



## GCMS op een apotheeklaboratorium

### Erik Olyslager

Apotheek Gelre ziekenhuizen  
Klin. Farm. & Tox. Laboratorium  
Postbus 9014  
7300 DS Apeldoorn  
e.olyslager@gelre.nl  
www.docfrog.nl

### 1. Inleiding

De laatste jaren is de LCMS met triple quadropole heel gebruikelijk in veel apotheek laboratoria. De massaspectrofotometer is echter al een jaar of 25 geleden voorzichtig binnengedrongen in het laboratorium van de apotheek. Deze massaspectrometers waren toen nog gekoppeld aan een gaschromatograaf (GCMS). De koppeling van een MS (die onder vacuüm werkt) aan GC is namelijk veel eenvoudiger dan die aan een vloeistofchromatograaf (HPLC). Bij de eerste zijn eluens en componenten al in gasvorm en deze komen met een laag debiet (b.v. 1 ml per minuut) het vacuüm binnen waardoor de detector gemakkelijk op vacuüm gehouden kan worden. Bij LCMS moet veel vloeistof verdampt worden en de componenten in ion vorm worden gebracht in een ionenbron. Deze ontwikkeling heeft een tijdje geduurd. Pas toen de prijzen van de triple quadropoles binnen het budget van de wat grotere apotheek laboratoria kwamen is het snel gegaan met de LCMSMS. Sindsdien lijkt de GCMS wel haast vergeten. Helaas is het succes van de GCMS in de apotheek laboratoria nooit zo groot geweest als nu de LCMS. Toch kan een GCMS een toegevoegde waarde hebben naast de LCMS.

### 2. GCMS versus LCMS

Niet alle componenten kunnen gemakkelijk met een GCMS bepaald worden. Sommige stoffen zijn thermisch niet stabiel of niet vluchtig genoeg en vaak is een derivatiseringsstap nodig. Kortom de GCMS is minder breed inzetbaar dan de LCMS. Ook lijkt het alsof GC in het algemeen wat moeilijker wordt gevonden dan HPLC. Toch heeft de GCMS met single quadropole enkele voordelen t.o.v. LCMSMS. LCMSMS wordt in het algemeen in de Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode gebruikt. Hierbij wordt meestal het molecuul ion geselecteerd en deze wordt vervolgens gefragmenteerd. Eén of enkele fragmenten worden dan gemeten. Dit is gevoelig en zeer selectief, zo selectief

dat alle componenten, waarvan de parameters niet in de methode staan, worden gemist.

Er kan ook een compleet dochter spectrum worden opgenomen, maar dit dochterspectrum is nogal afhankelijk van andere parameters zoals de collision energie. Ook in dit geval moet er in de eerste quadropole een moeder ion worden geselecteerd met als gevolg dat de rest wordt gemist. De triple quadropole LCMS kan ook als single quadropole worden gebruikt welke je alle ionen kunt laten meten. In dat geval wordt er een compleet massaspectrum opgenomen worden. Aangezien de ionisatie van de LCMS veel zachter is dan die bij de GCMS, zie je dan meestal een massaspectrum met alleen het molecuul ion met wat isotopen. Om toch nog wat fragmenten te produceren wordt dan de spanning in de bron (cone voltage) hoger gekozen waardoor er fragmentatie in de bron optreedt. Dit geeft dan een massaspectrum met daarin meerdere pieken. Dit proces is nogal apparaat afhankelijk waardoor de bibliotheken ook weer apparaat afhankelijk zijn. Deze manier van onbekenden screening kan wel werken als de mengsels schoon zijn en de matrix niet te ingewikkeld. In de praktijk van ons laboratorium met screenings in serum en urine blijkt deze methode toch niet goed te werken. Vaak krijg je zeker bij urine, door achtergrond en storende piekjes mengspectra, wat het zoeken in een bibliotheek welhaast onmogelijk maakt.

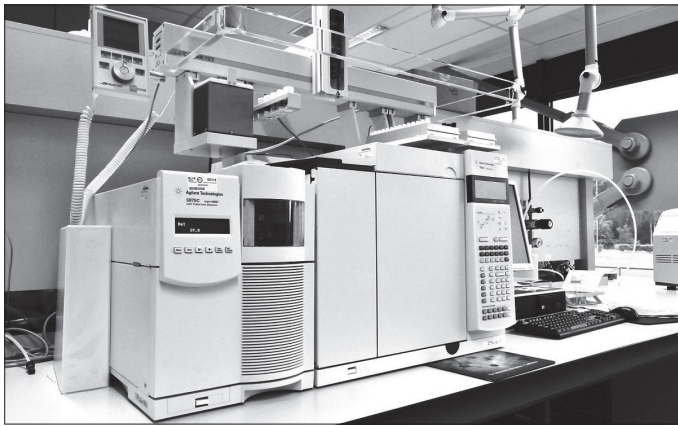
De GCMS met een enkele quadropole (of ion trap) heeft deze problemen veel minder. De Electron Ionization (EI) waarbij in het geval van GCMS meestal gebruikt van gemaakt wordt, zorgt voor apparaat onafhankelijke massaspectra. Deze spectra bevatten in het algemeen weinig molecuulmassa, maar wel meerdere fragmenten. Het zoeken in de bibliotheek wordt zo heel gemakkelijk. Deze bibliotheken zijn heel uitgebreid en commercieel verkrijgbaar. Doordat de MS is gekoppeld aan een GC zijn de pieken heel smal en het scheidend vermogen dus enorm. Er is daardoor minder snel last van storende pieken en daardoor vervuilde massaspectra.

Een GCMS is ook niet zo heel duur meer en heel snel te gebruiken want er zijn geen eluens of kolomwisselingen nodig. Kortom de GCMS is altijd klaar voor gebruik.

### 3. Vals positieve amfetamine uitslagen

Naast farmaceutische analyses, toxicologie, TDM en enkele klinisch chemische bepalingen zoals vitamines, worden op ons lab voor diverse instellingen drugs in urine bepaald.

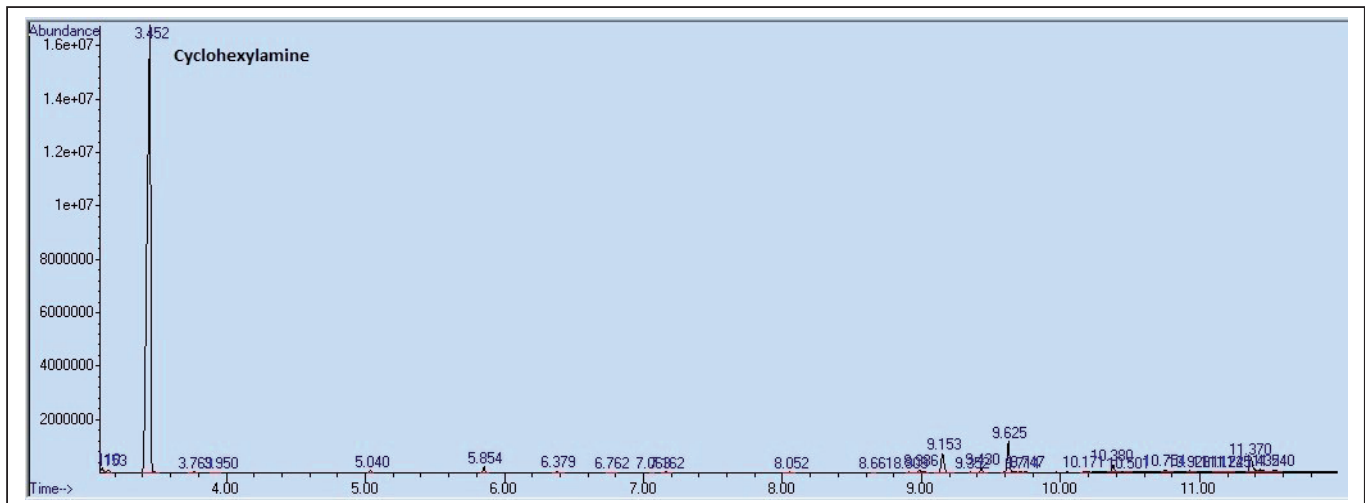




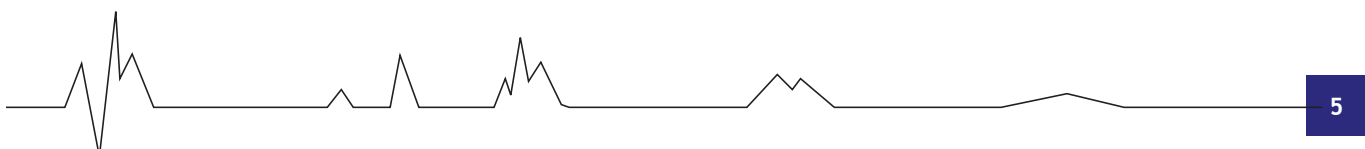
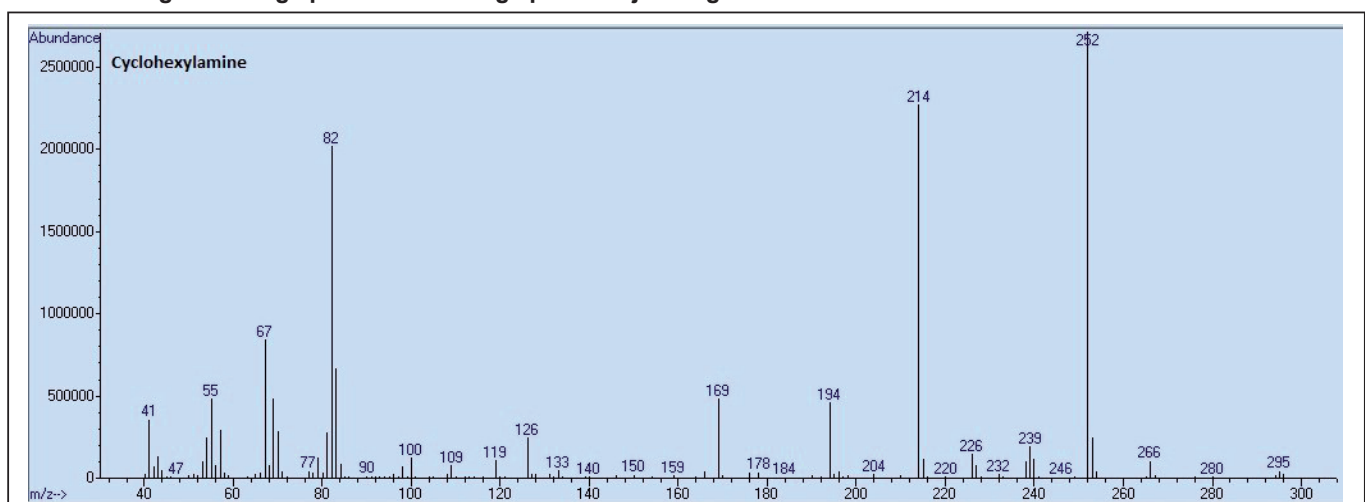
De laatste tijd kwam het met enige regelmaat voor dat de urine van sommige patiënten met immunoassayscreening voor amfetamine positief scoorden. De cliënten beweerden pertinent dat ze niet gebruikt hadden. Ook onze XTC test met immunoassay scoorde 100% negatief. Na bevestiging op LCMSMS werden telkens geen amfetamine-achtigen teruggevonden. Dit zat ons toch niet helemaal lekker. We wisten namelijk nog steeds niet waar deze positieve uitslagen van

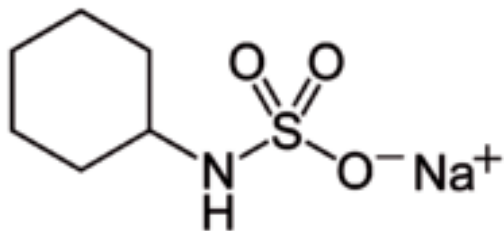
daan kwamen. Was het misschien een hoge tyramine concentratie wat deze uitslag veroorzaakte? Gezien de kruisreactiviteit van tyramine voor onze amfetamine immuno test, moest deze dan wel heel hoog zijn. Dit bleek na meten van tyramine met LCMSMS ook niet het geval.

Tijd om de GCMS in te zetten. Een aantal vals positieve urines hadden we inmiddels verzameld. Deze werden opgewerkt met een gecombineerde basische extractie-derivatiseringsmethode. De derivatisering wordt gedaan met HeptaFluorBoterzuurAnhydride (HFBA). Al deze monsters gaven een chromatogram met voorin een heel grote piek (zie figuur 1). Deze piek komt nog vroeger dan amfetamine in het GCMS chromatogram. Het massaspectrum is best specifiek en bij alle monsters hetzelfde maar kon niet door onze

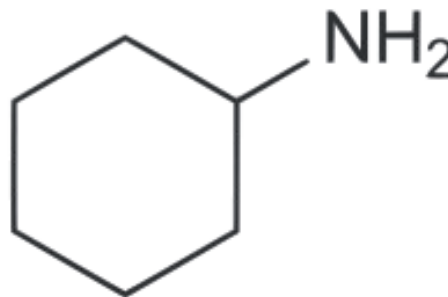


**Figuur 1 : GCMS chromatogram van een urine monster positief op amfetamine na derivatisering met HFBA. Door de zeer grote vroege piek vallen overige pieken bijna weg. ▼**





Figuur 2 : natriumcyclamaat



Figuur 3 : Cyclohexylamine

bibliotheken worden geïdentificeerd.

Dit chromatogram en massaspectrum kwam me overigens bekend voor. Hetzelfde had ik al eerder gezien in 2002 bij mijn toenmalige werkgever. Ook toen hetzelfde verhaal. Cliënt beweert pertinent niet gebruikt te hebben en bevestiging (met GCMS) gaf aan dat de cliënt gelijk had. Net als nu werd de grote piek voorin het chromatogram van de vals positieve uitslag verdacht. Door de plaats in het chromatogram verwacht je een klein molecuul met een vrije amine die gederiviseerd wordt door HFBA.

De component die de vals positieve amfetamine veroorzaakt bleek uiteindelijk cyclohexylamine te zijn. Dit is een metaboliet van cyclamaat (figuur 2)

Cyclamaat is het natrium- of calciumzout van cycloamzuur. Het is 30-50 keer zoeter dan sacharose en levert geen calorieën. Cyclamaat wordt toegevoegd aan light producten zoals sommige frisdranken en fruitdranken. Normaal wordt cyclamaat maar voor een klein deel opgenomen door het lichaam en onveranderd door de nieren uitgescheiden. Het grootste deel echter verlaat ons lichaam onveranderd via de ontlasting. Bij 7-11% van de mensen wordt echter een deel van de cyclamaat in de darmen door darmbacteriën omgezet in cyclohexylamine. Om al te veel bevestigingsonderzoeken te voorkomen hebben we aan de immunoassay kant een aanpassing gedaan door in geval van een positieve amfetamine nogmaals te analyseren met een andere amfetamine assay welke minder gevoelig is voor cyclohexylamine.

## 4. Conclusie

De besproken casus geeft duidelijk de meerwaarde aan van GCMS. Omdat alles wat uit de GC komt gezien wordt door de MS, worden er geen componenten gemist. Ook al stond cyclohexylamine.HFB niet in onze bibliotheek, de grote piek voorin het chromatogram heeft ons in actie gebracht wat uiteindelijk tot de oplossing heeft geleid. In eerste instantie hebben we alle positieve amfetamine urines verzameld en standaard bevestigd met LCMS. Dit leverde regelmatig uitslagen op waarin amfetamines niet werden aangetoond. Dit is voor een analist niet altijd bevredigend en de klant stelde soms terecht de vraag: "maar wat veroorzaakt dan de positieve uitslag dan wel?" Het liefst wil je altijd precies aangeven welke stof waar voor verantwoordelijk is. Dit lukt echter niet altijd. Een GCMS kan in zo'n geval een nuttige hulp zijn.

## Referenties

- 1) *A.Kankaanpää et al; Single-step procedure for gas chromatography-mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples; Journal of Chromatography B, 810 (2004) 57-68.*
- 2) <http://www.zoetstoffen.nl/zoetstof/cyclamaat-e952>

