



Analyse van ifosfamide en cyclofosfamide in veegmonsters met iontrap GC-MS-MS

E Olijslager, C Wilbers, M Duisenberg en R Langen.

Klinisch Farmaceutisch Laboratorium
TweeSteden ziekenhuis,
Dr. Deelenlaan 5, 5042 AD, Tilburg.
EOlijslager@zamb.tsz.nl

Inleiding

Sinds begin jaren '90 worden door het klinisch farmaceutisch laboratorium van de Ziekenhuisapotheek Midden-Brabant *screeningen* uitgevoerd in het kader van *environmental workplace testing* (EWPT). Hierbij worden in ruimten waar cytostatica bereid, dan wel worden toegediend, op diverse plaatsen zogenaamde veegmonsters genomen. Om een indruk te krijgen van de blootstelling aan cytostatica wordt in deze veegmonsters ifosfamide en cyclofosfamide bepaald. Deze stoffen dienen als *marker* voor de hele groep cytostatica. Aanwezigheid van cytostatica kan een aanwijzing zijn voor een onjuiste schoonmaakprocedure en is een aanwijzing voor blootstelling van ziekenhuispersoneel aan cytostatica [1-5]. De bepaling van ifosfamide en cyclofosfamide is door ons laboratorium in de loop der jaren geoptimaliseerd en gevalideerd. Voor de bepaling is altijd GC-MS gebruikt met een *single quadrupole*. De vaak zeer vuile monsters en gevraagde lage detectiegrenzen vereisen een hoge selectiviteit. De combinatie van GC (hoog scheidend vermogen) en MS (extra selectiviteit) is dan ideaal. Toch komt het soms voor dat een GC-MS met *single quadrupole* niet selectief genoeg is bij lage concentraties. Deze analysetechniek geeft voor ifosfamide en cyclofosfamide met de door ons ontwikkelde derivatiseringsmethode maar 1 bruikbaar ion in het massaspectrum. Om de selectiviteit en gevoeligheid te verhogen is daarom een GC-MS

met *ion trap* aangeschaft. Met deze apparatuur zijn meervoudige MS metingen mogelijk. Door het eenvoudige MS spectrum zijn juist ifosfamide en cyclofosfamide zeer geschikt voor MS-MS analyse.

Chemicaliën en apparatuur

Cyclofosfamide.H₂O (Endoxan®) en ifosfamide (Holoxan®) worden geleverd door Asta Medica en diazepam (interne standaard) door Bufo.

Gaschromatograaf: Interscience
TraceGC

Autosampler: Interscience AS3000

Detector: Interscience PolarisQ ion
trap MS/MS

kolom: Restek RTX5-MS, 30 m,
0,25 mm i.d., 0,25 µm film

Standaarden

Interne standaard:

50 mg diazepam wordt opgelost in 50 mL methanol (1000 mg/L). Hiervan wordt 100 µL in een maatkolof van 50 mL gepipetteerd en aangevuld met water (2 mg/L).

Ifosfamide en cyclofosfamide stockoplossingen worden bereid door een apothekersassistente door 1 flacon ifosfamide (500 mg) respectievelijk cyclofosfamide (200 mg) op te lossen in 50 mL demiwater. Dit geeft concentraties van 10000 respectievelijk 4000 mg/L ifosfamide en cyclofosfamide.

Deze oplossingen zijn een week houdbaar bij 2°C-8°C.

Een tussenoplossing wordt bereid door uit deze stockoplossingen 50 µL ifosfamide en 125 µL cyclofosfamide in een maatkolof van 100 mL te pipetteren en aan te vullen met water. Dit geeft concentraties ifosfamide en cyclofosfamide van 5000 ng/mL. De oplossing is een week houdbaar bij 2°C-8°C.

De standaarden worden gemaakt door 1000, 1000, 200 en 50 µL tussenoplossing te pipetteren in maatkolven van 50, 100, 100 en 100 mL. Dit geeft ifosfamide en cyclofosfamide concentraties van 100, 50, 10 en 2,5 ng/mL. De standaarden worden voor iedere bepaling vers bereid.

Monstervoorbereiding

Na toevoeging van 45 mL 0,03 M NaOH worden de monsters 1 uur in een ultrasoonbad geplaatst. Van de monsters wordt 2,0 mL opgewerkt. Na toevoeging van 40 µL interne standaard worden de monsters geëxtraheerd met ethylacetaat en gederivatiseerd met trifluorazijnzuur [1-5].

GC-MS-MS instellingen

Draaggas: helium

Flow: 1,0 mL/min

Injectievolumen: 1 µL splitless

Analysetijd: 10,00 min

Temp. programma: 125 °C

(1 minuut), dan met 25°C/min
naar 325°C en dit 1 minuut.

Injector temperatuur: 225°C

Transferline temperatuur: 280°C

Bron temperatuur: 200°C

MS MS instellingen

Segment 1:

Starttijd	4,0
Precursor ion	307
Exitatie voltage	1,00
Microscans	2

Segment 2:

Starttijd	7,5
Precursor ion	256
Exitatie voltage	1,25
Microscans	2

Analyse en validatie

De GC-MS-MS methode is gevalideerd zoals omschreven in de op dit moment geldende regelgeving [2].

Concentratie [ng/mL]	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC %	Extractieopbrengst % (VC %)
100 ifosfamide	91,9	5,0	7,5	69,7 (5,4)
25	98,2	8,6	10,9	75,3 (8,0)
10	108,8	7,3	17,9	86,4 (13,1)
100 cyclofosfamide	95,7	9,9	27,4	78,7 (4,9)
25	89,3	6,4	13,8	77,0 (7,9)
10	100,5	4,4	14,8	79,0 (14,6)
75 IS diazepam				82,0 (7,8)
			GC-MS-MS	GC-MS
Ifosfamide	Detectiegrens		0,04 ng/mL	1,5 ng/mL
	Bepalingsgrenzen		0,15 – 300 ng/mL	1,5 – 300 ng/mL
Cyclofosfamide	Detectiegrens		0,02 ng/mL	1,4 ng/mL
	Bepalingsgrenzen		0,05 – 300 ng/mL	1,4 – 300 ng/mL
Voor alle bepalingen n=6				

Tabel 1: Validatieparameters GC-MS-MS analyse van ifosfamide en cyclofosfamide in veegmonsters.

De validatieparameters voor de ontwikkelde methode zijn gegeven in tabel 1. In deze tabel zijn ter vergelijking eveneens de detectiegrenzen gegeven van de GC-MS analyse.

De monstervoorbewerking met ultrasoon en de veegopbrengsten zijn bepaald door een omschreven oppervlak te vegen met een dubbele tissue, 2 keer dubbelgevouwen en gedrenkt in 5,0 mL 0,03 M NaOH. De aard van de oppervlakken die geveegd moeten worden verschilt behoorlijk. Om een indruk te krijgen van de veegopbrengst hebben wij van een ruw (marmoleum) en een glad oppervlak (metaal) de veegopbrengst bepaald (zie tabel 2). Zoals verwacht is de veegopbrengst van een glad oppervlak aanmerkelijk groter dan die van een ruw oppervlak. In de praktijk kan gesteld worden dat de veegopbrengst ligt tussen de 25 en 60%.

Discussie

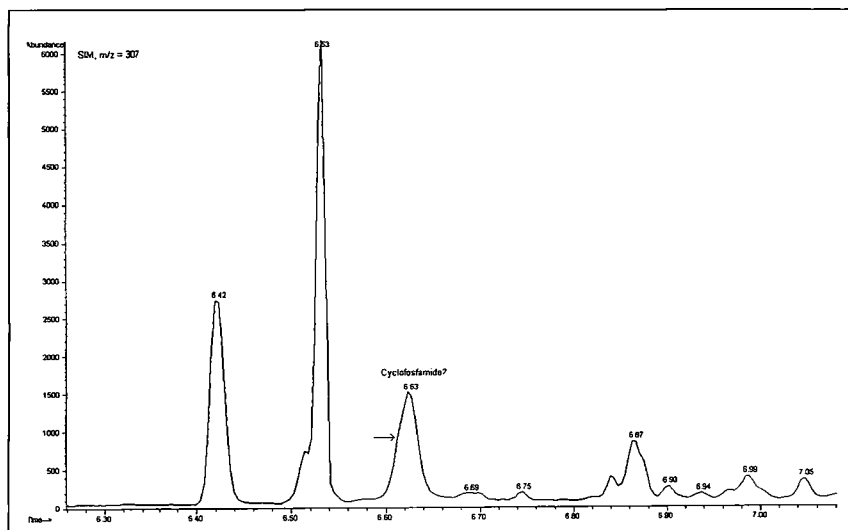
Als er in de monsters ifosfamide of

cyclofosfamide gevonden wordt, geeft dat regelmatig aanleiding tot vragen m.n. over de hoeveelheid. In de ideale situatie wordt er niets terug gevonden. Wordt er wel wat gevonden dan dient men er rekening mee te houden dat het getal afhangt van de persoon die veegt, de aard en de grootte van het oppervlak. Een negatief monster wil zeggen dat de concentratie onder de bepalingsgrens ligt. Deze bepalingsgrens is dankzij de MS-MS mogelijkheid van de *ion trap* aanzienlijk omlaag gegaan en tegelijkertijd is de selectiviteit sterk omhoog gegaan. Met een *single quadrupole* halen we bepalingsgrenzen van 1,5 en 1,4 ng/mL voor ifosfamide en cyclofosfamide wat neerkomt op een 38 en 35 ng per veegmonster (indien 2,0 mL van totaal 50,0 mL 0,03 M NaOH wordt opgewerkt). Met een *ion trap* halen we bepalingsgrenzen van 0,15 en 0,05 ng/mL voor ifosfamide en cyclofosfamide wat neerkomt op 3,8 en 1,3 ng/veegmonster. Een deel van de gevoeligheidswinst kan

opgeofferd worden door het injectievolume te halveren t.o.v. de *single quadrupole* methode. Het systeem blijft hierdoor langer schoon. In de praktijk blijkt een *ion trap* GC-MS voor ifosfamide circa 20 keer en cyclofosfamide circa 50 keer gevoeliger te zijn dan een *single quadrupole* GC-MS. Een *ion trap* GC-MS geeft tevens een enorme verbetering van de selectiviteit. Bij analyse met een *single quadrupole* GC-MS worden de retentietijd, de piekvorm en de massa's 307 en 309 beoordeeld. m/z 309 wordt echter zeer vaak gestoord, zodat deze alleen kan worden gebruikt bij hoge concentraties. Bij lage concentraties blijven dan slechts 3 beoordelingscriteria over namelijk de piekvorm (de ifosfamide piek vertoont tailing en de cyclofosfamide piek fronting), de retentietijd (deze mag niet meer dan 0,02 minuut afwijken) en m/z 307. Door m/z 307 te isoleren met een *ion trap* GC-MS en vervolgens te fragmenteren wordt een zeer specifiek dochter spectrum gecreëerd met voor zowel

Concentratie [ng/mL]	Ultrasoon opbrengst % (VC %)	Veegopbrengst marmoleum % (VC %)	Veegopbrengst metaal % (VC %)
200 ifosfamide	79,2 (5,9)	25,2 (4,6)	52,3 (15,7)
200 cyclofosfamide	101,9 (4,9)	28,6 (5,4)	59,2 (10,7)
Voor alle bepalingen n=4			

Tabel 2: Opbrengst monstervoorbewerking veegmonsters: ultrasoon en oppervlakken marmoleum en metaal.



Figuur 1. GC/MS chromatogram spoor $m/z=307$ van een veegmonster. De retentietijd van cyclofosfamide is 6,63. De voorkant van de piek lijkt gestoord (zie pijl). Berekende concentratie: 6,8 ng/mL.

ifosfamide als cyclofosfamide m/z 212 als belangrijkste massa. De kans dat twee stoffen een zelfde piekvorm, retentietijd, m/z 307 en ook nog eens hetzelfde MS-MS spectrum genereren is verwaarloosbaar klein. Ter illustra-

tie van de verbeterde gevoeligheid, selectiviteit en piekvorm zijn in de figuren 1 en 2 chromatogrammen gegeven van een veegmonster van een *single quadrupole* GC-MS analyse (figuur 1) en een *ion trap* GC-MS-

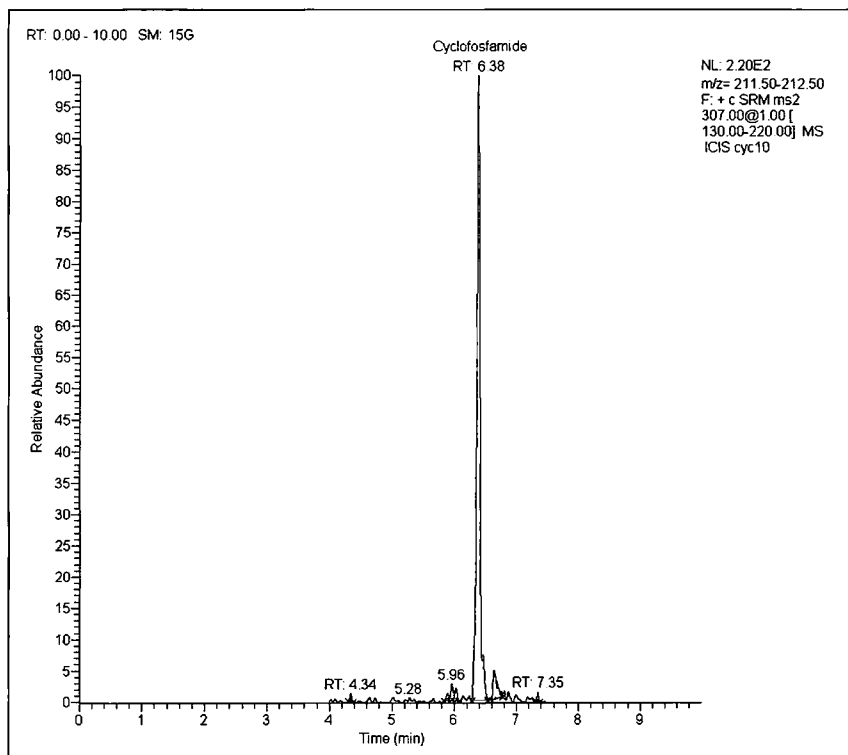
MS analyse (figuur 2). In de figuren 3 en 4 (op de volgende pagina) zijn de massaspectra en bijbehorend dochter massaspectrum van respectievelijk ifosfamide en cyclofosfamide gegeven.

Conclusie

Meervoudige massadetectie bij de analyse van veegmonsters ter beoordeling van de omgevingsbesmetting bij de bereiding en toediening van ifosfamide en cyclofosfamide geeft een enorme meerwaarde. De door ons ontwikkelde methode met *ion trap* GC-MS-MS is aanmerkelijk gevoeliger dan de eerder door ons gepubliceerde methode met *single quadrupole* GC-MS. Bovendien geeft de sterk toegenomen selectiviteit bij lage concentraties geen reden tot discussie. In mei 2005 zal de methodeontwikkeling en validatie van fluorouracil (5-Fu) in veegmonsters met *ion trap* GC-MS-MS afgerond worden.

Referenties

- 1 HJM van Kan, MG Pelders en KA Simons. Beheersing van contaminatie met cytostatica in de ziekenhuisapotheek. *Ziekenhuisfarmacie*. 1994;10:89-91.
- 2 MG Pelders, HJM van Kan and KA Simons. Validation of Pharmacy safetycabinets using GC/MS. How we reduced cytotoxic contamination. *HP Piek*. 1995;1:2-3.
- 3 P Sessink, HJM van Kan, R Anzion, MG Pelders, R Bos en KA Simons. Contaminatie Oncolytica I Contaminatie Oncolytica II. *Ziekenhuisfarmacie*. 1995;11:77-78.
- 4 JJW Ros, KA Simons, JM Verzijl, GA de Bijl en MG Pelders. Praktische toepassingen van een gevalideerde analysemethode voor het aantonen van sporen cyclofosfamide op injectieflacons en in oncologische dagverpleging. *Ziekenhuisfarmacie*. 1997;13:168-171.
- 5 JJW Ros, KA Simons, GA de Bijl en MG Pelders. Evaluatie van een schoonmaakprocedure voor

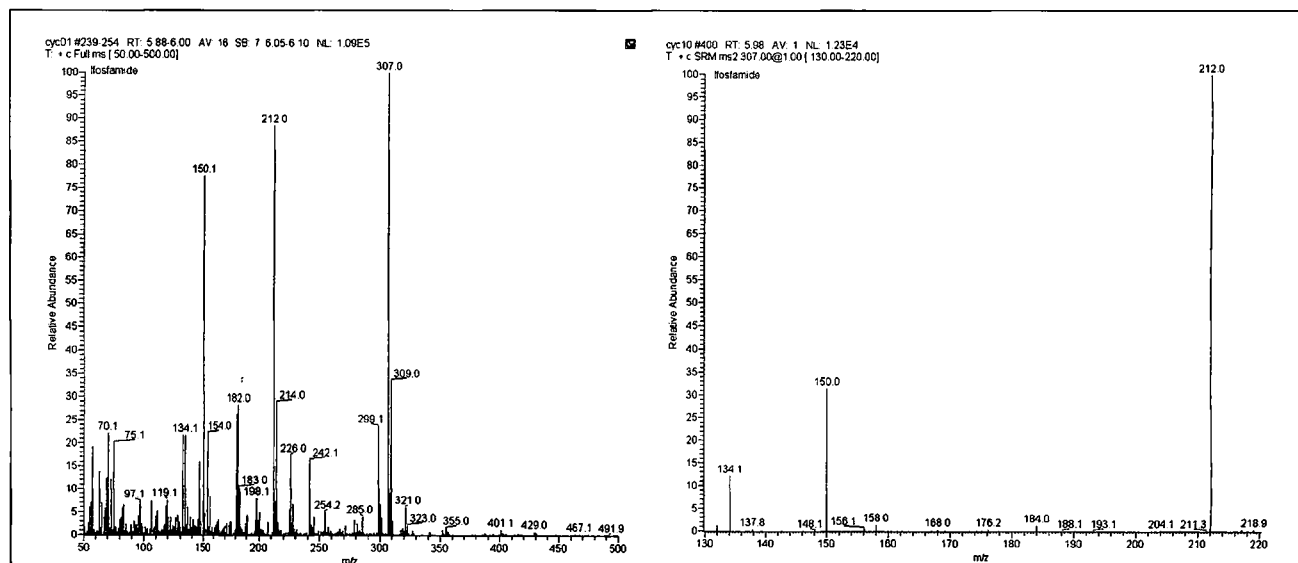


Figuur 2. GC/MS/MS chromatogram spoor van het dochterion van m/z 307 van hetzelfde veegmonster als figuur 1. Berekende concentratie: 0,5 ng/mL. Dit monster bevat dus wel cyclofosfamide, maar de concentratie is een stuk lager. De stoorpiek verdwijnt na toepassing van MS-MS. Het gehele chromatogram is veel schoner.

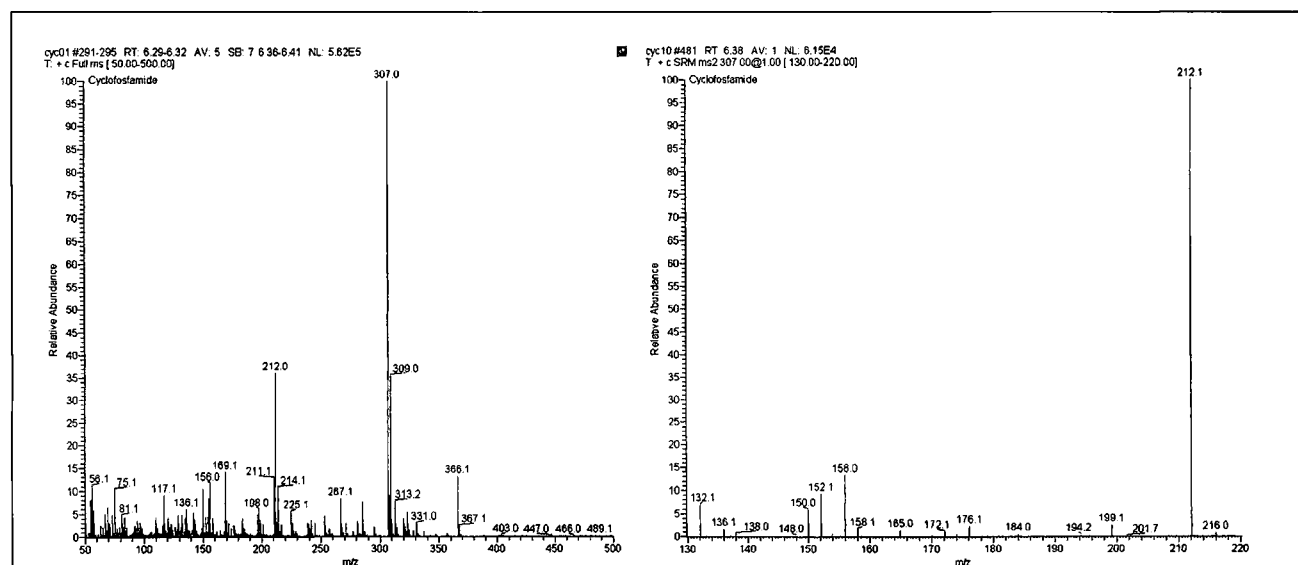
de bereiding van cytostatica in een ziekenhuisapotheek. Ziekenhuisfarmacie. 1997;13(1):10-13.

6 FDA. Guidance for Industry; Analytical procedures and methods validation; chemistry,

manufacturing and controls documentation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>



Figuur 3. Ifosfamide massaspectrum (m/z 309 en 307) en dochter massaspectrum (m/z 212 uit 307).



Figuur 4. Cyclofosfamide massaspectrum (m/z 309 en 307) en dochter massaspectrum (m/z 212 uit 307).