum bepaald, welke werden toegevoegd aan de bibliotheek. De bibliotheek is door het UMC Utrecht opgebouwd en bestaat uit meer dan 280 componenten geselecteerd op basis van de STIP bibliotheek, de TIAFT lijst (The International Association of Forensic Toxicologist geraadpleegd op 1 augustus 2016), het handboek Medical Toxicology (derde editie), en de stofmonografieën beschikbaar op www.toxicologie.org. De drempelwaarde is ingesteld op een signaal 100x lager dan dat van de hoogtherapeutische concentraties per component.

Wanneer de intensiteit van de SRM transitie hoger is dan de drempelwaarde wordt de QED detectie geactiveerd om full MS/MS spectra op te nemen. De full-scan wordt opgenomen door de botsingsenergie stapsgewijs te verhogen van 15 tot 35 eV (figuur 1). Deze full MS/MS spectra worden vervolgens vergeleken met de eerder genoemde spectra in de bibliotheek.

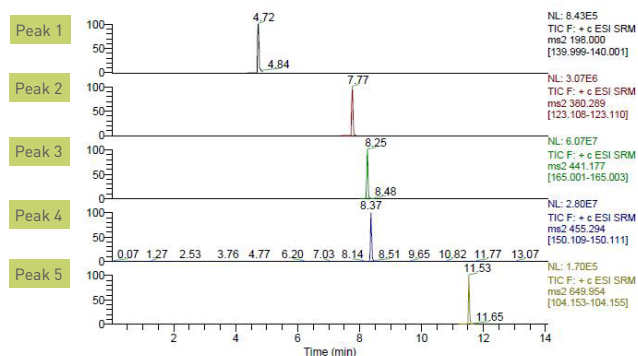


Figuur 1: QED detection mode: when a monitored SRM transition reaches a targeted threshold, a full MS2 spectrum is acquired using a Reverse Energy Ramp scan. 1

Resultaten en discussie

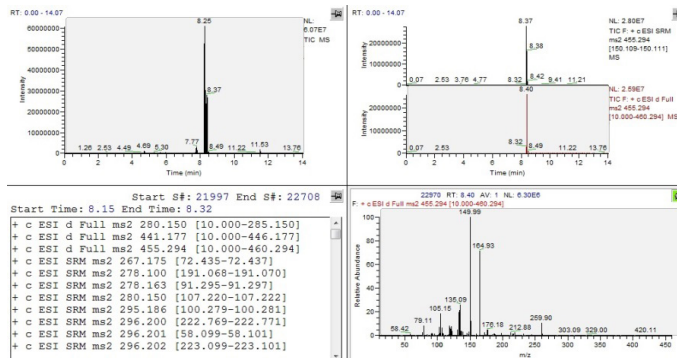
Er is een KKGt tox casus gemeten, en verapamil, norverapamil en de drie interne standaarden zijn gevonden. De resultaten op de rapportage (figuur 2) worden gecontroleerd, om vals positieve uitslagen te voorkomen.

Screening Conditions: Based on SRM and MS2 scans.



Peak Number	Compound Name	Code	SI	RSI	m/z	Expected RT	Actual RT	Intensity	Library Name
1	Caffeine-13C3	i	772	817	198.000	4.69	4.72	843410	umcu
2	Haloperidol-d4	i	791	854	380.289	7.64	7.77	3066411	umcu
3	Norverapamil	p	762	774	441.177	8.25	8.25	60707728	umcu
4	Verapamil	p	799	813	455.294	8.37	8.37	28022516	umcu
5	Amiodaron-D4	i	864	886	649.954	11.45	11.53	170308	umcu

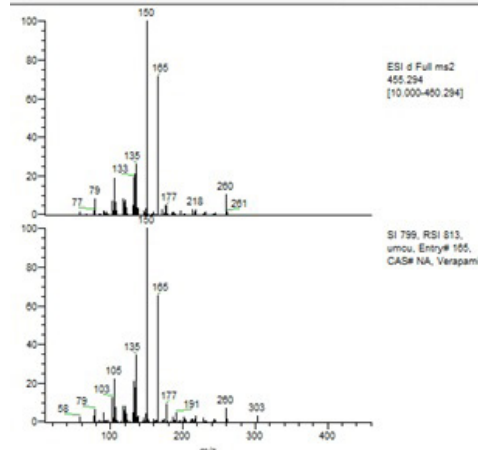
Figuur 2: Rapportage, Verapamil en Norverapamil aangetoond.



Figuur 3: Linksboven; TIC (Total Ion Current) plot. Linksonder; Full scan en SRM in 8.15 – 8.32 min. Rechtsboven; SRM overgang van 455.294D150.11 en full scan van massa 455.294. Rechtsonder; fullscan spectrum van 455.294

De full-scan spectra worden als volgt vergeleken met de spectra in de bibliotheek (figuur 3). Linksboven is een chromatogram met alle pieken van de SRM overgangen. Daaronder kan een tijdswindow geselecteerd worden (8.15-8.32 min in voorbeeld van figuur 3). In deze tijdsperiode zijn eerst de Full scans te zien en daarna de SRM transitities. De Full scan en SRM pieken kunnen rechts bovenin bekeken worden door ze hier heen te slepen. De bovenste is een SRM- en de onderste een Fullscan chromatogram. De Fullscan kan rechtsonder geopend worden, dan wordt het spectrum zichtbaar en deze kan vergeleken worden met de spectra in de bibliotheek (figuur 4).

Hit	SI	RSI	Prob	Name	Library Name
1	799	813	98.98	Verapamil	umcu
2	547	609	0.98	Norverapamil	umcu
3	260	265	0.00	Ethosuximide	umcu
4	244	644	0.00	Pioglitazon-d4	umcu
5	243	253	0.00	Codeine	umcu



Figuur 4: Resultaat van de bibliotheek (Verapamil), op basis van het Fullscan spectrum

Een positieve uitslag wordt gegeven op basis van een combinatie van data met betrekking tot retentietijd, signaalhoogte en full MS2 spectrum. De concentratie kan semi-kwantitatief berekend worden met behulp van een database. Er wordt gerekend met de ratio (oppervlakte piek component/oppervlakte piek interne standaard). Voor de ratio wordt er gebruik gemaakt van 3 interne standaarden, van 0 tot 6 min wordt er met coffeïne-13C3, bij 6-10 min met haloperidol-d4 en van 10-15 min met amiodaron-d4 gerekend.

In de database is de ratio bij hoog therapeutische concentraties opgeslagen, door kruislings te vermenigvuldigen kan semi-kwantitatief het gehalte berekend worden. Het is semi-kwantitatief omdat de gevoeligheid van de LC-MS/MS kan variëren van dag tot dag, er recoveryverschillen tussen monsters kunnen bestaan en er geen volledige correctie voor het matrixeffect plaatsvindt.

Om te corrigeren voor eventuele vervuiling van het LC-MS/MS systeem, vanuit de omgeving of door de opwerking wordt er altijd een blanco monster meegenomen.

LC-MS/MS validatie

Voor de LC-MS/MS methode is de sensitiviteit en selectiviteit voor 67 componenten getest op 2 verschillende LC-MS/MS-en en met een nieuwe kolom. De sensitiviteit is het percentage positieve hits en de selectiviteit is het percentage vals positieve hits.

De resultaten waren (tabel 1):

Tabel 1. Validatieresultaten, sensitiviteit is het percentage positieve hits, selectiviteit is het percentage vals positieve hits.

	Sensitiviteit (%)	Selectiviteit (%)
TSQ Acces Max A	95.5	10
TSQ Acces Max A met nieuwe kolom	91.0	10
TSQ Acces Max B	83.6	6

STIP vs LC-MS/MS validatie

Er zijn 10 onbekende monsters van vermeende geïntoxiceerde patiënten met de STIP en met de LC-MS/MS geanalyseerd. Er waren 2 positieve hits bij de STIP methode en 7 positieve hits bij de LC-MS/MS methode. Dit kan verklaard worden doordat de LC-MS/MS methode vele malen gevoeliger is door MS/MS detectie in vergelijking met DAD. Een aantal componenten bevonden zich daarnaast onder de elutiepiek (bij de STIP), zoals baclofen en enalapril. En tot slot bevatte de gebruikte bibliotheek van de STIP niet dezelfde componenten als de bibliotheek van de LC-MS/MS.

De voordelen van de hier beschreven methode t.o.v. de STIP methode zijn, dat een chromofoor niet vereist is voor detectie, dat de monstervoorbewerking snel en eenvoudig is met 15 minuten, en dat er weinig patiëntenmateriaal nodig is. Daarnaast bedraagt de analysetijd slechts 15 minuten, kent de methode een lage LOD en een hoge selectiviteit door MS/MS spectra. Ook kan er semi kwantitatief een concentratie bepaald worden en zijn relatief hydrofiele/polaire componenten goed te detecteren, welke bij de STIP deze onder de elutiepiek (<2min) komen.

De nadelen van deze methode zijn dat niet alle componenten te analyseren zijn, bijvoorbeeld digoxine en ibuprofen. Als een component daarnaast vooraf niet aan de methode/bibliotheek is toegevoegd wordt deze vanzelfsprekend niet gevonden.

Bij de STIP methode is het daarentegen mogelijk een piek te zien bij stoffen met een UV spectrum en kon dat achteraf nog worden bekeken. En tot slot zijn er vals-positieve hits mogelijk door de hoge gevoeligheid. Ter preventie worden de spectra die op de rapportage staan bekeken, gecontroleerd en tevens wordt er een blanco monster meegenomen om eventuele vervuiling van het systeem te monitoren.

Conclusie

Er is een snelle en betrouwbare toxicologische screening methode voor meer dan 280 componenten ontwikkeld. Er wordt geïdentificeerd m.b.v. een bibliotheek op de TSQ Quantum Access Max en semi-gekwantificeerd met een database. Doordat er op een Triple Quad massa spectrometer gewerkt wordt is deze screeningmethode ook voor andere laboratoria toepasbaar.



Literatuur:

1. Application note 536 Thermo Fisher Scientific
2. LC-MS in Drug Analysis, Methods en Protocols, Loralie J. Langman, Christine L. H. Snozek, ISBN 9781617799334
3. Applications of LC-MS in toxicology, A. Poletti, ISBN 0853696292
4. Handbook of Medical Toxicology, P. Viccellio ISBN 0316902470
5. www.toxicologie.org
6. www.tiaft.org

TDM van mAb's op LC-MS/MS platform: historie en heden

dr. Erik van Maarseveen
ziekenhuisapotheker/klinisch
farmacoloog

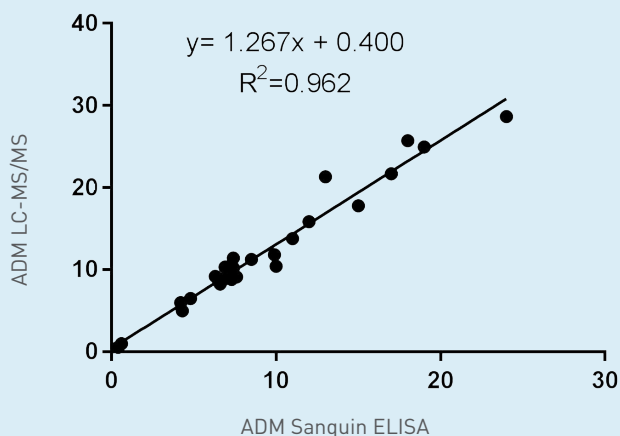
Rond 2013 inventariseerden we de bestaande technieken om monoclonale antilichamen (mAb's) in humaan serum te kwantificeren. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA's) of Radiolimmuno-Assays (RIA's) waren destijds de analysetechnieken van voorkeur.

Deze technieken halen de benodigde detectie-grenzen. Echter, inherent aan de technologie bestaat er een reëel risico op vals positieve en vals negatieve uitslagen, zoals ook bij 'small molecules'. Daarnaast blijken de onderlinge correlaties tussen de analyse-resultaten van deze assays matig. Als alternatief kwam er recent een nieuwe techniek in opkomst met behulp van uiterst gevoelige 'tweede generatie'-LC-MS/MS technologie. Naast voordelen zoals bredere lineair bereik, sneller methodeontwikkelingstijd en een hogere nauwkeurigheid, biedt LC-MS/MS vooral een hogere specificiteit in vergelijking met andere technieken (1). Door de aanwezigheid van ruime ervaring op ons laboratorium met LC-MS/MS zijn we de toepasbaarheid van LC-MS/MS voor mAb kwantificatie gaan

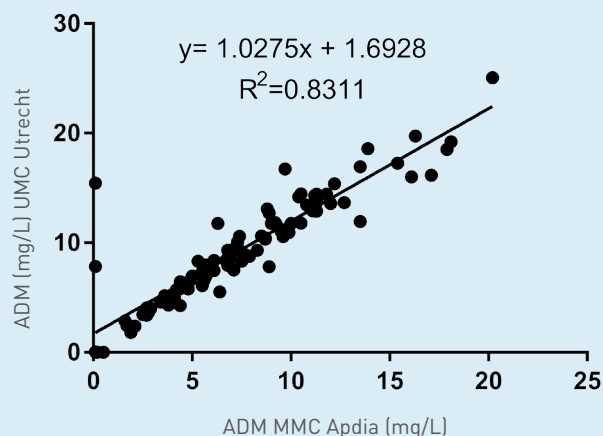
exploreren. Onze toekomstvisie daarbij was de oprichting van een platform ter kwantificering van mAb's met LC-MS/MS in biomatrices ten behoeve van TDM en (klinisch) farmacologisch onderzoek. Gezien de vele aanvragen voor routine TDM werd infliximab (IFX) geselecteerd als testcase. In Mei 2016 werd de IFX methode gevalideerd en werd gestart met het intern aanbieden van deze test (2). Gebruikmakend van dezelfde opwerking hebben we begin van 2018 een gemodificeerde versie gevalideerd waarbij simultaan IFX en adalimumab (ADM) werden gemeten (3). Onze combi-LC-MS/MS methode van IFX en ADM zijn vergeleken met bestaande assays van Sanquin en ApDia [zie figuren 1 t/m 3]. De ADM resultaten lagen binnen 27%. De vergelijking van IFX met de assay van Sanquin resulteerde in ongeveer 40%

hogere waarden. Het laatste is overigens geen aanleiding tot aanpassing van de referentiewaarden, aangezien de Sanquin assay in vergelijking met andere ELISA assays laag meet (- 20-40% i.v.m. Apdia en Labcorp; zie figuur 4). Daarnaast zijn de huidige referentiewaarden gebaseerd op studies waarin gebruik is gemaakt van een combinatie van deze testen. Om een compleet pakket aan testen te kunnen aanbieden is er tevens een anti-drug-antibody (ADA) bepaling ontwikkeld voor infliximab en adalimumab met LC-MS/MS. De IFX en ADM bepalingen met LC-MS/MS voldoen aan de strenge EMA-validatierichtlijnen in tegenstelling ELISA-gebaseerde assays en worden uitgevoerd onder ISO15189/CCKL-condities (het laboratorium bevindt zich momenteel in de transitiefase).

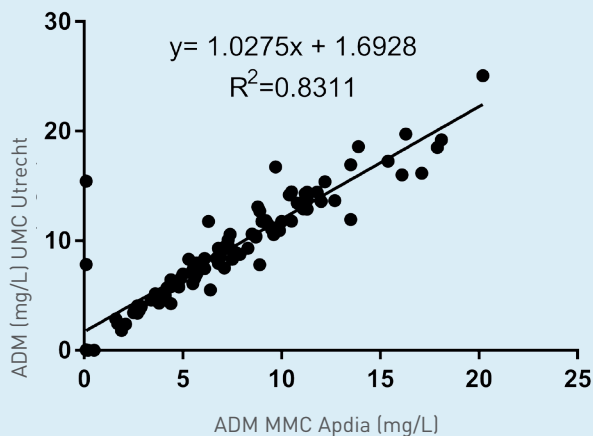
Figuren:



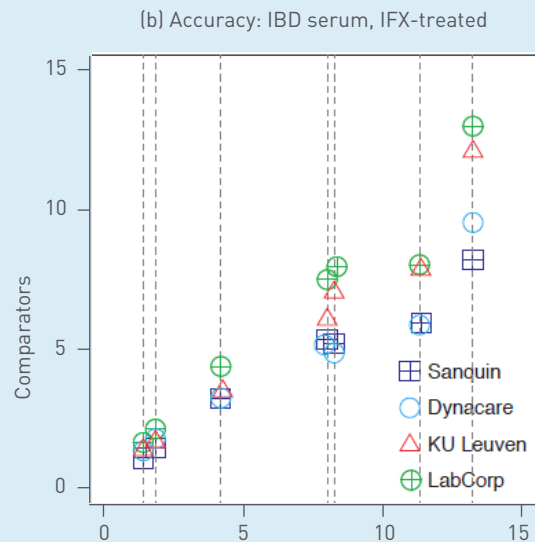
Figuur 1



Figuur 2



Figuur 3



Figuur 4

*IFX assays: raw data from IFX assays are plotted here as comparator assay versus Janssen assay. REF: Marini et al., 2016 The AAPS Journal.

Methodeontwikkeling op het antilichamen LC-MS/MS platform:

toekomst

Door Mohsin El Amrani, ontwikkelanalist/PhD student, apotheek UMC Utrecht **Tussen 2016 en 2018 hebben we succesvol aan meerdere projecten gewerkt met verschillende interne afdelingen.**

Zoals de kwantificatie van totaal plasma dinutuximab bij kinderen met neuroblastoom kinderanker in samenwerking met het 'Laboratory of Translational Immunology' (LTI) [4]. Samenwerking met de afdeling Klinische Chemie leidde tot de kwantificering van stollingsfactor VIII in patiënten met hemofilie A. De samenwerking met afdeling LTI wordt momenteel uitgebreid met een project rondom het opzetten van een analyse methode om M-proteïnes in plasma van patiënten met Kahler te kwantificeren met behulp van tweedimensionale LC gekoppeld aan een hoge

resolutie MS (Q-Exactive Orbitrap). LC-MS kan lagere detectiegrenzen behalen dan de gebruikelijke serum eiwit elektroforese, waardoor patiënten beter kunnen worden gemonitord met betere behandeluitkomsten als ultieme doel. Tot slot zijn we nu tevens in staat om de opgedane kennis tijdens het opzetten van totaal dinutuximab methode toe te passen op andere mAb's. Een batchrun met simultane bepaling van meerdere monoclonale antilichamen ligt binnen handbereik door gebruik te maken van een universele opwerking in combinatie met LCMS.

LC-MS kan lagere detectiegrenzen behalen dan de gebruikelijke serum eiwit elektroforese, waardoor patiënten beter kunnen worden gemonitord met betere behandeluitkomsten als ultieme doel. Tot slot zijn we nu tevens in staat om de opgedane kennis tijdens het opzetten van totaal dinutuximab methode toe te passen op andere mAb's. Een batchrun met simultane bepaling van meerdere monoclonale antilichamen ligt binnen handbereik door gebruik te maken van een universele opwerking in combinatie met LCMS.

Referenties

- (1) El Amrani M, Donners A, Huitema A, van Maarseveen EM, manuscript in preparation
- (2) El Amrani M1, van den Broek MP, Göbel C, van Maarseveen EM, J Chromatogr A. 2016 Jul 8;1454:42-8
- (3) El Amrani, van Maarseveen, submitted.
- (4) El Amrani M, Szanto C, Hack E, Nierkens S, Huitema A, van Maarseveen E, accepted for publication in Analytical and Bioanalytical Chemistry

Tussenstand beleidsplan

NVKFAZ 2015-2020

Liesbeth de Wolf

Op de ALV van 2018 heb ik de tussenstand van het 5-jarige beleidsplan van de NVKFAZ gepresenteerd. Voor deze editie van het Extract wil ik deze tussenstand graag delen, zodat iedereen kan lezen waar de NVKFAZ nu staat en mee bezig is.

Hiervoor ga ik eerst terug naar de beleidsdag in januari 2016 toen we dit beleidsplan hebben gemaakt. Het bestuur en de opgegeven leden hebben toen in groepen de volgende 3 thema's besproken:

- ▶ Communicatie
- ▶ Organisatie/structuur/financiën
- ▶ Veranderingen in het werkveld

Per thema bespraken we ten eerste wat goed ging (trots op) en of hierbij aanvullende wensen waren (tabel 1). Ten tweede keken we naar de verbeterpunten en hoe we die konden realiseren (tabel 2). Vervolgens zijn al deze punten geclusterd. Aansluitend konden de aanwezigen stemmen welke items de meeste aandacht verdienden. Dit waren de 'splitsing van de opleidingen', en 'nieuwe analisten informeren over de NVKFAZ' (in de tabellen aangegeven met een *).

Al deze informatie heeft geleid tot het beleidsplan 2015-2020 met als titel: Wervelend naar 2020. Dit beleidsplan is gepresenteerd op de ALV in 2016.

Nu zijn we 2 jaar verder en tijd om de tussenstand op te maken. Onderstaande 2 tabellen zijn overgenomen uit het beleidsplan. In het **groen** heb ik de items gezet die gerealiseerd zijn. De **oranje** tekst staan de items die (nog) niet gerealiseerd zijn.

Terugkijkend ben ik super trots op wat de NVKFAZ allemaal bereikt heeft, met hulp van alle (actieve) leden. De grootste mijlpaal is dat splitsing van de opleidingen is voltooid en in januari 2018 de cursus

Trots op	Aanvullende wens
Website en webmail	<ul style="list-style-type: none">• Mail met nieuwe website-items 14 december 2017 1 ^e Nieuwsflits!
Splitsing opleidingen*	<ul style="list-style-type: none">• Cursussen op maat maken; Keuze gemaakt voor totaalpakket, niet modulair• Mogelijkheden e-learning onderzoeken Polen op HA-overleg
Bestuur en commissies functioneren goed	<ul style="list-style-type: none">• Goede bezetting in bestuur en commissies Wel plek bij analyse- en opleidingscommissie
Heldere organisatiestructuur	<ul style="list-style-type: none">• Taken binnen vereniging definiëren en zichtbaar maken. Taakomschrijving is gewenst: in de pijplijn.
Lage contributie	<ul style="list-style-type: none">• Continueren blijkt haalbaar

Items waar we trots op zijn, binnen de NVKFAZ.

Farmaceutische Anayse van start is gegaan. In 2019 zal de cursus TDM, Tox en Farmacogenetica starten. En naast deze 2 theoretische cursussen wordt jaarlijks de praktische cursus Klinische Toxicologie in het UMCU gegeven.

Ook is de zichtbaarheid van de vereniging vergroot. Dit is dankzij de Nieuwsflits, flyer, jongerendag, bewijs van deelname/inzet en het hoofdanalistenoverleg. Hierdoor is de meerwaarde van onze activiteiten duidelijker zichtbaar voor o.a. niet-leden, leidinggevend en apotheekcollega's. Actieve leden kunnen ook bijdragen aan de zichtbaarheid door activiteiten van de NVKFAZ te posten op LinkedIn. Het levert veel views op. Zoals jullie zien zijn niet alle items gerealiseerd. Daar wordt hard aan gewerkt, en hier we kunnen jouw hulp bij gebruiken.

Kijk op www.nvkfaz.nl voor de activiteiten of bij welke commissie je een bijdrage kunt leveren. Ook als je nog geen lid bent, kun je aanmelden via deze website.

Lees verder op de volgende pagina

Verbeterpunt	Te realiseren door
Social media moet meer ingezet worden. (facebook, linkedIn)	<ul style="list-style-type: none"> • Forum starten op social media • Discussie starten op LinkedIn Activiteiten delen op LinkedIn, veel views.
Zichtbaarheid NVKFAZ vergroten. Hierdoor verjonging en vernieuwing van actieve leden realiseren	<ul style="list-style-type: none"> • Nieuwsbrief sturen aan leden en instellingen • Samenwerking met CAT intensiveren; bekendheid bij ziekenhuisapothekers; Bij splitsing opleidingen contact gehad + PUOZ labdag • Labs zonder leden actief benaderen; flyers
Nieuwe analisten informeren over NVKFAZ*	<ul style="list-style-type: none"> • Powerpoint maken voor nieuwe analisten; flyers • Contactpersoon per lab is de 'ambassadeur' voor nieuwe collega's; Nog niet concreet • Toegevoegde waarde van lidmaatschap uitdragen; Bewijs deelname/inzet
Opkomst activiteiten is laag (= verbeterd)	<ul style="list-style-type: none"> • Promoten per lab 1 afgevaardigde • Vergaderen buiten werktijd/einde vd dag • Punten toekennen aan activiteiten • Meerwaarde aantonen bij ZA en LG Bewijs van deelname/inzet + bespreken bij HA-overleg
Regio-overleg en VR loopt terug	<ul style="list-style-type: none"> • Goede onderwerpen uitwisselen per regio • VR laten adviseren over inhoud regio-overleg Verschillen per regio. VR = gelegenheidsraad.
Structurele inkomsten genereren uit commerciële hoek	PR afspraken + sponsorpakketten
Werkgroepen instellen die inspelen op actualiteit	<ul style="list-style-type: none"> • Commissie kwaliteit in het leven roepen Deze wordt gecombineerd met de analysecommissie <ul style="list-style-type: none"> • Analisten aanstellen als auditor RvA; Haalbaarheid onderzocht; geen optie
Scheiding apotheeklab en KCL vervaagd	<ul style="list-style-type: none"> • Vergelijkbare verenigingen opzoeken en samenwerken (bijv. NVML) NVFZ, NVKC (beide op bestuursniveau)

Items die verbeterd kunnen worden, binnen de NVKFAZ.

Vanwege een nieuwe baan buiten de ziekenhuisfarmacie, heb ik helaas afscheid moeten nemen als voorzitter. Bij dit afscheid werd ik verrast door het prachtige onderstaand beeld. Het symboliseert voor mij mooi de kracht van de vereniging: kennisdeling en groei, voor en door analisten.

Ik heb al het vertrouwen dat jullie dit motto voortzetten. Nogmaals dank voor ieders inbreng en inzet. Veel succes en vooral plezier in/met deze mooie vereniging!

Liesbeth de Wolf

TDM op het Toxyter screeningsysteem

Bepaling van 3 antidepressiva en hun metabolieten met behulp van Iontrap-LC/MS

C.C. Korteweg, S.R. Huisman, M. Bouma, K.G. Dekens

Klinisch Farmaceutisch Laboratorium, Martini Ziekenhuis Groningen

Samenvatting

Er is een methode ontwikkeld en gevalideerd voor bepaling van citalopram, (N-)desmethylcitalopram, fluvoxamine, venlafaxine en (O-)desmethylvenlafaxine in serum. De methode is gebaseerd op vloeistof-vloeistof extractie waarna analyse plaatsvindt met UPLC (ultra performance liquid chromatography), ionisatie met ESI (electron spray ionisation) en selectie/detectie met een iontrap-massa spectrometer. Voor kwantificatie wordt de respons gebruikt, bestaande uit de som van de intensiteit van fragment-ionen (MS₂) die ontstaan uit de precursor (MS). De methode is zeer nauwkeurig en gevoelig maar bewerkelijk.

Inleiding

Het klinisch farmaceutisch laboratorium van het Martini Ziekenhuis in Groningen beschikt over een LC/MS systeem met bijbehorende screeningsapplicatie genaamd Toxyter® van Bruker Daltonics (Billerica, Massachusetts, Verenigde Staten). Het bestaat uit een UPLC-systeem van Thermo Fischer Scientific (Walther, Verenigde Staten) met een amaZon-speed® iontrap-MS detector en bijbehorende software die samen een kant en klaar systeem vormen voor het uitvoeren van kwalitatieve screenings op geneesmiddelen en drugs in onder andere serum of urine. De basis van de methode is een eiwitprecipitatie gevolgd door een analyse van 11 minuten waarbij gescreend wordt op meer dan 900 stoffen. Naast deze toepassing wordt gewerkt aan andere bepalingen om optimaal gebruik te maken van het systeem. Zo wordt een semi-kwantitatieve uitbreiding van de screening momenteel gevalideerd en zijn ook methodes voor TDM

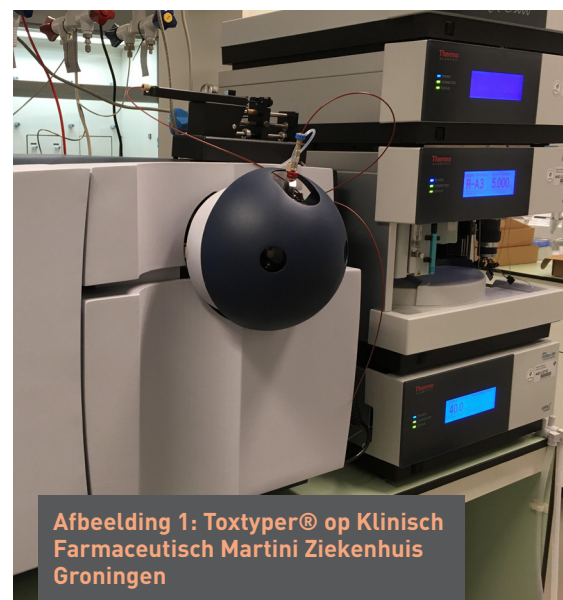
(therapeutic drug monitoring) in ontwikkeling. In het algemeen zijn voor TDM veel methodes beschreven, vaak gebruik makend van een triple-quadrupole LC/MS. Deze robuuste, gevoelige en relatief betaalbare systemen zijn uitgegroeid tot de huidige standaard op TDM gebied.

Methodeontwikkeling

Na succesvolle introductie met screenings op de Toxyter® was de wens om ook TDM-analyses op te zetten waarmee wij ons aanbod aan analyses konden uitbreiden. Met het buffersysteem en analytische kolom van de Toxyter® is gezocht naar een combinatie van analyten die goed samen te analyseren zijn. Ondanks dat met UPLC smalle analytische pieken worden verkregen, elueren veel analyten nog tegelijk. Hierdoor kunnen minder datapunten per piek worden verzameld. Dat bemoeilijkt de reproduceerbaarheid. De meetnelheid is hierin de beperkende factor. Daarnaast worden dedicated interne standaarden gebruikt. Dit zijn gedeutereerde isotopen van de te meten componenten die co-elueren en ook tegelijk gemeten moeten worden. Andere analyten moeten dus volledig chromatografisch gescheiden zijn. Hiervoor is de UPLC-gradiënt geoptimaliseerd. Venlafaxine, desmethylvenlafaxine, citalopram, desmethylcitalopram en fluvoxamine kwalificeerden als eerste met goede scheiding. Voor venlafaxine, desmethylvenlafaxine en fluvoxamine was nog geen methode in huis. Voor citalopram met desmethylcitalopram was een LLE (liquid-liquid extraction) met HPLC-DAD (high performance liquid chromatography, diode array detection) methode in gebruik voor TDM. Deze vorige methode had

een meetbereik van 10-200 µg/l. Er was een monstervolume nodig van 1000 µl en storingen in het chromatogram door co-elutie van andere stoffen kwamen regelmatig voor. Als monstervoorbewerking voor de nieuwe methode zijn onder andere eiwitprecipitatie en LLE getest, waarbij de beste resultaten met LLE werden verkregen. Bij de rekenmethode wordt als meetsignaal de som van de fragment-ionen per analyt gebruikt. Hiermee wordt specifiek gemeten en alsnog het verlies van gevoeligheid geminimaliseerd. De nieuwe methode, genaamd antidepressiva 1, is volledig gevalideerd en in gebruik genomen voor TDM.

Materiaal en Methoden



Afbeelding 1: Toxyter® op Klinisch Farmaceutisch Martini Ziekenhuis Groningen

Chemicaliën, referentiestoffen en matrices

Alle gebruikte reagentia zijn van LC/MS kwaliteit (1, 2, 3, 8) of farmaceutische kwaliteit (4, 6, 9) en de blanco sera van gecertificeerde leveranciers (5, 7). Citalopram 1 mg/ml¹, N-desmethylcitalopram 1 mg/ml¹, Fluvoxamine 1 mg/ml¹,

O-desmethylvenlafaxine 1 mg/ml¹, Venlafaxine 1 mg/ml¹, Citalopram-D6 1 mg/ml¹, N-desmethylcitalopram-D3 1 mg/ml¹, Fluvoxamine-D3 1 mg/ml¹, O-desmethylvenlafaxine-D6 1 mg/ml¹, Venlafaxine-D6 1 mg/ml¹, Dichloormethaan², Stikstof⁴, Coffeine 1 mg/ml¹, Paracetamol⁶, Promethazine 1 mg/ml¹, Amitriptyline 1 mg/ml¹, Blanco kalfserum⁵, Blanco Humane sera⁷, Hemoglobine Humaan³, Bilirubine³, Intralipid 20%⁹, Dimethylsulfoxide⁸, Acetonitril⁸, Methaan², Ammoniumformiaat³, Natriumhydroxide⁸.

Leveranciers reagentia:

1: Lipomed AG, Arlesheim, Zwitserland, **2:** VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, Verenigde Staten, **3:** Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, Missouri, Verenigde Staten, **4:** Linde AG, München, Duitsland, **5:** Stichting KKG, Den Haag, Nederland, **6:** Spruyt-Hillen B.V., IJsselstein, Nederland, **7:** Valley Biomedical Inc., Winchester, Virginia, Verenigde Staten, **8:** Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland, **9:** Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Duitsland.

Reagentia

De Kalibratoren en validatiemonsters zijn bereid in blanco kalfs-serum m.u.v. monsters voor commuteerbaarheid (in humaan serum) en de niet opgewerkte standaarden voor de recoverybepaling en selectiviteit (in reconstitutievlloeistof).

Component / Level	K1 V1	K2 V2	K3 V3	K4 V3 V3	K5	K6	K7 V4	K8
Citalopram	5	35	65	90	120	145	175	200
Desm. Citalopram	5	35	65	90	120	145	175	200
Desm. Venlafaxine	20	140	260	360	480	580	700	800
Fluvoxamine	12,5	87,5	162,5	225	300	362,5	437,5	500
Venlafaxine	20	140	260	360	480	580	700	800

Tabel 1: Kalibratoren (K) en validatiemonsters (V), niet opgewerkte standaarden (V), concentraties per level in µg/L

Interne standaard: Citalopram-D6: 20 µg/l, Desmethylcitalopram-D3: 20 µg/l, Demethylvenlafaxine-D6: 60 µg/l, Fluvoxamine-D3: 40 µg/l, Venlafaxine-D6: 60 µg/l
Selectiviteitsmonster: Kalibrator K4 met Paracetamol 10 mg/L, Coffeine 10 mg/L, Amitriptyline 100 µg/L Natriumhydroxide 2 M, in aqua dest.

Reconstitutievlloeistof, 82% Mobiel fase A in Mobiele fase B
Mobiele fase A, 1% acetonitril in 2 mMol ammoniumformiaat met 0,1% mierenzuur
Mobiele fase B, 99% acetonitril in 2 mMol ammoniumformiaat met 0,1% mierenzuur

Apparatuur

UPLC: Dionex Ultimat 3000™
Thermo Fischer Scientific
Analytische kolom: Acclaim™ RSLC 120 C18 2,2 µm, lengte: 200 mm, diameter: 2,1 mm, Thermo Fischer Scientific
Voor kolom: VanGuard™ BEH C18 1,7µm, Thermo Fischer
Detector: AmaZon Speed, ESI-Iontrap Massaspectrometer, Bruker
Randapparatuur: Roteerapparaat; Centrifuge; Vacuümpomp; Indampblok; Vortex; Ultrasoonbad, VWR International

Monstervoorbewerking

50 µl monster, 200 µl interne standaard,
100 µl natriumhydroxide 2M en 5 ml dichloormethaan is in een glazen centrifugebuis gepipetteerd. De buizen zijn 20 minuten geëxtraheerd door te roteren met 35 rpm. Vervolgens zijn de buizen 5 minuten gecentrifugeerd bij 10.000g en is de waterige bovenlaag afgezogen. De dichloormethaanlaag is overgebracht naar een schone puntbuis en ingedampt bij 30°C onder stikstof. Het residu is opgenomen in 100 µl heroplosvlloeistof door 10 seconden te vortexen en 2 minuten te ultrasoneren. Van het extract is 5 µl geïnjecteerd op de UPLC-MS. Voor reguliere analyse worden monsters in duplo opgewerkt.

Instellingen UPLC

Flow: 0,500 ml/min

UPLC gradient verloop	
Tijd (min.)	Mobiele fase B%
0 - 1,5	18,0%
1,5 - 4,0	18,0 → 21,5%
4,0 - 7,0	25,0 %
7,0 - 12,0	25,0 → 28%
12,0 - 13,0	18,0 %

Tabel UPLC gradient verloop

Injectievolumen: 5 µl

Instellingen ESI

Nebulizer: 2,0 bar
Dry gas: 10 L/min
Dry temperature: 320°C

Instellingen MS

ICC target (iontrap charge control): 200.000
Max accumulation time: 50 ms
Scan speed: 32.000 m/z/s
Scan range: 100-350 m/z
Ion polarity: Positive
EIC (extracted ion chromatogram) per analyt: zie tabel 2.

Analyt	Precursor m/z	CID ampl %	m/z F1	m/z F2	m/z F3
Citalopram	325.1	80	109.0	262.0	280.0
Citalopram-D6	331.1	80	109.0	262.0	280.0
Desm. Citalopram	311.1	80	109.0	262.0	280.0
Desm. Citalopram-D3	314.1	80	109.0	262.0	280.0
Desm. Venlafaxine	264.2	70	246.0	-	-
Desm. Venlafaxine-D6	271.2	70	252.0	-	-
Fluvoxamine	319.2	65	200.0	226.0	228.0
Fluvoxamine-D3	322.2	65	200.0	226.0	228.0
Venlafaxine	278.0	70	260.0	-	-
Venlafaxine-D6	284.0	70	198.0	240.0	266.0

Tabel 2: Instellingen voor MS-detectie per analyt. De m/z van precursor-ionen (MS) en m/z van de fragment-ionen (MS2) waarvan de som van de intensiteiten (EIC) wordt gebruikt voor kwantificatie. CID amplitude is de Collision Induced Dissociation, een maat voor de kracht van collision in de trap die per component wordt toegepast.

Dataverwerking

Piekoppervlaktes in het chromatogram (EIC) bestaan uit de som van de intensiteiten van de m/z van de 1-3 belangrijkste fragment-ionen per analyt. Data is verkregen door de ratio van piekoppervlaktes van analyten/interne standaarden te berekenen (hierna genoemd respons). Voor kwantificatie van monsters zijn kalibratiecurves opgesteld door middel van lineaire regressie met weegfactor 1/x. Tijdens validatie is de lineariteit onderzocht waarna vierpunskalibratie inclusief de oorsprong kan worden gebruikt voor bepaling van monsters. Monsterresponsies zijn geïnterpoleerd op de verkregen ijklijn en zo gekwantificeerd. Voor kwantificatie en chromatogrammen is de software Quantanalysis® gebruikt en voor verdere dataverwerking Microsoft Excel (gemiddelden, RSD, validatiegegevens).

Uitvoering Validatie

Voor de volledige validatie zijn de volgende onderdelen onderzocht: Identiteit, Lineariteit, Selectiviteit (Blanco matrices en serum met toevoegingen), carry-over, verdunnings-integriteit, juistheid en precisie, recovery, stabiliteit (stabiliteit bij vries-dooi, op bench-top,

post-preparative en lange termijn), invloed hemolysisch/icterische/lipemische (HIL) matrices en

commuteerbaarheid humaan/kalfsserum [1, 2, 3]. In dit artikel worden identiteit, selectiviteit,

lineariteit, nauwkeurigheid, recovery en invloed van HIL behandeld.

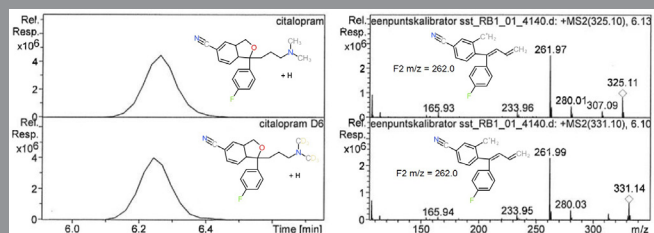
Resultaten

Identiteit en selectiviteit:

Oplossingen in reconstitutie vloeistof met ieder een afzonderlijke component zijn geanalyseerd. Hierbij zijn chromatogrammen op respons en massaspectra opgenomen.

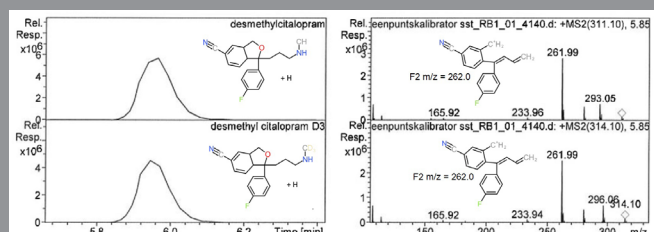
Van 6 blanco humane matrices en het selectiviteitsmonster is het extract geanalyseerd waarbij de respons op de voor analyten verwachte retentietijden is gemeten. De respons (achtergrondsignaal) was overal onder het maximum

van 20% ten opzichte van de desbetreffende laagste kalibrator. Voor alle interne standaarden was de respons overal onder het maximum van 5%.

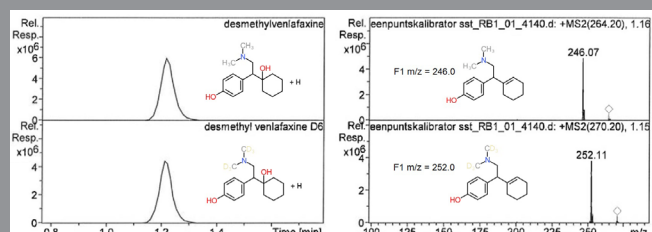


Afb. 2a

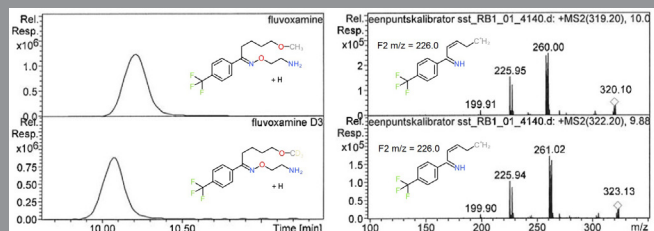
Afbeelding 2a,b,c,d,e: Chromatogrammen en massa-spectra van de 5 componenten en interne standaarden (geduteerde isotopen). In het chromatogram links is de structuur van de precursor afgebeeld. In het massa-spectrum rechts de structuur van het meest abundante fragment voor kwantificatie.



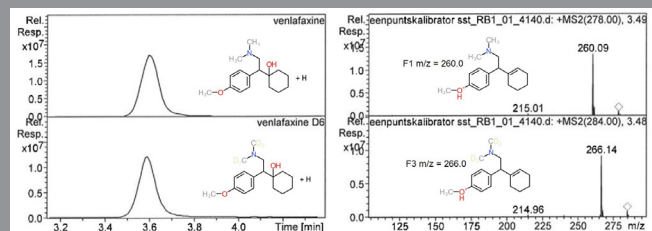
Afb. 2b



Afb. 2c



Afb. 2d



Afb. 2e

Lineariteit:

Voor het bepalen van de lineariteit en de regressieparameters zijn vier kalibratiecurves met 8 kalibratoren geanalyseerd. De lineariteit is bepaald met behulp van lineaire regressie (kleinste kwadraten methode) en getoetst door middel van het vaststellen van de Goodness of Fit (GOF) en de Lack of Fit (LOF) van de lijn. De resultaten worden weergegeven in tabel 3 (pag. 13). Omdat het bereik groter is dan een factor 10 is gekozen voor gewogen regressie 1/x.

De regressiecoëfficiënten voldoen aan de eis en alle lijnen gaan door de oorsprong.

De Goodness of fit is overal significant. De lack of fit wijkt af bij citalopram en desmethylcitalopram. Omdat de residuen allen kleiner dan 7,5% zijn, en de residuen vaker dan twee keer van teken wisselen, is het model geaccepteerd.

Juistheid en precisie

De precisie is opgesplitst in een intra- en een interdag-precisie. De juistheid en precisie zijn bepaald door op vier concentratieniveaus (V1 – V4) op drie verschillende dagen validatiemonsters in vijfvoud te analyseren en de procentuele afwijking en de variatiecoëfficiënten binnen de dagen en tussen de dagen te berekenen.

De procentuele afwijking tussen de gevonden waarde ten opzichte van de nominale waarde voor het laagste concentratieniveau (V1) is kleiner dan 20 % en voor de andere niveaus (V2, V3, en V4) kleiner dan 15 %. De precisie binnen de dagen en tussen de dagen totaal berekend als variatiecoëfficiënt is niet groter dan 20 % op het laagste concentratieniveau en niet groter zijn dan 15 % op de andere concentratieniveaus. Er wordt voldaan aan de eisen voor de nauwkeurigheid.

Recovery en invloed hemolytische, icterische en lipemische matrices:

De recovery van de analysemethode is bepaald door de piekoppervlaktes van de validatiemonsters, gebruikt voor de nauwkeurigheidsbepaling op concentratieniveau V2, V3 en V4 te vergelijken met de piekoppervlaktes van niet opgewerkte standaardoplossingen (V2', V3', V4') over drie dagen in vijfvoud. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5. Om de invloed van sterk hemolytische, icterische of lipemische matrices te bepalen zijn validatiemonsters met concentratieniveau V2 en V4 gespiked tot respectievelijk hemoglobine 1000 mg/L, bilirubine 200 µmol/L en triglycerides (intralipid) 10.000 mg/L.

De recoveries van de componenten zijn op alle concentratieniveaus van gelijke orde. Voor de componenten desmethylvenlafaxine en fluvoxamine is de recovery lager dan de eis van 60% met gemiddeld 30-39%. Voor de andere componenten is de recovery hoger dan 60%. Bij fluvoxamine is er een significant verschil in de recovery tussen deze component en de interne standaard, berekend op de varianties. De recovery voor fluvoxamine is 32,2%, met een CV van 33,4% en de interne standaard 38,8% met CV 66,0%. De interne standaard heeft dus een hogere recovery met grotere spreiding. Bij de andere componenten is er geen significant verschil.

Discussie

Met de nieuwe methode zijn twee bepalingen toegevoegd aan het analysepakket. Daarnaast is citalopram-bepaling sterk verbeterd vergeleken met de HPLC-DAD bepaling. Enkele voordelen van de MS-techniek zien we terug. Zo is er een hoge gevoeligheid en daarom maar een klein monstervolume nodig. Naast de behaalde resultaten tijdens validatie scoren de interne en externe QC's van de eerste maanden ook zeer goed (zie tabel 6). Verder is er geen hinder meer van storende componenten. Wel is voor de opwerking vloeistof-vloeistof-extractie nodig.

Dat betekent dus veel werk voor schone monsters. In de ontwikkelingsfase zijn snelle opwerkingsmethoden als eiwitprecipitatie ook getest maar met minder succes. Dat terwijl deze techniek voor de toxicologische screeningsmethode op het apparaat uitstekend werkt. Het verschil zit in reproduceerbaarheid tussen injecties. De recovery spreiding is groot. In de praktijk kan het signaal van hetzelfde monsters een factor 4 verschillen. Met de juiste interne standaarden kan het effect hiervan geminimaliseerd worden. Het onderzoek van verschillende matrices waaronder extreme HIL-monsters en commuteerbaarheid is was met name gericht op het aantonen dat de juiste concentraties worden teruggevonden. Om meer grip te krijgen op het verschil in signaalsterkte kan verder onderzoek naar ionsuppressie door matrices helpen. Ionsuppressie kan bijvoorbeeld worden onderzocht door infusie van de componenten in combinatie met injectie van blanco extracten [4]. Verschillen tussen injecties uit hetzelfde monster kunnen hiermee niet verklaard worden. Dit fenomeen wordt nog onderzocht met online hulp van applicatiespecialisten bij Bruker. Bij ontwikkeling van volgende methoden is een snellere opwerkingsmethode gewenst en de software zou verbeterd kunnen worden op gebied van rapportage zodat Excel niet meer nodig is.

Conclusie

De methode voldoet grotendeels aan de eisen. Er is sprake van een lineair verband tussen de concentraties van de analyten en de bijbehorende signaalrespons. De recovery van analyten in signaalrespons van desmethylvenlafaxine en fluvoxamine is lager dan de eis. Dit geldt ook voor de bijbehorende interne standaarden. Bij fluvoxamine is er een klein maar significant verschil in recovery met de interne standaard. Dit heeft geen nadelig effect op de juistheid en precisie. De spreiding in de signaalrespons is zeer hoog bij alle analyten. Desondanks zijn goede resultaten behaald in zowel juistheid als herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid.

Gebruik van de interne standaard is van essentieel belang voor het vaststellen van de juiste resultaten.

De verschillende extreme matrices hebben geen significante invloed op de bepaling. De methode is geschikt voor gebruik in TDM.

Voordelen:

Laag monstervolume

Hoge nauwkeurigheid

Groot meetbereik

Lage detectiegrens

Nadelen:

Tijdrovend LLE

Zes kalibratiemonsters nodig

Grote signaalverschillen

Software, veel programma's nodig



Bijlage tabellen

Lineariteit						
Parameter:	Regressie-coëfficiënt (R ²)	Snijdt oorsprong	GOF	LOF	Bereik	Residuen (grootste)
Component:						
Eis	≥ 0,9950	ja	significant	niet significant	-	≤± 15% en ≤± 20% voor V1*
Citalopram	0,9985	ja	significant	significant	5-200 µg/l	
desmethylcitalopram	0,9996	ja	significant	significant	5-200 µg/l	-5,9%
desmethylvenlafaxine	0,9996	ja	significant	niet significant	20-800 µg/l	5,3%
fluvoxaminea	0,9998	ja	significant	niet significant	12,5-500 µg/l	3,6%
venlafaxine	0,9995	ja	significant	niet significant	20-800 µg/l	4,9%

Tabel 3: Overzicht resultaten lineariteitsbepaling. Regressiecoëfficiënt R², snijdt oorsprong betekent dat de curve niet significant afwijkt van de oorsprong, GOF = goodness of fit, LOF = lack of fit, gevalideerde bereik, grootste residu van alle y-waarden van de kalibratoren. *LOF moet niet significant zijn tenzij de residuen <7,5% en op het laagste niveau en <10% zijn en >2x van teken wisselen.

Juistheid en precisie			
Ordeel:	Juistheid:	Intra-dag precisie, herhaalbaarheid:	Inter-dag precisie, reproduceerbaarheid:
Component:	% van nominale waarde laagste-hoogste	CV% laagste-hoogste	CV% laagste-hoogste
Eis	85 - 115%, 80 - 120% (V1)	≤±15%, ≤±20% (V1)	≤±15%, ≤±20% (V1)
Citalopram	99,9 - 109,6	3,9 - 9,4	3,9 - 9,4
desmethylcitalopram	100,8 - 107,1	2,9 - 8,0	2,9 - 8,0
desmethylvenlafaxine	101,3 - 106,5	3,5 - 7,4	3,5 - 10,2
fluvoxaminea	99,7 - 102,3	3,3 - 6,9	3,3 - 17,1 (V1)
venlafaxine	99,2 - 105,3	2,6 - 4,1	3,4 - 5,2

Tabel 4: Nauwkeurigheid. Juistheid uitgedrukt in procenten van nominale concentratie, de intra-dag en interdag precisie uitgedrukt in variatiecoëfficiënt.

Recovery en hil-matrices					
Ordeel:	Blanco serum	Blanco serum	Hemolytisch serum	Icterisch serum	Lipemisch serum
Component:	Recovery % gemiddeld van signaal referentie-oplossing + CV (n=45)	Recovery % gemiddeld van signaal referentie-oplossing interne standaard + CV (n=15)	% van nominale waarde V2 en V4 (n=5)	% van nominale waarde V2 en V4 (n=5)	% van nominale waarde V2 en V4 (n=5)
Eis	>60% CV: -	>60% CV: -	85 - 115%	85 - 115%	85 - 115%
Citalopram	96,0 CV: 31,2	100,5 CV: 37,5	88,3 - 96,4	98,2 - 94,2	94,7 - 96,7
desmethylcitalopram	93,2 CV: 30,2	97,1 CV: 30,3	90,4 - 95,6	94,2 - 91,5	96,1 - 97,2
desmethylvenlafaxine	30,0 CV: 27,1	31,0 CV: 30,7	85,3 - 97,7	94,4 - 92,6	96,6 - 99,1
fluvoxaminea	32,2 CV: 33,4	38,8 CV: 43,1	94,7 - 98,9	91,7 - 86,8	91,2 - 92,9
venlafaxine	99,0 CV: 30,1	107,8 CV: 34,8	88,2 - 95,6	94,2 - 91,9	95,0 - 103,2

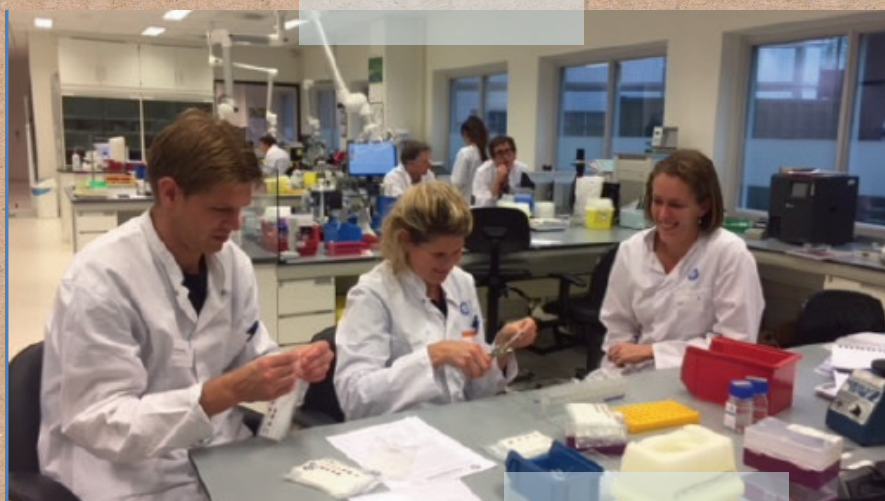
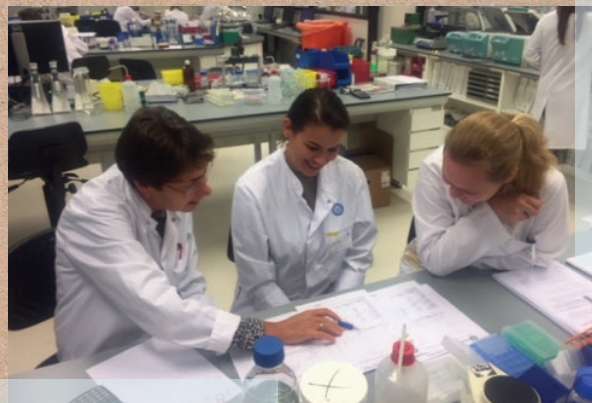
Tabel 5: De recoveries van componenten uitgedrukt in procenten ten opzichte van de niet geëxtraheerde stof op drie concentratieniveaus. De waarde in procenten ten opzicht van nominaal van teruggevonden componenten in HIL-monsters op niveaus V2 en V4.

QC-onderdeel:	Interne controles KKG afwijking in % afwijking target (eis ≤15%)	Externe controle KKG 2017.3	Externe controle KKG 2017.4
Component:	Kwartaal 2017.4 - 2018.1 n=21	Juistheid in % afw. Target	Juistheid in % afw. Target
Citalopram	99,7 % CV: 3,3 %	met oude methode bepaald	4,7
desmethylcitalopram	103 % CV: 4,8 %	met oude methode bepaald	-0,1
desmethylvenlafaxine	106 % CV: 5,1 %	6,0	0,9
fluvoxaminea	95,0 % CV: 2,85 %	-0,1	-0,4
venlafaxine	98,9 % CV: 2,6%	-0,6	2,4

Tabel 6: resultaten interne en externe controles

Praktijkcursus Toxicologie UMC Utrecht

De praktijkcursus Toxicologie heeft 2 t/m 4 november 2017 voor het eerst plaatsgevonden in het UMC Utrecht. Na bekendmaking dat de cursus in 2017 zou doorgaan, stroomden de aanmeldingen in rap tempo binnen. Het maximum aantal deelnemers van 10 cursisten kwamen uit Amsterdam, Groningen, Apeldoorn en Deventer. Op de eerste dag werd de theorie van Toxicologie behandeld met Erik van Maarseveen (ziekenhuisapotheker). Dag 2 en 3 zijn we het lab op gegaan om 5 casussen te behandelen met GC-FID, FT-IR, NIR, UV en LC-MS/MS.



Iedere cursist kreeg een tox casus met sample mee naar huis, die zelfstandig opgelost moest worden en gepresenteerd op de terugkomdag op 24 november 2017. Deze dag werd begeleid door ziekenhuisapotheker Tessa Ververs. De cursus werd als leerzaam ervaren en positief beoordeeld door de deelnemers. In het najaar van 2018 wordt de cursus weer georganiseerd door het UMC Utrecht, dus geef je op via opleidingen@nvkfaz.nl.

NVKFAZ opleidingen

TDM, TOXICOLOGIE EN FARMACOGENETICA

Deze 10 daagse cursus behandelt de specifieke kennisgebieden farmacologie en toxicologie die op het klinisch-farmaceutisch laboratorium voorkomen en niet door de reguliere (analytisch chemische) analistenopleidingen worden gedoceerd. Na het volgen van deze cursus bent u in staat verkregen kennis praktisch toe te passen in de dagelijks werkzaamheden en beschikt u over de benodigde achtergrondkennis. De behandelende onderwerpen zijn:

Geneesmiddelenleer

Immunochemie

Moderne instrumentele analyse

Farmaceutische Chemie

Validatie bioanalyse

Kwaliteit ISO15189

Farmacokinetiek en Farmacogenetica

FARMACEUTISCHE ANALYSE

Deze 10 daagse cursus behandelt de specifieke kennisgebieden van de kwaliteitscontrole die op het farmaceutisch laboratorium voorkomen en niet door de reguliere (analytisch chemische) analistenopleidingen worden gedoceerd. De behandelende onderwerpen zijn:

Geneesmiddelenleer

Farmacopee onderzoek

Validatie

Kwaliteit GMP-(z)

Stabiliteitsonderzoek en –methode

Microbiologie / VTGM

PRAKTIJKCURSUS TOXICOLOGIE

Deze 3 daagse cursus behandelt de praktische aanpak van een aanvraag voor toxicologisch onderzoek. Na het volgen van deze cursus heeft u een begin gemaakt om zelfstandig een toxicologisch onderzoek uit te voeren.

Kijk op WWW.NVKFAZ.NL voor de actuele prijzen en cursusdata.



TOELATINGSEISEN

- HLO-opleiding
- MLO-Opleiding met 3 jaar ervaring
- Opleidingslocatie theorie Amersfoort
- Opleidingslocatie praktijk-cursus Utrecht
- Bij positief resultaat ontvangt de cursist een “met goed gevolg” certificaat met cijferlijst.

Hoeveel zekerheid geeft ons de meetonzekerheid?

Meetonzekerheid volgens ISO15189.

Hoe pakken we dit aan?

Door **Erwin Jongedijk, Hiltjo Kuiper**

Laboratorium Klinische Farmacie & Farmacologie, UMC Groningen

1. De norm.

'Het laboratorium moet de meetonzekerheid vaststellen voor elke meetprocedure in de onderzoeksfase die wordt toegepast om in monsters van patiënten gemeten kwantitatieve waarden te rapporteren. Het laboratorium moet de prestatie-eisen definiëren voor de meetonzekerheid van elke meetprocedure en de geschatte waarden van meetonzekerheid beoordelen. (...) Desgevraagd moet het laboratorium zijn geschatte waarden van meetonzekerheid aan gebruikers van de diensten van het laboratorium bekendmaken.'

Het bovenstaande is een citaat uit normelement 5.5.1.4 van ISO15189:2012. Wat wordt er bedoeld met meetonzekerheid (MO)? Traditioneel wordt er gekeken naar de meetfouten. Iedere meting is onderhevig aan twee soorten fouten; de systematische fout (uitgedrukt in juistheid, of bias) en de toevallige fout (uitgedrukt in variantie of standaarddeviatie). Als deze fouten eenmaal voor een methode zijn vastgesteld, valt (indien gewenst) ieder meetresultaat te corrigeren voor de systematische fout. Het aandeel van de toevallige fout voor één willekeurig meetresultaat blijft echter onzeker. Dit is de reden dat de standaarddeviatie door velen van ons als een maat voor de meetonzekerheid wordt gezien. Hoewel hier nog veel meer over te zeggen valt, is dit nog steeds één van de basisprincipes in de richtlijn voor het uitdrukken van meetonzekerheid (GUM) van de Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM 100:2008).

De Raad voor Accreditatie geeft echter een belangrijke toevoeging aan ISO15189. In de toelichting van de RvA (T046-NL, 20-10-2017) staat nl. het volgende: 'Bij het vaststellen van meetonzekerheid dient het laboratorium zowel rekening te houden met interlaboratorium-reproduceerbaarheid als juistheid.' Dit stelt ons voor een uitdaging; de zogenaamde traditionele aanpak voldoet blijkbaar niet meer. Hiermee is het ineens een zeer lastig statistisch vraagstuk geworden. De MO, zoals gevraagd door de RvA, drukt niet meer zozeer de toevallige fout uit, maar moet eerder gezien worden als indicator voor de totale fout van een methode.

2. De voorgestelde aanpakken.

2.1. Voorstel NVZA.

De werkgroep TDM, Toxicologie en Farmacogenetica (TTF) van de NVZA biedt een mogelijke oplossing. De werkgroep TTF heeft een concept adviesdocument opgesteld (versie 1, oktober 2017) waarin wordt geadviseerd om de MO gelijk te stellen aan de totale analytische fout (TAE, of TE) zoals deze door Westgard is geïntroduceerd (Westgard JO, Carey RN, Wold S.;

Clin Chem 1974;20:825-33). De TAE is de som van de systematische fout (SE) en de toevallige fout (RE), waarbij SE gelijk is aan de bias en RE een product is van de standaarddeviatie. De werkgroep TTF kiest er voor om RE te definiëren als $1,65 \times \text{RSD}\%$, waardoor de volgende formule ontstaat: $\text{MO} = \text{Bias}\% + (1,65 \times \text{RSD}\%)$

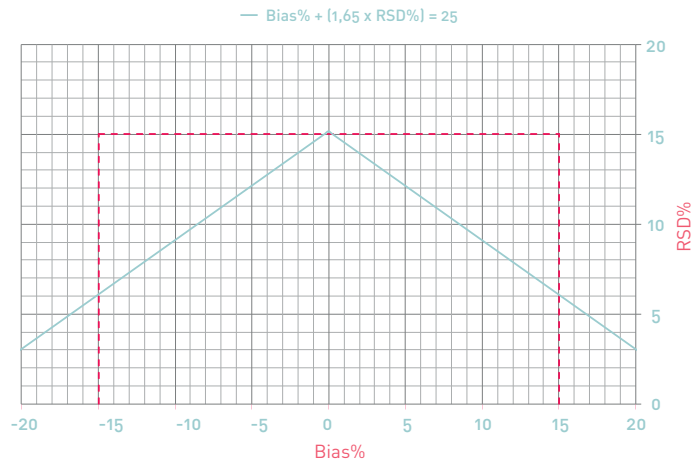
Bij deze indicator adviseert de commissie een prestatie-eis van $\text{MO} = 25\%$ te hanteren.

Deze definitie voldoet aan de eisen van de RvA, maar is het ook een bruikbare indicator voor de kwaliteit van een methode?

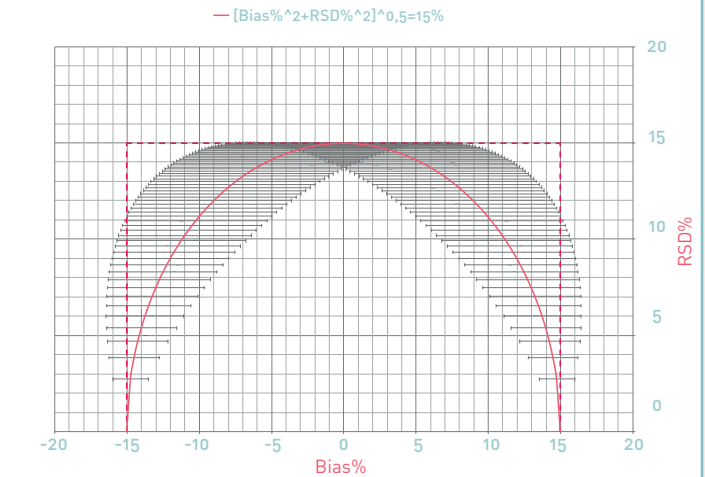
FDA- en EMA-richtlijnen stellen duidelijke eisen voor analytische methoden (FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation; 2001 en EMEA192217:2009). Bias% en CV% moeten op alle niveaus kleiner of gelijk zijn aan 15%, met uitzondering van de Lowest Limit Of Quantitation (LLOQ) waarbij Bias% en CV% kleiner of gelijk moeten zijn aan 20%. Dit geldt niet alleen tijdens methodevalidaties, maar ook gedurende routinematige analyses worden deze eisen bewaakt door controlemonsters mee te nemen. Buiten deze interne kwaliteitsbeoordelingen, moet er volgens normelement 5.6.3 van ISO15189:2012 ook deelgenomen worden aan interlaboratoriumvergelijkingprogramma's, zoals ringonderzoeken. De organisator van een ringonderzoek moet de prestatie van iedere deelnemer evalueren volgens ISO17043:2010. Deze evaluatie staat echter los van het bepalen van de MO. Voor de MO gaat het om de gemiddelde bias van het eigen lab t.o.v. de theoretische waarde (of consensuswaarde) en de RSD van deze bias gedurende een bepaald aantal ringonderzoeken. Deze interlaboratorium-reproduceerbaarheid en juistheid zullen door het deelnemende lab zelf berekend en beoordeeld moeten worden. De FDA en EMA stellen hier geen eisen aan, maar als het controlemonster commuteerbaar is met normaal patiëntenmateriaal, en als de gebruikte analysemethode voldoet aan alle FDA- en EMA-richtlijnen, zal ook hier in theorie de bias% en CV% kleiner of gelijk moeten zijn aan 15%. Het is daarom onze mening dat het voor een bruikbare prestatie-eis van de MO van belang is dat deze zo veel mogelijk overeenkomt met FDA- en EMA-richtlijnen voor reproduceerbaarheid en juistheid.

Figuur 1 maakt inzichtelijk hoe het voorstel van de werkgroep TTF van de NVZA zich verhoudt tot FDA- en EMA-richtlijn voor reproduceerbaarheid en juistheid. Van alle combinaties van bias en RSD die aan FDA- en EMA-criteria voldoen, voldoet 30% niet aan de

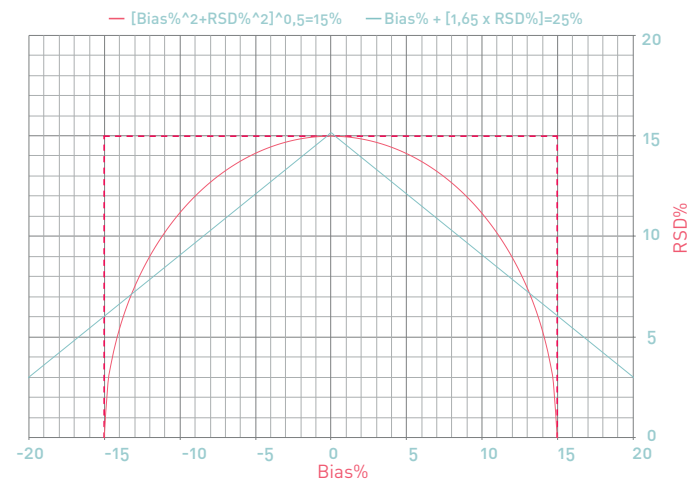
Figuur 1: Het voorstel van de NVZA t.o.v. de FDA- en EMA-richtlijn (stippellijn).



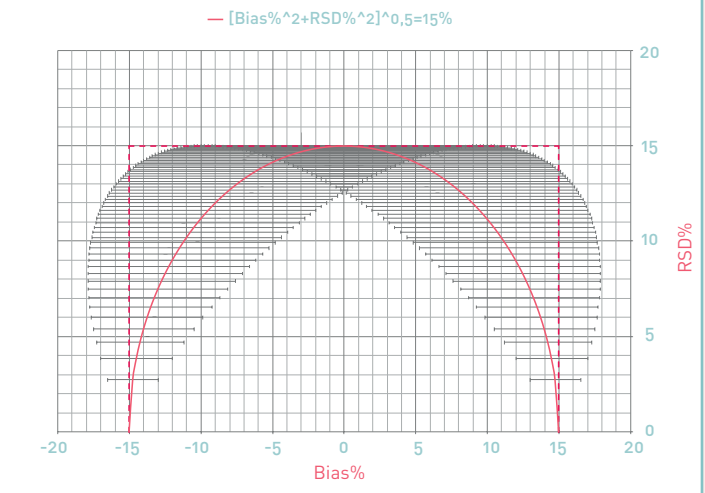
Figuur 3: Het 95%-betrouwbaarheidsinterval voor de bias bij MO=15% en n=12



Figuur 2: Het voorstel van het UMGCG t.o.v. het voorstel NVZA en FDA- EMA-richtlijnen



Figuur 4: Het 95%-betrouwbaarheidsinterval voor de bias bij MO=15% en n=4



prestatie-eis die de NVZA voorstelt. In de praktijk houdt dit onder andere in dat een gemiddelde bias van 10% bij dit voorstel niet acceptabel is als de RSD groter is dan 9% ($MO > 25\%$). Het NVZA-voorstel stelt hier duidelijk hogere eisen aan analyses dan je van een gevalideerde methode mag verwachten. Van alle combinaties van bias en RSD die aan de voorgestelde prestatie-eis van de NVZA voldoen, voldoet 16% niet aan de criteria van de FDA en EMA. In de praktijk betekent dit dat een gemiddelde bias groter dan 15% acceptabel is als de RSD kleiner is dan 6%. Bij een zeer hoge reproduceerbaarheid is zelfs een bias van circa 25% acceptabel. In deze gevallen is het NVZA-voorstel juist veel soepeler dan bij een gevalideerde methode acceptabel zou mogen zijn.

2.2. Voorstel UMC Groningen

Het gebruik van een t-waarde (in geval van de NVZA: 1,65) heeft het effect van een weging op de RSD. Een hoge bias zorgt hierdoor minder snel voor MO 's boven de eis. Wij zijn van mening dat een lage bias

even belangrijk is als een lage RSD. Het gebruik van een t-waarde in de berekening van de MO heeft daardoor niet de voorkeur. Al met al gaf het voorstel van de NVZA ons een reden om te onderzoeken of er een mogelijkheid is om de MO zo te definiëren dat de uitgangspunten van het voorstel van NVZA behouden blijven, terwijl de prestatie-eis een grotere overeenstemming heeft met de FDA- en EMA-eisen. En dit zonder dat de RSD zwaarder weegt dan de bias. Dit resulteert in de volgende criteria:

1. Bias en RSD worden even zwaar gewogen.
2. Een RSD van ca. 15% is alleen acceptabel als de bias zeer klein is.
3. Een bias van ca. 15% is alleen acceptabel als de RSD zeer klein is.
4. Een bias en RSD van beide $< 10\%$ moet acceptabel zijn.

Hieruit is ons voorstel ontstaan om de MO te definiëren als de kwadratische som van bias en RSD, waardoor de volgende formule ontstaat: $MO = \sqrt{Bias\%^2 + RSD\%^2}$
Met als prestatie-eis $MO \leq 15\%$.

Figuur 2 maakt inzichtelijk hoe ons voorstel zich verhoudt tot de FDA- en EMA-richtlijnen. Van alle combinaties van bias en RSD die aan FDA- en EMA-criteria voldoen, voldoet 21,5% niet aan de prestatie-eis die wij voorstellen. Aan de andere kant geldt dat 100% van de combinaties van bias en RSD die aan onze voorgestelde prestatie-eis voldoen, ook aan de FDA- en EMA-richtlijnen voldoen. Met andere woorden: buiten de eisen van de FDA en EMA is ons voorstel strenger dan dat van de NVZA en binnen de eisen van de FDA en EMA is ons voorstel minder streng dan het voorstel van de NVZA (8,5% minder afkeuringen). Zo is bijvoorbeeld bij een gemiddelde bias van 10,6% een RSD van 10,6% nog acceptabel, maar wordt een gemiddelde bias van 14% in combinatie met een RSD van 6% wel afgekeurd.

3. De evaluatie-periode.

Zoals te zien is aan de gebruikte t-waarde, gaat de berekening bij het voorstel van de NVZA uit van een oneindig aantal vrijheidsgraden. Het idee hierbij is dat de hoeveelheid data in de loop der tijd alleen maar blijft groeien. Bij grote datasets is de invloed van een uitbijter op de gemiddelde bias en RSD niet zo groot. Bovendien zijn echte uitbijters gemakkelijk uit te sluiten met behulp van een uitbijtertest. Maar zijn scores van oneindig lang geleden, of zelfs maar vijf jaar geleden nog relevant voor vandaag? Wat dat betreft zijn kleinere datasets beter, maar dan zal de invloed van uitbijters enorm toenemen, en tegelijkertijd neemt de kans dat deze uitbijters uit te sluiten zijn met behulp van een uitbijtertest enorm af. Wat betekent dit dan voor de MO? Een rekenvoorbeeld:

Als we 4 ringonderzoeken per jaar doen en we rekenen met de data van een periode van 3 jaar komen we op 12 datapunten. We nemen ons eigen voorstel eens als voorbeeld. Figuur 3 geeft het 95%-BI van alle gemiddelde bias-en weer die zich precies op de grens van ons criterium bevinden, bij $n=12$. Als de gemiddelde bias van 12 datapunten 10,6% is en de RSD is ook 10,6%, dan voldoet dit nog net aan ons criterium ($MO < 15\%$), maar het 95%-BI van deze gemiddelde bias valt voor een klein deel buiten de 15%. Er is een kans dat 1 van de 12 ringonderzoeken een bias had van groter dan 15% (een slechte score op 8,3% van alle geëvalueerde ringonderzoeken). Als we ditzelfde eens doorrekenen voor een periode van 1 jaar ($n=4$), worden de betrouwbaarheidsintervallen aanzienlijk groter (figuur 4). Als er dan sprake is van een bias en RSD van 10,6% voldoet de MO nog steeds aan het criterium ($MO < 15\%$), maar de kans dat 1 van de 4 datapunten groter is dan 15% is nu aanzienlijk groter (een slechte score bij 25% van alle geëvalueerde ringonderzoeken).

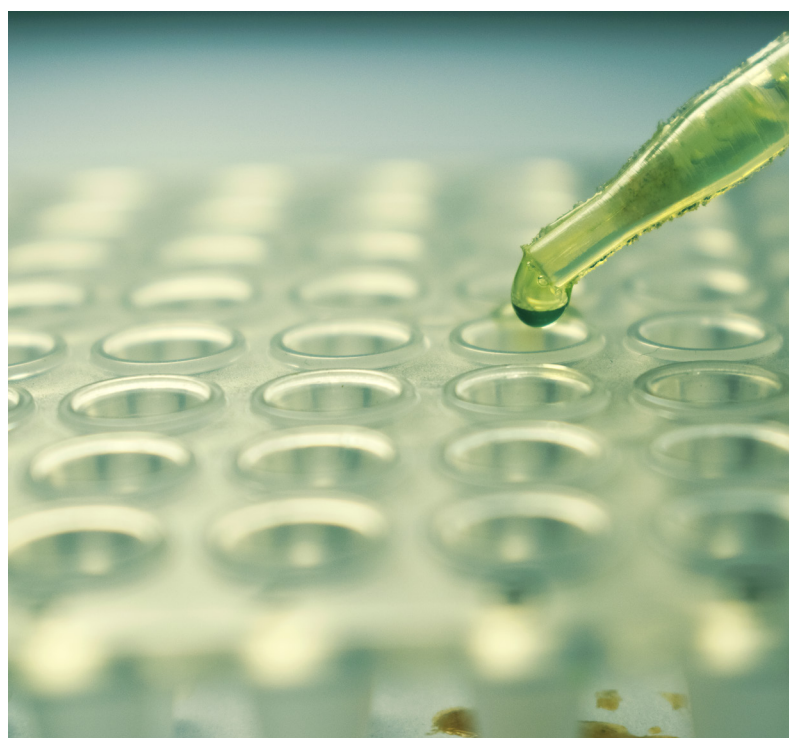
Anders geformuleerd: Bij een identieke MO zal de hoeveelheid goede scores t.o.v. van de slechte scores altijd groter zijn naarmate de totale hoeveelheid beoordeelde scores groter is. Dit geldt niet alleen voor ons voorstel, maar ook voor het voorstel van de NVZA en elk ander mogelijk voorstel waarbij gerekend wordt met de bias en RSD. Er is dus een goede reden om te kiezen voor een zo lang mogelijke evaluatie-periode,

maar het is wel onze ervaring dat oudere ringonderzoeken niet meer relevant zijn voor het huidige functioneren van een methode. Als compromis stellen wij daarom een evaluatieperiode van 3 jaar voor.

4. Wat voor zekerheid geeft de meetonzekerheid?

De bovenstaande alinea's leggen een belangrijk punt bloot. De manier waarop de MO berekend wordt en de hoeveelheid data die vervolgens geëvalueerd wordt, hebben een enorme invloed op de mogelijke interpretatie er van. Het kan er toe leiden dat laboratoria op het oog totaal verschillende MO's publiceren, terwijl de achterliggende data nagenoeg identiek is. Ook het omgekeerde is waar: MO's kunnen er nagenoeg identiek uit zien terwijl de achterliggende data enorm van elkaar verschilt.

Wij zijn er van overtuigd dat onze strategie voordelen heeft t.o.v. het voorstel de NVZA. Een bepaling met een acceptabele MO zal een interlab-juistheid en -precisie hebben die voldoet aan de FDA- en EMA-richtlijnen voor intralab-juistheid en -precisie. Daarbij kunnen we nog wel vragen stellen, zoals: zijn er voor immunoassay's andere prestatie-eisen nodig, of wanneer en hoe gebruiken we consensuswaarden voor het bepalen van de MO? Uiteindelijk het is vooral van belang dat er onderling overeenstemming bereikt wordt over de te volgen strategie, zodat er in elk geval tussen de verschillende laboratoria een eenduidig beeld ontstaat. Het is daarbij wel belangrijk om ons te realiseren dat een MO die aan een prestatie-eis voldoet op zichzelf niet veel duidelijkheid verschaft over hoe vaak er goed of slecht gescoord werd op ringonderzoeken. Ongeacht de berekening van de MO en ongeacht de prestatie-eis. Hierdoor zal het vergelijken van laboratoria onderling, aan de hand van hun MO's, maar weinig informatie opleveren. Meetonzekerheid is vooral een zéér globale prestatie-indicator.



Bepaling van gederivatiseerd ethyleenglycol en propyleenglycol in plasma/serum met GC-FID met headspace injectie

Hermien Kelholt-Dijkman

analist Chromatografie MaasstadLab afdeling Klinische Farmacologie & Toxicologie

Robert Romijn

vakspecialist Chromatografie MaasstadLab afdeling Klinische Farmacologie & Toxicologie

Tessa Bosch

Ziekenhuisapotheker – klinisch farmacoloog, medisch manager afdeling Klinische Farmacologie & Toxicologie MaasstadLab

MaasstadLab afdeling Klinische Farmacologie & Toxicologie, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam

Samenvatting

De analyse van ethyleenglycol en propyleenglycol is nodig om een intoxicatie met deze middelen vast te kunnen stellen. De voorkeur gaat uit naar een methode waarbij dezelfde apparatuur gebruikt wordt als voor de lagere alcoholen (zoals ethanol, methanol en aceton), die vaak gelijktijdig aangevraagd worden. Met het opzetten van een analysemethode voor hogere alcoholen we tegen een aantal problemen aangelopen. Met het valideren van de analyse van gederivatiseerd ethyleenglycol en propyleenglycol met headspace injectie op de GC hebben we een goed functionerende methode om intoxicaties vast te kunnen stellen zodat een juiste behandeling ingezet kan worden.

Sleutelwoorden

Toxicologie, ethyleenglycol, propyleenglycol, GC-FID, headspace injectie, derivatisering

Inleiding

In ons ziekenhuis komen een aantal keren per jaar patiënten binnen met intoxicaties met lagere en/of hogere alcoholen. Voor de lagere alcoholen, zoals ethanol, methanol en aceton, hebben we een gaschromatografische analyse met headspace injectie opgezet. De hogere alcoholen, zoals ethyleenglycol en propyleenglycol, kunnen we echter met die methode niet goed bepalen.

Deze hogere alcoholen, die gebruikt worden als antivriesmiddel in ruitenwisservloeistof, brengen echter bij intoxicaties, wel ernstige effecten teweeg, zoals metabole acidose met een hoge anion- en osmolgap. Deze effecten zijn echter niet alleen specifiek voor intoxicaties met hogere alcoholen, maar komen ook voor bij diabetische ketoacidose en multiple orgaanfalen. Om te weten of er sprake is van een intoxicatie wil je snel uit kunnen sluiten of er ethyleenglycol of propyleenglycol is gebruikt en wat de eventuele concentratie is. Een concentratie van >200 mg/L wordt als toxisch beschouwd. Als behandeling bij een hogere alcohol intoxicatie wordt het antidotum ethanol, als infuus toegediend en/of hemodialyse toegepast.

In dit artikel beschrijven wij het proces van het opzetten van een snelle Head

Space - Gas Chromatografische (HS-GC) methode voor het gelijktijdig bepalen van ethyleenglycol en propyleenglycol in humaan serum of plasma (1). In eerdere artikelen zijn al analyses met GC beschreven (2) als ook GS-MS methodes (3). Omdat we voor de lagere alcoholen al een HS-GC methode hebben wilden we hetzelfde apparaat en opstelling kunnen gebruiken voor de analyse van de hogere alcoholen. Het belangrijkste probleem bleek de grote polariteit van ethyleenglycol en propyleenglycol. Dit veroorzaakt al snel tailende en brede pieken, wat het moeilijk maakt om een lage detectiegrens te behalen.

In eerste instantie is geprobeerd om ethyleenglycol en propyleenglycol zonder derivatiseren te analyseren. Het bleek op deze manier niet mogelijk om de gewenste detectielimiet te halen.

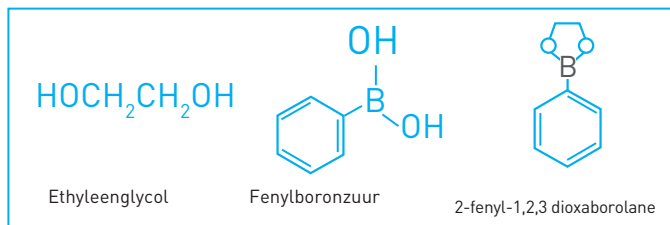
Met vloeistof injectie lukt het met waterige standaarden wel om een acceptabele scheiding te krijgen, maar zodra er serummonsters geïnjecteerd worden gaat de chromatografie sterk achteruit. De pieken worden dan dusdanig breed en tailend dat de gewenste detectielimiet van 100 mg/L in niet gehaald wordt. Bovendien treedt bij vloeistof injectie van serummonsters vaak verstopping van de injectiespuit op.

Voor headspace injectie blijken de kookpunten van niet-gederivatiseerd ethyleenglycol en propyleenglycol te hoog te zijn (ethyleenglycol 197.3 oC, propyleenglycol 188.2 oC).

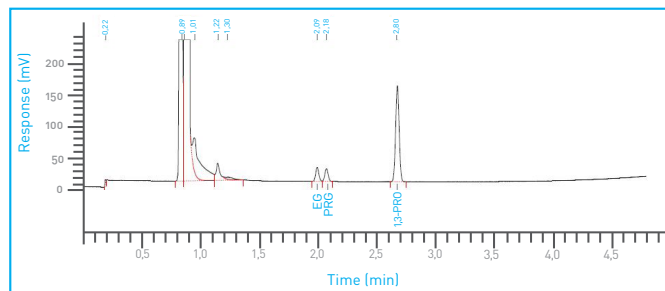
In eerste instantie is niet gekozen voor derivatisering vanwege de verwachte omslachtigheid en tijdsduur. Na bestudering van de literatuur (1) is toch besloten om de glycolen te derivatiseren en met headspace te injecteren. Fenylboronzuur wordt gebruikt als derivatiseringsreagens. Groot voordeel van de beschreven methode is dat de derivatisering plaatsvindt in de headspace oven. Er zijn dus geen extra handelingen nodig en de derivatiseringstijd is 5 minuten. Dat is acceptabel. Als interne standaard wordt 1,3-propaandiol gebruikt, deze wordt net als ethyleenglycol en propyleenglycol gederivatiseerd met fenylboronzuur. Zie figuur 1.

Materialen en methoden (1)

Reagentia
Aceton (Merck 1.00014.100)
Ethyleenglycol (Fluka 03750-250ML)
Fenylboronzuur (Sigma P20009-10G)
1,3-propaandiol (Aldrich P50404-100G)
Propyleenglycol (Sigma W294004-1KG-K)
RO-edi water



Figuur 1: Derivativering van ethyleenglycol met fenylboronzuur



Figuur 2: Chromatogram lage kalibrator

Apparatuur en instellingen

Gaschromatograaf: GC Trace GC
 Ultra Interscience
 Autosampler: Thermo TriPlus headspace
 Kolom: WCOT DB-Alcohol-1 30 m x 0.53 mm x 3.00 μ m (Varian 125-9134)
 Dragergas: Helium, 4.2 mL/minuut; split flow 25 mL/minuut
 Kolomoven: 190 °C x1 minuut \rightarrow 12 °C/minuut \rightarrow 235 °C x0.25 minuut
 Detector: FID 270 °C, waterstofgas 35 mL/min, lucht 350 mL/min; make-up gas 30 mL/min
 Injector: 250 °C
 Injectievolume: 0.5 μ L
Autosampler instellingen:
 Agitator temperatuur: 140 °C
 Agitator on time: 40 sec
 Agitator off time: 1 sec
 Incubation time: 5 minuten
 Syringe temperatuur: 150 °C
 Filling volume: 0.5 mL
 Filling speed: 30 mL/minuut
 Injection speed: 50 mL/minuut
 Runtijd: 5 minuten

Oplossingen

Gecombineerde plasmastockkalibrator
 10 g/L. Pipetteer 89,8 μ L ethyleenglycol en 96,5 μ L propyleenglycol in één maatkolpje en vul aan tot 10 mL met blanco plasma.
 Houdbaarheid: 2 jaar bij -20°C

Gecombineerde plasmawerkkalibratoren
 Verdun in maatkolpjes van 10 mL en vul aan met blanco plasma:

Naam	μ L plasmastockkalibrator 10 g/L	Concentratie EG/PrG mg/L
Kalibrator 100 mg/L	100	100
Kalibrator 1000 mg/L	1000	1000
Kalibrator 0 mg/L (blanco)	0	0

Houdbaarheid: 2 jaar bij -20°C

Interne Standaard oplossing
 Pipetteer 75 μ L 1,3-propaandiol en vul aan tot 100 mL met demiwater.
 Houdbaarheid: 1 jaar bij 4°C.

Derivatiseringsreagens

Weeg af 250 mg fenylboronzuur en los op in 50 mL aceton.
 Houdbaarheid: 1 jaar bij 4°C.

Controlemonster

Als controle wordt een monster van de rondzending van SKML/KKGT gebruikt. Omdat dit monster geen propyleenglycol bevat hebben we dit zelf toegevoegd, zodat we ook een controlewaarde hebben voor propyleenglycol.

Monstervoorbewerking

Pipetteer in Eppendorf cups:

- 50 μ L blanco, kalibrator, controle, patiëntmonster
- 50 μ L interne werkkalibrator
- 1,3-propaandiol 795 mg/L
- 100 μ L FBZ-oplossing 5 g/L in aceton
- sluit de Eppendorf cups
- Meng gedurende 5 seconden, stand 2500, op de Micro Plate Shaker DMS-2500
- Centrifugeer de vials 3 minuten bij 11000 rpm (Hettich Micro 220)
- Pipetteer 20 μ L van het supernatant in genummerde headspace autosampler vials
- Sluit goed af met crimp cap

De GC-kolom die gebruikt wordt is DB-ALC1 van Agilent (30 m x 0.53 mm filmdikte 3 μ m).

Resultaten

Om de specificiteit te bepalen hebben we de lagere alcoholen (ethanol, methanol) met de hogere alcoholen methode geanalyseerd en hieruit blijkt dat er geen interferentie is (er zijn geen pieken te zien). Er zijn bovendien acht verschillende patiëntensera getest, hierin wordt geen ethyleenglycol en geen propyleenglycol aangetoond. Een blanco geïnjecteerd na de hoogste standaard is volledig blanco. Hiermee voldoet de analyse aan de eisen voor specificiteit.

Ethyleenglycol, propyleenglycol en de interne standaard zijn van de basislijn gescheiden en daarmee is de analyse selectief.

- De Lower Limit of Quantitation is 50 mg/L.
- De lineariteit is 1500 mg/L voor ethyleenglycol en 2500 mg/L voor propyleenglycol.

- De reproduceerbaarheid is 5.1% voor ethyleenglycol en 3.3% voor propyleenglycol.
 - De juistheid is voor ethyleenglycol 96-105%, en voor propyleenglycol 99-105%.
 - Herhaalbaarheid voor ethyleenglycol is 2.6%, en voor propyleenglycol 3.6%.
- Hiermee voldoet de analyse aan alle gestelde eisen voor de validatie en kan deze in de dagelijkse praktijk gebruikt worden.

Discussie en conclusie

Het is niet mogelijk gebleken om lagere en hogere alcoholen in één run te analyseren. Het is wel mogelijk de analyse direct na de lagere alcoholen analyse uit te voeren zonder GC-kolom of injector te wisselen. De headspace oven heeft ongeveer 20 minuten nodig om op te warmen naar de juiste temperatuur voor glycolen. Totale runtijd op de GC, dit is inclusief derivatiseren in head space oven, is 7.3 minuten per injectie. Dat betekent dat het injecteren van een serie met 2 kalibratoren, een blanco, een controle en een patiëntmonster 5 x 7.3 = 37 minuten duurt. Als de glycolen gedraaid worden na lagere alcoholen moet wel rekening gehouden worden met een opwarmtijd van de headspace oven van ongeveer 20 minuten. Deze tijd kan benut worden om de monstervoorbewerking uit te voeren. Met deze methode kan op een snelle en eenvoudige wijze ethyleenglycol en propyleenglycol kwantitatief bepaald worden in plasma en serum. De apparatuur die gebruikt wordt is exact hetzelfde als voor de analyse van lagere alcoholen. Dit is een groot voordeel, aangezien hogere alcoholen meestal aangevraagd worden als vervolg op of tegelijkertijd met een aanvraag van lagere alcoholen.

Literatuur

1. A rapid analysis of plasma/serum ethylene and propylene glycol by head space gas chromatography. Alexandra Ehlers, Cory Morris and Matthew D. Krasowski. SpringerPlus 2013, 2: 203
2. Bloedalcoholen bepaling met GC-FID op een apolaire kolom. E Olijslager, R Langen. Extract 2007, (18)3: 9-13
3. Improved GC-MS procedure for simultaneous measurement of ethylene glycol and glycolic acid. Clin Chem 2010, 56: 1900-1902

De optimale dosering voor een continu infuus flucloxacilline bij niet-kritisch zieke patiënten

S. Wilkes, ziekenhuisapotheker Erasmus MC

I. van Berlo, ziekenhuisapotheker Deventer Ziekenhuis

J. ten Oever, internist-infectioloog Radboudumc

F. Jansman, ziekenhuisapotheker-klinisch farmacoloog Deventer Ziekenhuis

R. ter Heine, ziekenhuisapotheker-klinisch farmacoloog Radboudumc

Kernboodschappen

- Op basis van de simulatiestudie geeft een continue dosering flucloxacilline van 4g/24 uur een vrije concentratie hoger dan 0,5 mg/l, de meest voorkomende MICs van *S. aureus*, bij niet-kritisch zieke patiënten.
- Bij niet-kritisch zieke patiënten met onvoldoende respons of toxiciteit adviseren wij de dosering van continu flucloxacilline aan te passen op basis van de vrije concentratie en de MIC
- Doseringen hoger dan 12 gram per 24 uur geven een grote kans op toxische blootstelling

Inleiding

Het uitblijven van nieuwe antibiotica en de toenemende resistentie dwingen ons doseringen van bestaande antibiotica te optimaliseren [1-3]. Flucloxacilline, een smalspectrum antibioticum, is geregistreerd om intermitterend toe te dienen [4]. In de praktijk wordt flucloxacilline vaak als continu infuus toegepast [5]. Dit heeft praktische voordelen, maar is mogelijk ook effectiever [6]. De tijd dat de ongebonden concentratie flucloxacilline zich boven de minimale inhiberende concentratie (MIC) bevindt ($fT > MIC$) voorspelt de effectiviteit [7-9].

Er is beperkte onderbouwing voor het continu doseren van flucloxacilline bij niet-kritisch zieke patiënten. Flucloxacilline heeft een hoge mate van eiwitbinding 95% [1]. Er zijn echter indicaties dat de eiwitbinding variabel is en afhankelijk is van serum albumineconcentraties [10-11]. Daarom is het voor het vaststellen van de juiste dosering belangrijk om de vrije concentratie flucloxacilline te meten.

Flucloxacilline wordt grotendeels renaal geklaard [4]. Voor een schatting van de glomerulaire filtratiesnelheid (GFR) wordt meestal het serum kreatinine gemeten [12]. Cystatine C is een bewezen betere marker voor de nierfunctie en kan dus nuttig zijn voor het optimaal doseren van renaal uitgescheiden middelen [13].

Het doel van dit onderzoek was om de optimale dosering voor een continu infuus flucloxacilline vast te stellen voor niet-kritisch zieke patiënten. Gezien de mogelijke invloed van de eiwitbinding en nierfunctie op de kinetiek van flucloxacilline, onderzochten we ook covariaten voor de eiwitbinding en welk nierfunctiealgoritme het beste de kinetiek van flucloxacilline voorspelt.

Methoden

Dit onderzoek betrof een multi-center observationele farmacokinetische studie, goedgekeurd door de medisch ethische toetsingscommissie en geregistreerd in het Nederlandse Trial Register (NTR 5934) [14].

Onderzoekspopulatie

Patiënten ≥ 18 jaar, opgenomen in het Deventer Ziekenhuis of het Radboudumc, die werden behandeld met intraveneus flucloxacilline, kwamen in aanmerking voor inclusie. Exclusiecriteria waren opname op de intensive care en zwangerschap. Er werden 20 patiënten met een intermitterend en 10 patiënten met een continu infuus geïncludeerd. Het benodigde aantal patiënten en het sampleschema werd gebaseerd op basis van stochastic simulation and estimation (SSE) studie, gebaseerd op een eerder ontwikkeld farmacokinetisch model voor gezonde vrijwilligers [15].

Monsternamen en bioanalyse

Bij een intermitterend regime werd er, na het bereiken van steady state, op drie tijdstippen [$t=0$ (dal), 0,5 en 3 uur na het inlopen van het infuus] bloed afgenomen. Bij patiënten met continue infusie werd op steady state één bloedmonster afgenomen. De monsternamen werden bij beiden groepen de volgende dag herhaald.

Ook werden demografische gegevens, serum kreatinine, serum ureum, cystatine C, albumine, triglyceriden en CRP verzameld. Flucloxacillineconcentraties in serum en ultrafiltraat werden bepaald met een HPLC-methode met UV-detectie, gevalideerd volgens de EMA-richtlijnen [16].

Farmacokinetische analyse

De farmacokinetische analyse werd uitgevoerd met behulp van non-linear mixed effects modelling (NONMEM V7.4.1) [17]. Er werd gebruik gemaakt van de "first order conditional estimation method" met interactie (FOCEI). Er werd een integraal model gemaakt voor de totale en vrije concentraties van

flucloxacilline. De Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) kreatinine [18], CKD-EPI kreatinine-cystatine [13], CKD-EPI cystatine [13] en de MDRD [19] werden getest als covariaat. Albumine, triglyceriden en ureum werden getest als covariaat vanwege een mogelijk effect op de eiwitbinding [20-21]. Niet-geneste modellen werden beoordeeld aan de hand van het "Akaike Information Criterion" (AIC) [21].

Simulatiestudie

Het finale model is gebruikt om Monte Carlo simulaties uit te voeren van 14 doseringen (1-14g/24 uur), waarbij er 1000 patiënten (GFR=90 mL/min, variatiecoëfficiënt 30%) werden gesimuleerd per dosering. Aan de hand hiervan werd de fractie met adequate blootstelling (100% $fT > MIC$) berekend voor de representatieve MICs evenals de kans op toxische blootstelling. Een vrije concentratie $> 7,5$ mg/L verhoogt de kans op toxiciteit. De vrije concentratie is berekend op basis een totale concentratie van 125 mg/L [23] en een serumalbumine van 35g/L.

Resultaten

Onderzoekspopulatie

Tussen januari en december 2017 werden er 30 patiënten geïncludeerd.

De klinische en demografische gegevens zijn weergegeven in tabel 1. Bij twee patiënten werden er bijwerkingen (flebitis en verhoogd ASAT/ALAT) ten gevolge van flucloxacillinetoediening gemeld.

In onze populatie varieerde de eiwitbinding tussen de 64,6% en 97,1%. De ongebonden fractie nam toe naarmate het serumalbumine afnam of de ongebonden concentratie toenam. De data werden het best beschreven met een 2-compartimenten model. In ons model werd de verzadigbare eiwitbinding beschreven met een Michaelis-Menten vergelijking, waarbij de albumine-concentratie recht evenredig was met de maximale bindingscapaciteit.

Covariaatanalyse

Toepassing van de CKD-EPI kreatinine-cystatine resulteerde in de grootste afname van de AIC. De nierfunctie verklaarde 21% van de inter-individuele variabiliteit in klaring. Albumine verklaarde 50% van de inter-individuele variabiliteit van de maximale bindingscapaciteit.

Variatie in serumureum- of triglyceridenconcentraties verklaarden geen variatie in eiwitbinding. De schattingen voor het uiteindelijke model staan in tabel 2.

De interne validiteit van het uiteindelijke model werd bevestigd door een visual predictive check (VPC). Hierin is zichtbaar dat zowel de ongebonden als totale concentratie flucloxacilline zonder bias voorspeld wordt, de gemeten waarden vallen binnen het betrouwbaarheidsinterval van de gesimuleerde percentielen (figuur 1+ 2).

Simulatiestudie

Op basis van de simulatie geeft een continu infuus van 2g/24 uur een vrije concentratie flucloxacilline >0,25 mg/L op steady-state bij 94,0% van de populatie. Bij 93,4% werd bij een dosering van 4g/24 uur een vrije concentratie flucloxacilline >0,5mg/L bereikt. Met 12g/24 uur werd bij 88,9% van de populatie een vrije concentratie >2mg/L bereikt (figuur 3). De kans op toxische blootstelling (>7,5 mg/L vrije concentratie) was 2, 18 en 24% bij doseringen van 6, 12 en 14g/24 uur.

Beschouwing

Ons model voorspelt dat een dosering van 4g/24 uur voldoende hoog is om ongebonden flucloxacillineconcentraties te bereiken groter dan 0,5 mg/L, de meest voorkomende MICs van *S. aureus*, bij niet kritisch zieke patiënten. Daarnaast blijkt dat flucloxacilline een verzadigbare eiwitbinding vertoont. Tenslotte geeft de combinatie van cystatine C met kreatinine de beste voorspelling van de klaring.

De variabiliteit in klaring is slechts deels te verklaren door het toevoegen van de nierfunctie als covariaat aan het model. Zoals verwacht beschreef de CKD-EPI kreatinine-cystatine C formule deze variabiliteit het beste [13]. Gezien het geringe effect van de nierfunctie op klaring in onze studie lijken dosisaanpassingen op basis van nierfunctie indien de GFR >30 ml/min is niet nodig. De geteste covariaten zijn geselecteerd om basis van klinische plausibiliteit. Niet-lineaire eiwitbinding van flucloxacilline werd eerder gesuggereerd door Wong et al [10], maar niet eerder werd deze relatie goed gekwantificeerd. Totale concentraties zijn niet representatief voor de ongebonden concentraties.

Op basis van de simulatie geeft een continu infuus van 2g/24 uur een vrije concentratie flucloxacilline >0,25 mg/L op steady-state. In de praktijk worden de meeste infecties veroorzaakt door micro-organismen met een MIC <0,25 mg/L [24]. Voor het minst gevoelige micro-organisme wordt een MIC van 2 mg/L aangehouden. Een dosering > 12g/24 uur is nodig om een adequate spiegel te behalen. 24% bereikte bij een dosering van 14g/24 uur echter een vrije concentratie >7,5mg/L. Een vrije concentratie >7,5 mg/L geeft een 50% grotere kans op neurotoxiciteit [23]. In de praktijk wordt, afhankelijk van de indicatie, een continue dosering van 4, 6 of 12g/24uur aangehouden. Uit ons onderzoek blijkt dat deze doseringen voldoende hoog zijn om de meest voorkomende infecties te behandelen. Over het algemeen worden deze doseringen goed verdragen en treden er weinig bijwerkingen op [25-26]. Dit zagen wij ook terug in onze studiepopulatie. Bij toxiciteit of twijfel aan de effectiviteit van flucloxacilline kan het nuttig zijn de vrije concentratie te meten. Op basis van de vrije concentratie, de MIC van het betreffende micro-organisme en bovengrenzen van 7,5 mg/L adviseren wij de dosering aan te passen.

Een sterk punt van deze studie is het feit dat er vrije concentraties zijn gemeten in plaats van uit te gaan van een vast percentage eiwitbinding, zoals eerdere studies. Het is echter niet altijd bekend hoe de serumconcentratie gerelateerd is aan de concentratie op de plaats van infectie. Deze studie had als doel om de farmacokinetiek te beschrijven, er is geen klinische uitkomstmaat gemeten.

Conclusie

Dit onderzoek voorspelt dat met een continue dosering flucloxacilline van 4g/24 uur een vrije concentratie hoger dan 0,5 mg/L, de meest voorkomende MICs van *S. aureus*, bij niet kritisch zieke patiënten wordt bereikt. Bij toxiciteit of onvoldoende respons kan op basis van bepaling van de vrije concentratie flucloxacilline de dosering worden aangepast. Aanpassing van de dosis op basis van nierfunctie lijkt niet nodig bij een GFR > 30ml/min.

Literatuurlijst

1. Spellberg, B. The future of antibiotics. *Crit Care*. 2014; 18(3): 228.
2. WHO. Antibiotic Resistance: Multi-country public awareness survey 2015
3. Cole ST. Who will develop new antibacterial agents? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1645):20130430.
4. Summary of product characteristics flucloxacilline
5. Leder, K. et al. The clinical efficacy of continuous-infusion flucloxacillin in serious staphylococcal sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 1999 Jan;43(1):113-8.
6. Mouton, J. et al. Continuous infusion of beta-lactams. *Curr Opin Crit Care*. 2007 Oct;13(5):598-606
7. Nielsen E. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4619-30
8. Drusano, G. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(4):289-300.
9. MacVane, S. et al. Prolonging D-lactam infusion: a review of the rationale and evidence, and guidance for implementation. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(2):105-13
10. Wong, G. et al. Protein Binding of D-Lactam Antibiotics in Critically Ill Patients: Can We Successfully Predict Unbound Concentrations? *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Dec; 57(12): 6165-6170.
11. Pullen J. et al. Protein binding of flucloxacillin in neonates. *Ther Drug Monit*. 2007 Jun;29(3):279-83.
12. Stevens, L. et al. Assessing kidney function, measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med*. 2006 Jun 8;354(23):2473-83
13. Inker, L. et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med*. 2012 Jul 5;367(1):20-9.
14. <http://www.trialregister.nl/trialreg/admin/rctview.asp?TC=5934>
15. Landersdorfer, C. et al. Population pharmacokinetics at two dose levels and pharmacodynamic profiling of flucloxacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(9): 3290-3297
16. Guideline on bioanalytical method validation [geraadpleegd op 23-01-2018] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
17. Lindbom, L. et al. PsN-Toolkit—a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed*. 2005;79: 241-57
18. Levey, A. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009 May 5;150(9):604-12
19. Levey, A. et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999;130:461-70.
20. Wasan, K. et al. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Jan;7(1):84-99.
21. Ulldemolins, M. et al. Flucloxacillin dosing in critically ill patients with hypoalbuminaemia: special emphasis on unbound pharmacokinetics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65: 1771-1778
22. Mould, D. et al. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013 Apr; 2(4): e38.
23. Imani, S. et al. Too much of a good thing: a retrospective study of D-lactam concentration-toxicity relationships. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Oct 1;72(10):2891-2897.
24. MIC verdeling *S. aureus* [geraadpleegd op 23-01-2018] <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Mididmic&NumberIndex=50&Antib=1&Specium=498>
25. Leder, K. et al. The clinical efficacy of continuous-infusion flucloxacillin in serious staphylococcal sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 1999 Jan;43(1):113-8.
26. Howden, B. et al. The efficacy of continuous infusion flucloxacillin in home therapy for serious staphylococcal infections and cellulitis. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Aug;48(2):311-4.

Tabel 1: Demografische en klinische gegevens studiepopulatie

	Studiepopulatie, (n=30) gemiddelden met range
Geslacht	23 mannen
Leeftijd (jaren)	64 (21-91)
Lengte (cm)	177 (164-190)
Gewicht (kg)	91,1 (63,1-1-129,0)
Kreatinine (umol/l)	84 (48-140)
Cystatine C (mg/l)	1,19 (0,64-2,53)
CKD CR CYS (ml/min)	91 (32-140)
Albumine (g/l)	27,3 (15,7-35,0)
Triglyceriden (mmol/l)	5,7 (1,3-16,4)
Serum ureum (mmol/l)	1,9 (0,6-3,4)
CRP (mg/l)	127(11-401)
Indicatie	
-Infectie na heup/knie vervanging	7
-Erysipelas	9
-Overig	14
Kweekuitslag	
- S. Aureus	12
- Overig	6
- Onbekend	15
Dosering (mg/24 uur)	
- 4000	10
- 6000	18
-12000	2
Duur therapie (in dagen)	14,5 (3-56)
Aantal verzamelde monsters totaal flucloxacilline	
- Continu infuus	20
- Intermitterend infuus	117
Aantal verzamelde monsters ongebonden flucloxacilline	
- Continu infuus	20
- Intermitterend infuus	116

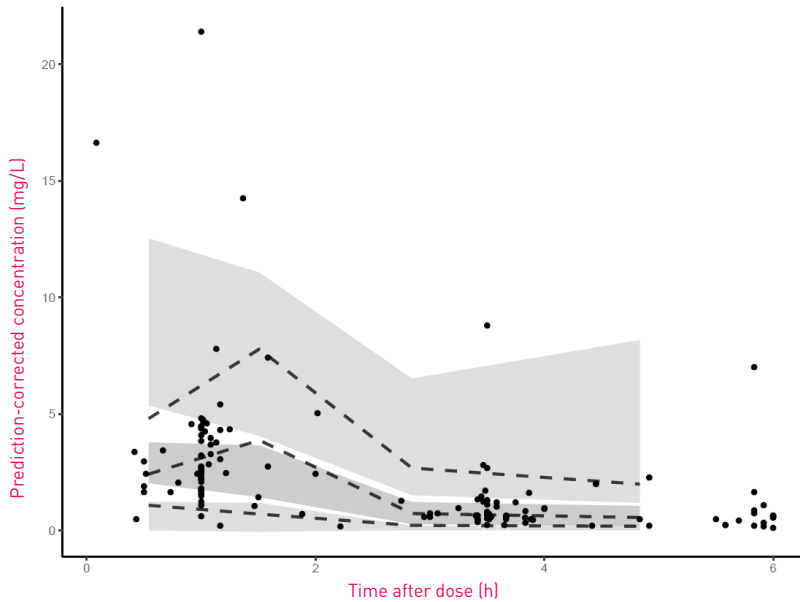
Tabel 2: Schattingen van het finale nonmemmodel

Parameter	Schatting	Parameter-onzekerheid (%CV)
Totale klaring (L/H) = $\theta_{\text{clearance}} + (\theta_{\text{renal}} * \{eGFR-90\})$		
θ_{nonrenal}	122 L/h	11.1%
θ_{renal}	1.41 L/h per mL/min	22.3%
Centraal verdelingsvolume	190 L	23.2%
Perifeer verdelingsvolume	84 (48-140)	
Intercompartmentele klaring	1,19 (0,64-2,53)	
Eiwitbinding		
$C_{\text{tot}} = C_u + (\theta_{\text{bmax}} * (1 + \theta_{\text{alb}} * \{ALB-25.6\}) * C_u) / (\theta_{\text{kd}} + C_u)$		
θ_{bmax}	177 mg/L	13.4%
θ_{alb}	0.054 mg/L per g/L	10.6%
θ_{kd}	9.63 mg/L	16.2%
Inter-individuele variabiliteit		
Klaring	54.3%	28.7%
Centraal verdelingsvolume	94.7%	38.1%
Bmax	14.1%	46.1%
Residuale fout		
Ongebonden concentraties	45.1%	17.2%
Gebonden concentraties	41.7%	16.9%
Correlatie	93%	16.7%

eGFR: individuele glomerulaire filtratiesnelheid, bepaald met de CKD-EPI CREAT CYS

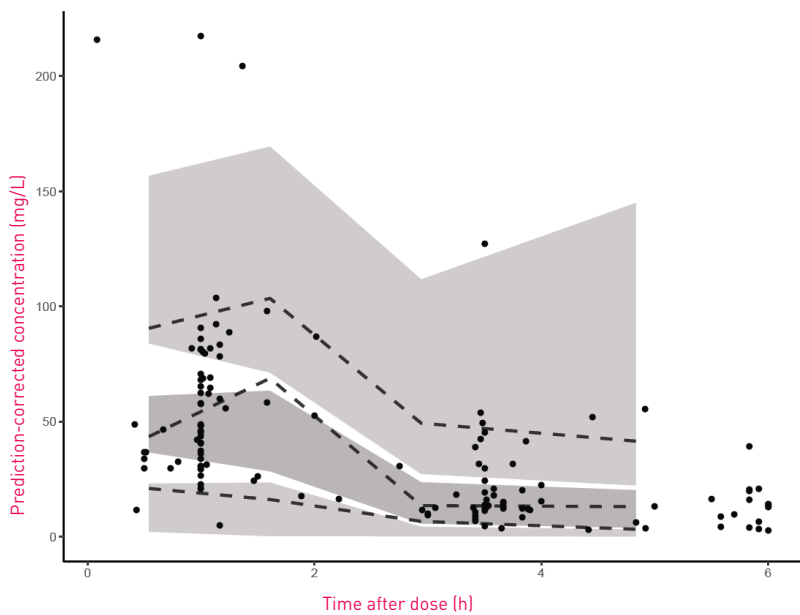
C_{tot} = Totale concentratie

C_u = ongebonden concentratie



Figuur 1:

VPC van de ongebonden concentratie flucloxaciline
De punten geven de geobserveerde waarden weer.
De grijze vlakken zijn het betrouwbaarheidsinterval van het 10^e, 50^e en 90^e percentiel van de gesimuleerde data.
De zwarte stippellijn verbindt het 10^e, 50^e en 90^e percentiel van de geobserveerde data.

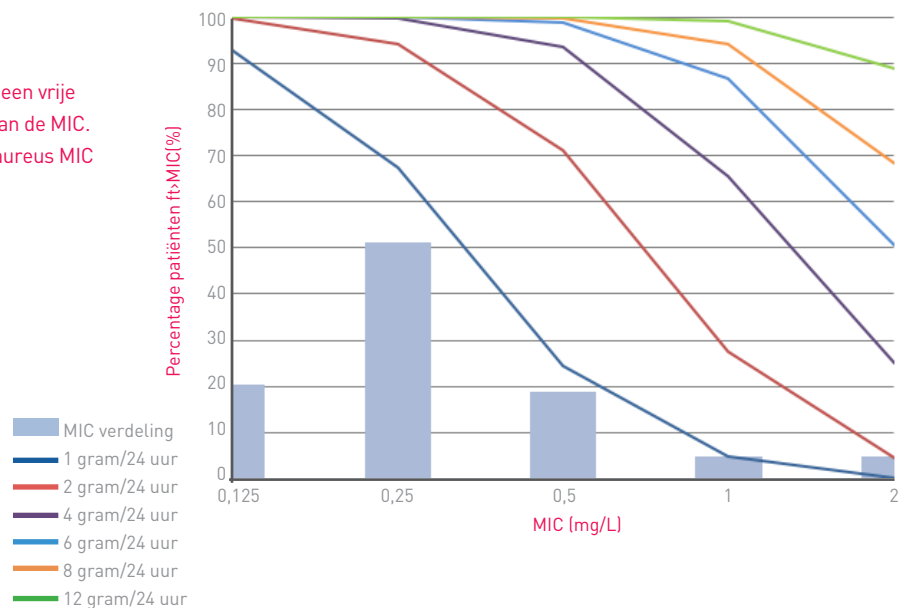


Figuur 2:

VPC van de totale concentratie flucloxaciline
De punten geven de geobserveerde waarden weer.
De grijze vlakken zijn het betrouwbaarheidsinterval van het 10^e, 50^e en 90^e percentiel van de gesimuleerde data.
De zwarte stippellijn verbindt het 10^e, 50^e en 90^e percentiel van de geobserveerde data.

Figuur 3:

Het voorspelde percentage patiënten dat een vrije concentratie flucloxaciline heeft hoger dan de MIC.
De balken geven de distributie van de *S. aureus* MIC weer [24].



Het verhogen van de AOW leeftijd wat doet het met ons?

Het is al enige tijd aan de gang maar de AOW leeftijd zou geleidelijk aan verhoogd worden tot 70. Dit alles in het kader van het betaalbaar maken van de ouderen zorg doordat de gemiddelde leeftijd inmiddels hoger is dan toen het plan van de ouderen zorg bedacht werd. Voor mij betekende dat gezien mijn geboortedatum dat ik pas AOW zou ontvangen op 66 jaar en 3 maanden.

Niets is zeker want deze leeftijdsgrens zou opnieuw bekeken worden wat kan betekenen dat de grens opgetrokken zou worden afhankelijk van de gemiddelde leeftijd op dat moment. Dat gebeurde dus ook en inmiddels is de AOW leeftijd weer opgetrokken in juni 2015 wat voor mij betekend dat ook ik pas AOW krijg op mijn 67e. Het uitgangspunt van de regering is dat er niet langer dan 18 jaar gemiddeld een AOW premie betaald kan worden. Dus met het verhogen van de leeftijdsverwachting wordt ook de AOW leeftijd verhoogd.

Het geeft wel stof tot nadenken want hoe gaan wij dit dan doen?

Is dat voor ons wel vol te houden zowel fysiek als lichamelijk. Statistisch gezien begint het aantal lichamelijk klachten toe te nemen boven de 60 en dat is gemiddeld want ouderdomsklachten kunnen eerder of later plaatsvinden en hoe ouder we worden hoe meer kans op bijv. diabetes, hart en vaatziekten, artrose of nog erger. Een feit is wel dat op dit moment het percentage ziekteverzuim omhoog gaat met name bij de 55 plussers. Hoe zien we dat voor ons ...een leeftijdgenoot van mij loopt al met een rollator door de apotheek en is daardoor een stuk trager. Moeten we misschien het bedrijfsuitje aanpassen en een rollator-race gaan houden?

Een ander moest afhaken vanwege gezondheidsklachten en zit na herhaalde re-integratie trajecten in de ziektewet, inmiddels werkt ze niet meer. Meer hulpmiddelen zullen

aangeschaft moeten worden om verpakkingen te openen vanwege artrose. Digitale pipetten worden aangeschaft om dezelfde rede.

En als we een oproep krijgen en midden in de nacht ons bed uit moeten, moeten we dan eerst de thuiszorg inschakelen om ons aan te kleden...kunnen we dan nog wel binnen een half uur op de werkplek zijn. Natuurlijk is dit een beetje overdreven maar het maakt wel duidelijk hoe de vlag erbij kan staan.

Sneller worden we in ieder geval niet en dat betekent zowel onze lichamelijk als fysieke welzijn. De oudere medewerker vaart op zijn ervaring en dat is heel wat waard. Hoe gaan de jonge mensen hierop reageren want die kunnen dit moeilijk begrijpen. Kortom de wereld op zijn kop want ondertussen zitten er ook aardig wat jonge mensen werkeloos thuis. Inmiddels trekt de arbeidsmarkt weer aan doordat het economisch weer beter gaat met ons land.

Bovendien is het niet voor iedereen mogelijk om eerder te stoppen met werken omdat het gewoon geld kost. Natuurlijk thuiszitten is ook geen optie maar geleidelijk aan afbouwen lijkt noodzakelijk om het langer vol te houden. Heb je niet veel pensioen opgebouwd dan is het aan te raden om zo lang mogelijk door te werken want anders wordt het bikkelen op bijstandsniveau.

Margot Bakker
mbakker@rijnstate.nl

Het opzetten van een methode voor toxicologisch onderzoek

op de LC-MS Exactive ter

vervanging van het STIP systeem.

G. Hommema, S. Koopmans, J.P. Yska | Klinisch Farmaceutisch Laboratorium, Medisch Centrum Leeuwarden

Samenvatting

Ter vervanging van het STIP-systeem (systeem voor Systematische Toxicologische Identificatie Procedure) zijn voor klinisch toxicologisch onderzoek tegenwoordig diverse systemen beschikbaar met massaspectromie voor detectie. Met behulp van een LC-MS systeem met een Exactive® OrbiTrap massaspectrometer is een analysemethode opgezet voor screening en semi-kwantitatieve bepaling van componenten in serum voor toxicologisch onderzoek. Voorbewerking van een monster gebeurt door middel van eiwit precipitatie met behulp van water-acetonitril (15:85, v/v). De interne standaard is nortriptyline d3. De looptijd is 15 minuten met een gradiënt van 10 mM ammoniumformiaat/0,1% mierenzuur in water buffer en 10 mM ammoniumformiaat/0,1% mierenzuur in methanol buffer. Semi-kwantificering heeft plaats met een 1-punts kalibratie met behulp van TDM controles. De methode is geschikt voor circa 200 componenten en is gereed om te worden gevalideerd.

sleutelwoorden

Klinische Toxicologie, UHPLC, LCMS, OrbiTrap massaspectrometer, STIP systeem, TDM.

Inleiding

Momenteel wordt in het Klinisch Farmaceutisch Laboratorium van de ziekenhuisapotheek van het Medisch Centrum Leeuwarden het STIP-systeem (systeem voor Systematische Toxicologische Identificatie Procedure) gebruikt voor de identificatie en het (semi)kwantitatief bepalen van componenten in serum bij patiënten met een intoxicatie. Het STIP-systeem, gebaseerd op HPLC, DAD en een softwarebibliotheek, is in Nederland jarenlang de meest gebruikte techniek geweest bij klinisch toxicologisch onderzoek. Met de komst van UHPLC en massaspectrometrie zijn tegenwoordig diverse andere systemen beschikbaar voor screening en kwantificering in de klinische toxicologie [1]. Ter vervanging van het STIP-systeem heeft ons laboratorium een LC-systeem met een Exactive Orbitrap® (Thermo Scientific) als detector aangeschaft (figuur 1). Het voordeel van deze massaspectrometrische methode is het met meer zekerheid kunnen vaststellen welke componenten in het monster aanwezig zijn, snellere opwerkingstijd met minder materiaal en de mogelijkheid van een snelle update van de toxicologie bibliotheek.

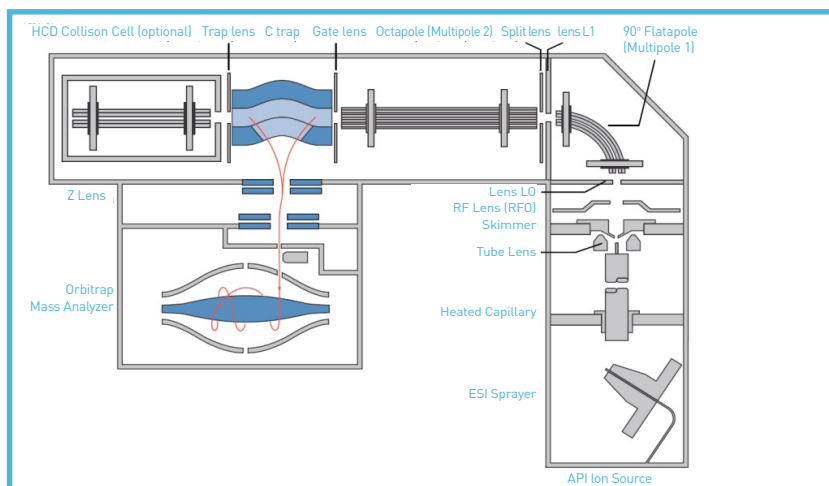
De Exactive bestaat uit drie belangrijke componenten:

- De ion bron: HESI (Heated Electro Spray Ionisation)
- (C-Trap) Tussentijdse opslag van ionen die nodig is voor korte puls injectie.
- De Orbitrap detector voor Foerier transform massa analyse.

In de octapool worden de ionen geselecteerd met m/z 50 – 1000. Er wordt geen gebruik gemaakt van de collision cel, met andere woorden er wordt niet gefragmenteerd en voorlopig alleen op basis van exacte massa en retentietijd geïdentificeerd.

Doel

Het opzetten en optimaliseren van een toxicologische methode met meer mogelijkheden en zekerheid dan het STIP systeem. De LC-MS methode, van de firma Thermo Fisher, is als basis gebruikt voor verdere optimalisatie.[2] In dit onderzoek werd bepaald welke componenten kunnen worden aangetoond en het vermogen van de methode om de te bepalen component te onderscheiden van andere bestanddelen van de matrix (selectiviteit). Vervolgens werd bepaald of de methode alleen reageert op de component/massa (specificiteit). Deze parameters worden nader



uitgewerkt in de validatie van de methode. Deze valt niet binnen dit onderzoek. Ook werd gekeken naar de robuustheid van het systeem door drie kolommen met een verschillend chargenummer te testen.

Materialen en methoden

Reagentia

De interne standaard nortriptyline d3 HCl (als vrije base) 0.1 mg/ml in methanol werd betrokken van Cerilliant (Round Rock, Texas, Verenigde Staten). Methanol LiChrosolv, acetonitril Lichrosolv en mierenzuur werden betrokken van Merck KGaA (Darmstadt, Duitsland). Ammoniumformiaat werd betrokken van Acros Organics (Geel, België). Water voor injectie, (steriel water voor irrigatie) werd betrokken van Baxter (Utrecht, Nederland). Plasma controles MassCheck level 2, antiepileptic, neuroleptic 1-2, TCA 1-2, antidepressants 1-2, benzodiazepines, antimycotics, antiarrhythmics, werden betrokken van Chromsystems, (Gräfelfing, Duitsland). ClinCheck controle antidepressiva werd betrokken van Recipe Chemicals (München, Duitsland). Pierce LTQ ESI Positive Ion calibration solution werd betrokken van Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, Verenigde Staten).

Apparatuur en condities:

Het (U)HPLC systeem (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000, Waltham, MA, USA) was samengesteld uit een binaire Ultimate 3000 DGP-3600 RS pomp, en een online vloeistof ontgasser, een temperatuur-gecontroleerd Ultimate kolom compartiment, een Ultimate 3000 autosampler.

Chromatografische scheiding werd uitgevoerd op een Thermo Scientific Hypersil Gold PFP 3 µm, 150 x 2.1 mm kolom. De temperatuur van de kolom werd gehandhaafd op 30°C en de autosampler temperatuur was 10°C. Het injectie volume was 10 µL en de looptijd was 15 minuten. De mobiele fase bestond uit (C) 10 mM ammonium formiaat en 0.1% (v/v) mierenzuur in water en (D) ammonium formiaat en 0.1% (v/v) mierenzuur in methanol.

In de methode van Thermo werd gebruik gemaakt van ammoniumacetaat. Ammoniumformiaat is beter geschikt voor buffers met een pH3.

Ammoniumacetaat is geschikt voor buffers met pH4. Veel medicijnen zijn basische componenten met een pKa van rond de 5. Op theoretische gronden daarvan is gekozen voor de ammoniumformiaat buffer. Voor gradiënt en flowrate, zie Tabel 1.

Time (min)	Flow ml/min	%C	%D	Curve Gradiënt
0	0,4	90	10	5
0,5	0,4	90	10	5
7,0	0,4	5	95	5
9,5	0,4	5	95	5
9,6	0,4	90	10	5
15,0	0,4	90	10	5

Overzicht van de gradiënt en flow

De druk van het systeem was 200 bar. Detectie van de componenten en de interne standard Nortriptyline d3 werd uitgevoerd op een hoge resolutie accurate massa Exactive® massa spectrometer voorzien van Orbitrap detectie (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). De Orbitrap is een massaspectrometer die ionen tijdelijk opslaat, "trappen" in een orbitale beweging. De bewegingsbaan, image current, van de trapped ionen werd gedetecteerd en geconverteerd tot een massa spectrum, gebruik makend van fouriertransformatie van het frequentiesignaal.

Dagelijks werd het systeem gekalibreerd. Tijdens de run werd gebruik gemaakt van een Lockmass. Als component wordt di-iso-octyl phtalaat (C24H38O4) gebruikt, een plasticiser uit de peak tubing die in het eluens oplost.[3] De instellingen, van de heated electrospray ionisatie bron en de instellingen tijdens het scannen zijn weergegeven in tabel 2.

Scan parameters		
History		
Scan range	50.0 to 1,000.0 m/z	
Fragmentation	HCD Gas On	
Resolution	High	
Polarity	Positive	
Microscans	1	
Lock masses	Pos: 391.2843	
AGC target	Balanced	
Maximum inject time	250 ms	
<input type="button" value="Apply"/> <input type="button" value="Help"/> <input type="checkbox"/> Hot link		
HESI source		
Sheath gas flow rate	50	actual
Aux gas flow rate	30	0
Sweep gas flow rate	0	0
Spray voltage (kV)	3.00	0.05
Spray current (µA)		0.00
Capillary temp. (°C)	350	350
Capillary voltage (V)	25.00	
Tube lens voltage (V)	98.00	
Skimmer voltage (V)	16.00	
Heater temp (°C)	300	41

Overzicht van de instellingen van de ionisatiebron en de scan parameters

Monstervoorbewerking

100 µL van de plasmacontroles werd in een 5 mL borosilicaat reageerbuis gepipetteerd en 750 µL precipitatie reagens werd toegevoegd. Het eiwit precipitatiereagens bestond uit de interne standaard nortriptyline d3 25 µg/L in water-acetonitril 15:85 v/v. Het mengsel werd 5 seconden gemixt op de vortex. Daarna werd de reageerbuis 5 minuten geschud op een Multi Reax schudapparaat (Heidolph Instruments, Schwabach,

Duitsland) bij 1400 rpm. Het monster werd 5 minuten gecentrifugeerd bij 5000 rpm. 250 µL van de bovenstaande heldere vloeistof werd overgebracht in een schone 10 mL borosilicaat reageerbuis. Het monster werd in 15 minuten droog gedampt in een IR-dancer (Hettlab AG, Bäch, Switzerland) bij 30-35 °C.

Het residu werd opgelost in 250 µL mobiele fase C. Het monster werd overgebracht in een gelabelde au-tosampler vial en 10 µL werd geïnjecteerd in het chromatografie systeem. Bij de screening werd gekeken naar de massa's van alle componenten binnen een massabereik van 50-1000 m/z. Om de specificiteit aan te tonen werden de resultaten vergeleken met de toxicologie bibliotheek van het MCL. Er werd een analysemonster meegenomen, waarvan de heldere bovenstaande vloeistof na precipitatie niet droog gedampt werd. Dit om het verschil in piekvorm met en zonder droogdampen aan te tonen. Om de selectiviteit aan te tonen werden monsters meegenomen die één of meerdere componenten met dezelfde mol massa bezaten. In navolging van de STIP methode werd een STIP testmengsel, (ZANOB 's-Hertogenbosch, Nederland) meegenomen. Het testmengsel bestond uit een aantal componenten, die op verschillende tijdstippen elueren. Het testmengsel werd elke keer meegenomen na aanmaak van nieuw eluens. De analysemonsters werden op drie kolommen met verschillende charges gemeten voor de robuustheidstest, met als eis dat de retentietijd tussen de kolommen niet meer dan ± 2,5% mocht afwijken. Gemeten werd of een piek uit genoeg meetpunten bestond om te kunnen kwantificeren.

Identificering ruwe data:

Er zijn twee mogelijkheden om de ruwe data te identificeren. Met behulp van het programma ToxID van de firma Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, Verenigde Staten) kan aangetoond worden welke componenten in de toxicologie aanvraag aanwezig zijn, door de gevonden massa's en bijbehorende retentietijden te vergelijken met data van een bibliotheek.

Er zijn twee verschillende bibliotheken beschikbaar.

- Toxicologie bibliotheek van het MCL: Hierin staan de componenten die op ons systeem getest zijn en waarvan de retentietijden bekend zijn. Het grootste gedeelte van deze componenten kan (semi)kwantitatief berekend worden. Op dit moment bevat de bibliotheek ongeveer 200 componenten.
- Toxicologie bibliotheek van Thermo: Dit is de toxicologie bibliotheek van de firma Thermo Fisher met meer dan 600

componenten. Deze bibliotheek kan worden gebruikt om te screenen of er mogelijk nog meer componenten in het monster aanwezig zijn.

De tweede mogelijkheid voor identificatie die de Orbitrap biedt, is om na afloop van een run, met behulp van de exacte massa gericht te zoeken op structuurformule voor identificering van onbekende componenten. Deze mogelijkheid geeft mede de meerwaarde aan ten opzichte van het huidige STIP systeem.

Indien een component niet in de toxicologie bibliotheek MCL aanwezig is, dan is deze "onbekende" component nog niet geverifieerd.

Resultaten en discussie

Identificering op basis van structuurformule

In het chromatogram van een toxicologisch monster werd een piek waargenomen op retentietijd 2,49 min. (figuur 2) Nader onderzoek gaf aan dat dit een piek was behorende bij een m/z van 180.1019. Met behulp van zoeken op internet naar deze m/z waarde in combinatie met navraag aan de arts, bleek het hier om de partydrug phenibut te gaan (C₁₀H₁₃N₂O₂). Later is met behulp van een standaard Phenibut de retentietijd geverifieerd. Phenibut maakt nu deel uit van de toxicologie bibliotheek van het MCL. Zie figuur 2 op pagina 30.

Monstervoorbewerking

Acetonitril in het analysemonster heeft grote invloed op de piekvorm, met name van componenten die snel van de kolom elueren (levetiracetam, theofylline). Door de heldere bovenstaande laag van het controle monster anti-epileptica van Chromsystems na precipitatie droog te dampen (figuur 3), werd de piekvorm aanzienlijk verbeterd. Zie figuur 3 op pagina 30.

Identificatie en testmengsel

Figuur 4 toont aan hoe het STIP testmengsel "nieuwe stijl" eruit ziet na meting op de Orbitrap. Alle componenten zijn in de de positieve ionisatie modus gemeten, met uitzondering van amobarbital, die in de negatieve ionisatie modus aan te tonen is. De Exactive is in staat om in een run snel te switchen tussen de positieve en negatieve modus, met behoud van genoeg meetpunten voor kwantificering.

Robuustheid

Om de robuustheid van het systeem aan te tonen, zijn 3 kolommen met verschillende charges vergeleken. De eis dat de retentietijd tussen de kolommen niet meer dan ± 2,5% mag

afwijken, is gehaald.[4], Tabel 3 laat als voorbeeld de robuustheidstest van de benzodiazepines zien. Medazepam op de HPLC kolom 67 heeft een afwijking van 3,3%. Deze waarde werd aangemerkt als uitbijter met behulp van de Dixon Q-toets op uitbijters voor benzodiazepine 1 controle:

$$96.7 = \text{uitbijter } (>0,41)$$

$$\frac{98.2 - 96.7}{99.9 - 96.7} = 0.47 \quad N = 13$$

$$\alpha = 0,05 \text{ betrouwbaarheid}$$

Zie Tabel 3 op pagina 30.

Specificiteit

Bij de screening werd gekeken naar de massa's van alle componenten binnen een massabereik van 50-1000 m/z. Allereerst werd gekeken naar alle componenten die elueren. Daarna werd, met behulp van de toxicologie bibliotheek, specifiek naar een component met behulp van zijn exacte mol massa gezocht. Door middel van dagelijkse kalibratie en de Lockmass tijdens de run is bij de methodeontwikkeling gebleken dat een exacte mol massa van ±2 ppm haalbaar is.

Selectiviteit

De selectiviteit werd bepaald door een representatief monster te analyseren waarin zich niet alleen de te onderzoeken component bevond, maar ook één of meerdere componenten die dezelfde mol massa bezitten en dus een identieke exacte massa hebben, maar op een andere retentietijd elueren. In de MCL-toxicologie bibliotheek komen de componenten in tabel 4 voor met een identieke massa. Al deze componenten zijn van elkaar te onderscheiden op basis van retentietijd.

Zie Tabel 4 en figuur 5 op pagina 30.

(Semi) kwantificering

Kwantificering is pas mogelijk als per piek in het chromatogram minimaal 10-12 meetpunten aanwezig zijn. De Orbitrap bleek dermate sensitief te zijn, dat dit aantal ruimschoots wordt gehaald.

Bij de toxicologie screening vindt (semi) kwantificering plaats met een 1-punts kallibratie met behulp van TDM controles die vooraf en dus niet op hetzelfde tijdstip als het monster gemeten zijn.

De methode is al gevalideerd voor TDM van metoprolol [5] en ketanserine.

Naast de componenten die met behulp van de TDM controles gekwantificeerd kunnen worden (140 componenten), bevat de bibliotheek van het MCL een ruime uitbreiding aan componenten die in de loop der jaren gemeten zijn en voor identificatie van een component kunnen dienen (75 componenten).

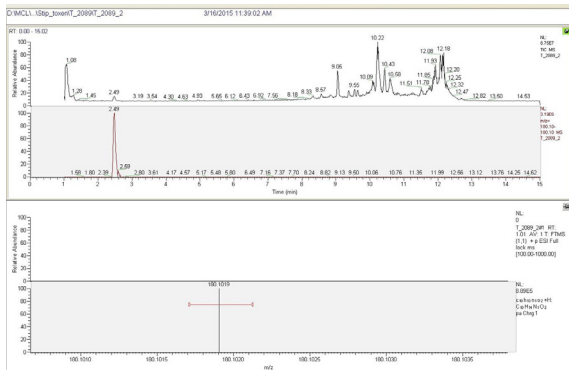
conclusie en aanbevelingen

De voordelen ten opzichte van het STIP systeem zijn de snelle opwerktijd in cito situaties en de geringe hoeveelheid materiaal die nodig is. Voor de opwerking van de STIP bepaling is 2x 1,0 mL materiaal vereist voor de basische en de zure extractie. Voor de opwerking van het massaspectrometriemonster volstaat slechts 100 µL. De robuustheid van het systeem is goed, zoals aangetoond is met drie kolommen met verschillende charges. Een testmengsel met verschillende componenten moet periodiek meegenomen worden om het verloop van de retentietijden in kaart te brengen. De methode is geoptimaliseerd op het systeem en gereed om te worden gevalideerd voor screening en (semi)kwantificering. Om ion suppressie invloeden zoveel mogelijk tegen te gaan, is het raadzaam om extra interne standaarden toe te voegen die op verschillende tijdstippen elueren. Levetiracetam d6 en tolbutamide d9 zijn al aan het precipitatie reagens toegevoegd. Tolbutamide is toegevoegd, omdat tolbutamide zowel bij positieve als negatieve ionisatie aan te tonen is. De validatie zal uitwijzen of dit voldoende is. SPE behoort tot een mogelijk alternatief. Tijdens de validatie moet er gekeken worden of er geen vals positieve monsters (serumpieken) voorkomen.

Hoge resolutie massaspectrometrie geeft een hoge selectiviteit, specificiteit en sensitiviteit. De ontwikkelde methode geeft de flexibiliteit om na een run nieuwe parameters te zoeken en toe te voegen aan de bibliotheek. Dit maakt het systeem uitermate geschikt voor toxicologische screening en kwantificering.

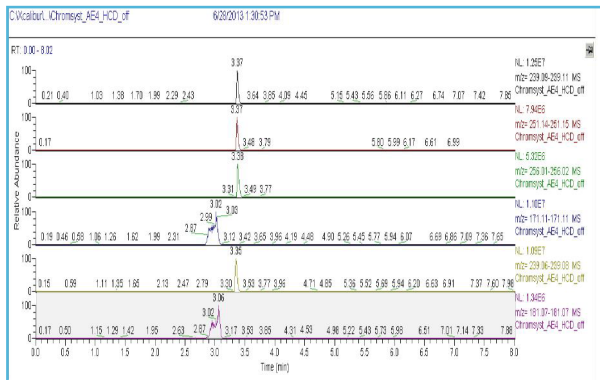
Referenties

- 1 Maurer HM, Mass Spectrometry for Research and Application in Therapeutic Drug Monitoring or Clinical and Forensic Toxicology. *Ther Drug Monit* 2018;40:389-93.
- 2 Kozak M, Rezai T. A Complete Forensic Toxicology Screening Procedure for Drugs and Toxic Compounds in Urine and Plasma Using LC-MS/MS. Thermo Fisher Scientific Inc. Application Note: 449; 2009
- 3 Lee KA, Farnsworth C, Yu W, Bonilla LE. 24-hours lock mass protection. *J Proteome Res*. 2011;10:880-5. doi:10.1021/pr100780b.Epub 2010 Dec 27.
- 4 Riley DV. Method Development and Validation of Vitamin D2 and Vitamin D3 Using Mass Spectrometry. Thesis University of Washington. 2016;Robustness testing p25.
- 5 Postma-Kunnen S, Yska JP, Hommema G, Koopmans S, Willfert B, van Roon EN. A validated high-resolution accurate mass LC-MS assay for quantitative determination of metoprolol and α-hydroxymetoprolol in human serum for application in pharmacokinetics. *J Appl Bioanal* 2017;3:49-57.

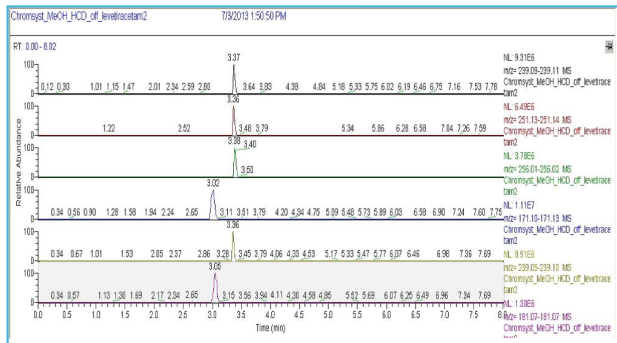


Figuur 2 Identificering op basis van structuurformule

Zonder droogdampen.



Na droogdampen.



Figuur 3 Chromatogram anti-epileptica controle monster van Chromsystems
Componenten van boven naar beneden Felbamaat, Lacosamide, Lamotrigine, Levetiracetam, Rufinamide, en Theofylline na eiwitprecipitatie zonder droogdampen (boven), en na droogdampen (onder).

Benzo 1	Kolom 67		Conc mg/L	Kolom 71		Referentie Conc mg/	Range mg/L	Kolom 72	
	RT	RT in sec		RT	RT in sec			RT	RT in sec
	7,81	468,6		7,95	477,0			7,99	479,4
	8,08	484,8		8,11	486,6			8,16	489,6
	7,58	454,8		7,6	456,0			7,66	459,6
	8,61	516,6		8,64	518,4			8,7	522,0
	8,54	512,4		8,83	529,8			8,81	528,6
	8,27	496,2		8,44	506,4			8,49	509,4
	8,12	487,2		8,19	491,4			8,25	495,0
	7,77	466,2		7,81	468,6			7,87	472,2
	8,37	502,2		8,38	502,8			8,44	506,4
	8,02	481,2		8,05	483,0			8,1	486,0
	8,99	539,4		9,02	541,2			9,07	544,2
	8,27	496,2		8,29	497,4			8,35	501,0
	8,76	525,6		8,81	528,6			8,87	532,2

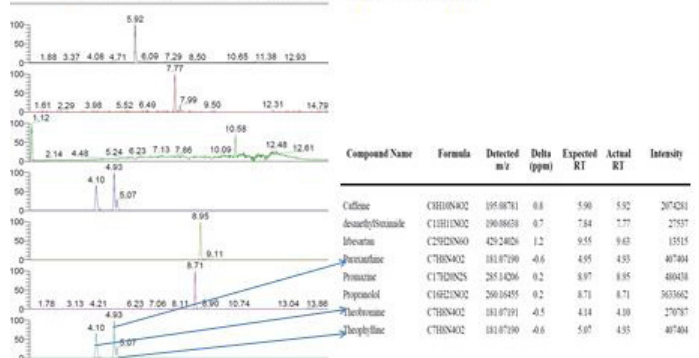
Benzo 2	Kolom 67		Conc mg/L	Kolom 71		Referentie Conc mg/	Range mg/L	Kolom 72	
	RT	RT in sec		RT	RT in sec			RT	RT in sec
	8,37	502,2		8,37	502,2			8,45	507,0
	7,58	454,8		7,6	456,0			7,65	459,0
	8,14	488,4		8,19	491,4			8,24	494,4
	8,19	491,4		8,2	492,0			8,25	495,0
	8,32	499,2		8,35	501,0			8,41	504,6
	8,54	512,4		8,56	513,6			8,59	515,4
	7,94	476,4		7,97	478,2			8	480,0
	8,22	493,2		8,23	493,8			8,28	496,8
	8,18	490,8		8,24	494,4			8,29	497,4
	8,23	493,8		8,24	494,4			8,3	498,0

Tabel 3 Overzicht retentietijden bij robuustheidstest met kolommen met verschillende charges

Humaan serum	Component	Component	Component	Massa g/mol	Formule
Monster 1	Promethazine	Promazine		320.879	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S
Monster 2	Tramadool	Desmethyl .Venlafaxine		263.381	C ₁₆ H ₁₅ NO ₂
Monster 3	Temazepam	Clobazam		300.742	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂
Monster 4	Oxcarbamazepine	Carbamazepine epoxide	Fenytoïne	252.273	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂
Monster 5	Oxazepam	4OH nordiazepam	Desmethyl clobazam	286.715	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂
Monster 6	Theobromine	Paraxanthine	Theofylline	180.167	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂

Tabel 4 Componenten met identieke massa's

Caffeine desmethylering



Figuur 5 Chromatogram cafeïne desmethylering

Figuur 5 toont de 3 metabolieten van cafeïne. Op basis van retentietijd zijn respectievelijk theobromine, paraxanthine en theofylline van elkaar te scheiden.

Extractieproblemen met Dichloormethaan: Geen zuivere koffie!

Ankie Mulder, Klinisch Farmaceutisch laboratorium, Medisch Centrum Leeuwarden (MCL)

Inleiding

Bij de analyse van diverse geneesmiddelen in het kader van TDM (Therapeutisch Drug Monitoring) met HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography met Diode-Array Detectie) en bij toxicologisch screenen gebruikt het apotheeklaboratorium van het MCL als extractiemiddel dichloormethaan. Voor extractie met dichloormethaan werd de kwaliteit HPLC grade van LAB-SCAN® gebruikt.

Eind 2010 verminderde bij de kwantitatieve methode de extractieopbrengst van lamotrigine bijna met 50 % bij het gebruik van een nieuwe charge dichloormethaan van LAB-SCAN®. De onderzochte aanwezige charges dichloormethaan van LAB-SCAN® gaven gelijkwaardige lage extractieopbrengsten voor lamotrigine. De verminderde extractieopbrengsten hadden echter geen invloed op de juistheid van de resultaten van de kwantitatieve methode. Later werd bij een toxicologische screening geen fluvoxamine aangetoond, terwijl er wel fluvoxamine aanwezig was. Door een ander laboratorium is aanwezigheid van fluvoxamine bevestigd met LCMSMS (Liquid Chromatography met tandem Mass Spectrometry). Vanwege eerdere problemen met extractieopbrengsten in basisch milieu met dichloormethaan van LAB-SCAN® is de recovery van de extractie nader onderzocht.

Oriënterend onderzoek

Fluvoxamine wordt tot nu toe niet kwantitatief op het apotheeklaboratorium van het MCL bepaald. Voor het oriënterend onderzoek is gebruik gemaakt van de semi kwantitatieve toxicologische screeningsmethode volgens het STIP-systeem (Systematische Toxicologie Identificatie Procedure). De recovery van het gehalte is bij deze methode afhankelijk van de extractieopbrengst. De KKG (Kwaliteitsbewaking Klinische Geneesmiddelenanalyse en Toxicologie) testen Psychofarmaca III zijn gebruikt als testmengsels voor het meten van de recovery van het gehalte van fluvoxamine bij de basische extractie met verschillende charges dichloormethaan van LAB-SCAN® en een charge dichloormethaan van MERCK, kwaliteit LiChrosolv®. De KKG PSYCHOFARMACA III testen bevatten behalve fluvoxamine ook paroxetine, fluoxetine en desmethylfluoxetine. Ook deze drie stoffen zijn mee genomen in het oriënterend onderzoek.

Methode en apparatuur

Methode: STIP-systeem
Apparatuur: Waters 515 HPLC-pomp
Detectie: Waters 996 PDA detector
Integratie: Empower Pro software Waters
Injectievolume: 20 µL
Kolom: LiChrospher RP-18° STIP-kolom (Merck 121568)
Flow: 0,6 mL/minuut

Reagentia:

Actonitril (LAB-SCAN® artikel C02C11X)
Dichloormethaan (LAB-SCAN® artikel C10C11X)
Dichloormethaan (Merck LiChrosolv® artikel 1.06044)
Fosforzuur 85% (Merck artikel 1.05373)
Kaliumhydroxide (Merck artikel 1.05033)
Natriumhydroxide (Merck artikel 1.06498)
Triëthylamine (Merck artikel 808353)

Water (Baxter artikel TKF7114)

Natriumhydroxide 2M oplossing

Kaliumhydroxide 10 % oplossing

Eluens:

530 mL water + (F x 705) µL fosforzuur 85% + 146 µL triëthylamine, op pH=3,3 met 10% kaliumhydroxide, + 470 mL acetonitril (F is STIP-Factor, afhankelijk van STIP-kolom).

Naam	LAB-SCAN®	MERCK		
Kwaliteit	HLPC grade	LiChrosolv		
Artikelnummer	C10C11X	1.06044		
Specificatie	Eenheid	Eis	Eis	
Assay (GC)	%	≥ 99.8	≥ 99.9	
Water	%	≤ 0.01	≤ 0.01	
Acidity	Meq/g	≤ 0.0005	≤ 0.0002	
Alkalinity	Meq/g	-	≤ 0.0002	
Transmissie	% 235 nm	≥ 70	≥ 75	
	% 240 nm	≥ 90		
	% 245 nm		≥ 98	
	% 250 nm	≥ 99	≥ 99	
	% 260 nm	≤ 0.0005	≤ 0.0004	
Evaporation residu	%	≤ 0.0005	≤	
Stabiliser		Amylene (50 ppm)	2-methyl-2 buten (=beta-isoamylene)	
			Gefiltreerd door 0.2 µm filter	

Tabel 1 DCM

Werkwijze

1,00 mL monster + 1,00 mL acetonitril.
Vortex 10 seconden.
+ 6,0 mL dichloormethaan Zwenk 20 seconden met de hand.
+ 100 µL natriumhydroxide 2M.

Discussie

De fluvoxamine wordt niet tot zeer slecht geëxtraheerd met de dichloormethaan van LAB-SCAN®. Ook bij paroxetine, fluoxetine en de desmethylfluoxetine is de extractieopbrengst met de dichloorme-

extractieopbrengst en dus hogere piekhoogte wordt de paroxetine meer gestoord bij de extractie met dichloormethaan van Merck.

Bij navraag bij onze leverancier over mogelijke oorzaak van het extractieprobleem met de dichloormethaan van LAB-SCAN® komt geen duidelijk antwoord. Mogelijk kan het gebruik van een andere stabilisator de oorzaak zijn van het verschil tussen de extractieopbrengsten tussen Merck en LAB-SCAN®.

Het productieproces van de LAB-SCAN® chemicaliën is in 2005 verplaatst van Ierland naar Polen (POCH SA). De geteste charges dichloormethaan van LAB-SCAN® komen uit Polen.

Conclusie

Dichloormethaan Lichrosolv® van Merck geeft bij basische extracten van sommige geneesmiddelen betere extractieopbrengsten dan de dichloormethaan van LAB-SCAN®. De oorzaak van de verschil in extractieopbrengsten is niet bekend. Verder onderzoek is niet noodzakelijk gevonden. Het apotheeklaboratorium van Medisch Centrum Leeuwarden gebruikt bij extracties voortaan dichloormethaan LiChrosolv® van Merck.

Test	Dichloormethaan	Opmerking
DCM A	LAB-SCAN® HPLC	Charge 1484/10 (uitgevuld in 1L fles met dispenser)
DCM B	MERCK LiChrosolv®	Charge K41022840 028
DCM C	LAB-SCAN®	

Tabel 2 DCM Dichloormethaan (DCM) gebruikt als extractiemiddel bij de testen

	Fluvoxamine	Paroxetine	Fluoxetine	Desmethylfluoxetine
Theoretisch Retentietijd	5.63	5.63	7.64	6.68
Gemeten Retentietijd	5.84	5.56	8.32	6.96
Theoretisch recovery basisch extract	69%	70%	42%	niet bekend

Tabel 3 De theoretische retentietijden en extractieopbrengsten volgens het STIP--systeem en de gemeten retentietijd

Zwenk 20 seconden met de hand. Organische fase overbrengen en onder stikstof indampen bij 40°C. Residu oplossing in 100 µL eluens. De KKG Psychofarmaca III is als monster opgewerkt en met verschillende dichloormethaan geëxtraheerd. Zie tabel 2 voor de uitgevoerde testen. Test DCM A en DCM B zijn daarna in duplo herhaald. De theoretische retentietijd en recovery van het basisch extract volgens STIP bibliotheek zijn vermeld in tabel 3. De gemeten retentietijd bij de analyse wijkt iets af ten opzichte van de theoretische retentietijd, zie tabel 3.

Resultaten

De extractie met dichloormethaan van LAB-SCAN® (DCM A, C en D) geven een lagere extractie opbrengst (zie tabel 4 en 5) dan de extractie met de dichloormethaan van Merck (DCM B). Dit is tevens zichtbaar in verschil in piekhoogtes in het chromatogram. (figuur 1 en 2). De retentietijd en het spectrum van de fluvoxaminepiek na extractie met dichloormethaan van LAB-SCAN® (figuur 1 en 4) zijn niet identiek aan de retentietijd en het spectrum van fluvoxaminepiek, na extractie met dichloormethaan van Merck (figuur 2 en 3). De extractieopbrengst van de fluvoxamine met de dichloormethaan van LAB-SCAN® is dusdanig laag dat het STIP-systeem de piek vaak niet vind (zie tabel 4 en 5). Voor de berekening van de recovery zijn de theoretische extractieopbrengsten gebruikt. Van de desmethylfluoxetine is geen extractieopbrengst bekend en is berekend met extractieopbrengst van 75%.

thaan van LAB-SCAN® slechter dan met de dichloormethaan van Merck. De theoretische retentietijden voor paroxetine en fluvoxamine zijn volgens de STIP bibliotheek gelijk. Tijdens het oriënterend onderzoek hebben paroxetine en fluvoxamine een retentietijdverschil van 0,2 -0,3 minuten en kunnen elkaar hierdoor storen. Door de betere

DCM	Fluvoxamine 0,498 mg/L		Paroxetine 0,131 mg/L		Fluoxetine 0,836 mg/L		Desmethyl- fluoxetine ¹ 0,703 mg/L					
	Recovery mg/L	%	Recovery mg/L	%	Recovery mg/L	%	Recovery mg/L	%				
A	n.m.		0,07	53	0,9835	0,39	47	0,9944	0,09	13	0,9924	
B	0,42	84	0,9987	0,07	53 ²	0,9608	1,05	126	0,9912	0,57	81	0,9924
C	n.m.			0,05	38	0,9896	0,17	20	0,9880	0,03	4	0,9108

Tabel 4 Resultaat KKG Psychofarmaca III, n.m. = geen match

DCM	Fluvoxamine 0,482 mg/L		Paroxetine 0,1445 mg/L		Fluoxetine 0,940 mg/L		Desmethyl- fluoxetine ¹ 0,686 mg/L					
	Recovery mg/L	%	Recovery mg/L	%	Recovery mg/L	%	Recovery mg/L	%				
A	0,07	15	0,8171	0,06	42	0,9873	0,28	30	0,9793	0,06	9	0,9395
A	n.m.			0,16	111	0,9949	0,95	101	0,9931	0,10	15	0,9867
B	0,50	104	0,9943	0,14	97	0,9972	1,48	157	0,9925	0,69	101	0,9928

Tabel 5 Resultaat KKG Psychofarmaca III, n.m.= geen match

¹De extractieopbrengst van desmethylfluoxetine is niet bekend. Bij onbekende extractieopbrengsten wordt 75% aangehouden.

²De paroxetine wordt gestoord door de fluvoxamine bij de extractie met dichloormethaan van Merck



Colofon

Redactie Extract:

Vincent Attevelt UMC Utrecht
V.A.C.M.Attevelt@umcutrecht.nl

Vormgeving:

Marketing & Communicatie, UMC Utrecht
Vormgeving@umcutrecht.nl

Advertenties:

NFKU
waters

CLINICAL DIAGNOSTICS AND TOXICOLOGY MEETING 2018

- November 8: Utrecht
- November 9: Brussels

Check out the agenda on www.waters.com/BNLclinical



**WHEN USING
HIGH PERFORMANCE
LC-MS/MS SOLUTIONS
IT'S AMAZING
WHAT YOU SEE**

**CLINICAL
DIAGNOSTICS
TOXICOLOGY**

This isn't just about high performance LC-MS/MS data and more efficient workflows. This is about securing a clinical mass spectrometry solutions partner that's as committed to quality as you are. Waters not only has the trusted *in vitro* diagnostic medical devices, consumables and support services you need, we also understand there is a patient behind every test result. To learn more, visit waters.com/clinical

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

PHARMACEUTICAL ▪ HEALTH SCIENCES ▪ FOOD ▪ ENVIRONMENTAL ▪ CHEMICAL MATERIALS