

2019 • 2020

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Ontwikkelen van een *high throughput* methode voor de bepaling van basische drugs in speeksel met UPLC-MS/MS

PROMOTOR :

dr. ir. Kristel SNIEGOWSKI

PROMOTOR :

ing. Evi RUYSSINCKX

Michiel Struyfs

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



KU LEUVEN



KU LEUVEN

2019 • 2020

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Ontwikkelen van een *high throughput* methode voor de bepaling van basische drugs in speeksel met UPLC-MS/MS

PROMOTOR :

dr. ir. Kristel SNIÉGOWSKI

PROMOTOR :

ing. Evi RUYSSINCKX

Michiel Struyfs

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie



KU LEUVEN

Deze masterproef werd geschreven tijdens de COVID-19 crisis in 2020. Deze wereldwijde gezondheids crisis heeft mogelijk een impact gehad op de opdracht, de onderzoekshandelingen en de onderzoeksresultaten.

WOORD VOORAF

Om te beginnen wil ik graag stilstaan bij de mensen die mij hebben geholpen om deze thesis tot een goed einde te brengen. Dit was geen eenvoudige opdracht gezien de omstandigheden omtrent COVID-19. Desalniettemin ben ik toch blij met het bekomen resultaat.

Als eerste wil ik graag de instelling bedanken, het NICC te Brussel, om mij de kans te geven om bij hen stage te lopen. Ik heb deze stageplaats zelf gekozen onafhankelijk van de universiteit en ik ben hen dan ook zeer dankbaar dat zij hierop zijn ingegaan. Ik wil een paar mensen in het bijzonder bedanken. Ik ben mijn stagebegeleidster ing. en gerechtelijke deskundige in de toxicologie Evi Ruysinckx dankbaar voor de hulp met de thesis en de begeleiding tijdens de stage zelf. Daarnaast wil ik het team bedanken om mij te helpen in het labo. Een nieuwe labo-omgeving is altijd zoeken en ik kon altijd bij hen terecht met vragen. Verder wil ik ook nog dr. ir. Kristel Sniegowski bedanken voor het geven van advies en de constructieve kritiek voor verbetering tijdens het maken van deze thesis.

Tot slot wil ik nog graag mijn vriendin bedanken om mijn eindwerk na te lezen en de steun die ze me gaf tijdens deze periode.

INHOUDSOPGAVE

WOORD VOORAF	1
LIJST MET TABELLEN	5
LIJST MET FIGUREN	7
VERKLARENDE WOORDENLIJST	9
SAMENVATTING	11
ABSTRACT	13
1 INLEIDING	15
1.1 Situering	15
1.2 Probleemstelling en onderzoeksvraag	16
1.3 Doelstellingen	17
2 THEORETISCHE ACHTERGROND	19
2.1 Forensisch onderzoek	19
2.2 Kwaliteit binnen het forensisch onderzoek	19
2.3 Toxicologie	19
2.3.1 Dosis	20
2.3.2 Farmacokinetiek en farmacodynamiek	20
2.3.3 Toxicologische matrices.....	21
2.3.3.1 Speeksel.....	21
2.4 Basische drugs	22
2.4.1 Amfetamine	24
2.4.2 MDMA	25
2.4.3 Cocaïne	26
2.4.4 Benzoylecgonine	27
2.4.5 Heroïne	28
2.4.6 Morfine	29
2.4.7 6-Monoacetylmorfine	30
2.4.8 Methadon	30
2.5 Wetgeving	31
2.6 Analytische achtergrond	32
2.6.1 Gedeutereerde standaard	32
2.6.2 Vloeistof-vloeistof extractie.....	33
2.6.3 Solid phase extractie	34
2.6.4 Gaschromatografie	35
2.6.5 Vloeistofchromatografie	36
2.6.5.1 HPLC.....	37
2.6.5.2 UPLC.....	38
2.6.6 Massaspectrometrie.....	38
2.6.6.1 Tandem-MS	40
3 PRAKTISCHE AANPAK	43
3.1 Principe analyse van basische drugs	43
3.2 Materiaal	43
3.2.1 Werkoplossing basische drugs.....	43
3.2.2 Werkoplossing gedeuteerde standaard	44
3.2.3 SPE	45
3.2.4 UPLC	46
3.2.5 Tandem MS	46
3.3 Methode	47
3.3.1 Analyse basisch drugs.....	47

3.3.1.1	Bereiding calibratoren	47
3.3.1.2	Bereiding controlestalen	48
3.3.1.3	Voorbehandeling stalen en blanco	49
3.3.1.4	Extractie van de basische drugs.....	49
3.3.1.5	Analyse met UPLC-MS/MS.....	49
3.3.1.6	Berekening van de concentratie	50
3.3.2	Optimalisatie	51
3.3.2.1	Extractie-efficiëntie	52
3.3.3	Validatie	52
3.3.3.1	Selectiviteit.....	52
3.3.3.2	Lineariteit van de calibratiecurve	53
3.3.3.3	Accuraatheid	54
3.3.3.4	Analytische grenzen	55
3.3.3.5	Carry-over	56
3.3.3.6	Matrixeffect.....	56
3.3.3.7	Stabiliteit	57
3.3.3.8	ISR	57
3.3.3.9	Meetonzekerheid	57
4	RESULTATEN EN DISCUSSIE	59
4.1	Optimalisatie	59
4.1.1	Extractie-efficiëntie.....	59
4.1.1.1	Resultaten	59
4.1.1.2	Discussie	60
4.2	Validatie	61
4.2.1	Selectiviteit	61
4.2.1.1	Resultaat	61
4.2.1.2	Discussie	62
4.2.2	Lineariteit van de calibratiecurve	62
4.2.2.1	Resultaat	62
4.2.2.2	Discussie	64
4.2.3	Accuraatheid.....	64
4.2.3.1	Resultaat	64
4.2.3.2	Discussie	65
4.2.4	Analytische grenzen.....	65
4.2.4.1	Resultaat	65
4.2.4.2	Discussie	66
4.2.5	Carry-over.....	66
4.2.5.1	Resultaat	66
4.2.5.2	Discussie	67
4.2.6	Matrixeffect	67
4.2.6.1	Resultaten	67
4.2.6.2	Discussie	68
4.2.7	Stabiliteit	68
4.2.8	ISR.....	68
4.2.9	Meetonzekerheid	69
4.2.9.1	Resultaat	69
4.2.9.2	Discussie	69
5	BESLUIT	71
	LITERATUURLIJST	73
	BIJLAGEN	81

LIJST MET TABELLEN

Tabel 1: Risico op ongevallen in vergelijking met nuchtere chauffeurs	15
Tabel 2: PKa-waarden basische drugs	23
Tabel 3: Grenswaarden voor basische drugs in speeksel en bloed	32
Tabel 4: Waterstof VS Deuterium	33
Tabel 5: Stock concentratie basische drugs.....	44
Tabel 6: Stock concentratie van de gedeuteerde analogen	44
Tabel 7: Instellingen MS	47
Tabel 8: Bereiding verdunningen	47
Tabel 9: Bereiding calibratoren.....	48
Tabel 10: Aanmaak QC's	48
Tabel 11: Concentratie basische drugs interne QC's	48
Tabel 12: Voorbereiding stalen	49
Tabel 13: Elutie-gradiënt i.f.v. de tijd.....	50
Tabel 14: Retentietijden basische drugs	50
Tabel 15: Aanpassingen aan het protocol	51
Tabel 16: De concentratieniveaus die getest worden	52
Tabel 17: De geschatte LOQ	56
Tabel 18: Concentraties carry-over staal	56
Tabel 19: Selectiviteit op basis van %LOQ	61
Tabel 20: Selectiviteit op basis van CI.....	61
Tabel 21: Resultaten Grubbstest	62
Tabel 22: Resultaten %RE	63
Tabel 23: Gemiddelde R ² voor elke calibratiecurve	63
Tabel 24: Relatieve standaard deviatie van de coëfficiënten	64
Tabel 25: Accuraatheid QC_Low	64
Tabel 26: Accuraatheid QC_Med	65
Tabel 27: Accuraatheid QC_High	65
Tabel 28: Precisie en 'bias' voor de bepaling van LOQ	66
Tabel 29: Carry-over met behulp van %LOQ.....	66
Tabel 30: Carry-over met behulp van CI.....	67
Tabel 31: Eerste resultaten EE	82
Tabel 32: Resultaten EE na finale optimalisatie	82
Tabel 33: Resultaat calibratiecurven amfetamine.....	82
Tabel 34: Resultaat calibratiecurven MDMA.....	83
Tabel 35: Resultaat calibratiecurven benzoylecgonine	83
Tabel 36: Resultaat calibratiecurven cocaïne.....	84
Tabel 37: Resultaat calibratiecurven MAM.....	84
Tabel 38: Resultaat calibratiecurven morfine.....	84
Tabel 39: Resultaten ME.....	85
Tabel 40: Resultaten meetonzekerheid	85

LIJST MET FIGUREN

Figuur 1: INTERCEPT I2 speekselcollector.....	15
Figuur 2: Oasis® MCX 3cc (60mg) extractiekolom.....	16
Figuur 3: UPLC-MS/MS.....	16
Figuur 4: Oasis® MCX 96-well platen 30µm (30mg).....	17
Figuur 5: Bloedconcentratie i.f.v. de tijd.....	21
Figuur 6: INTERCEPT I2 speekselcollector.....	22
Figuur 7: Papaver somniferum met opium-hars.....	23
Figuur 8: Structuur amfetamine en metamfetamine.....	25
Figuur 9: MDMA pillen.....	26
Figuur 10: MDMA structuur.....	26
Figuur 11: Cocaplant (Erythroxylum Coca); Cocainepoeder.....	27
Figuur 12: Cocaine structuur.....	27
Figuur 13: Metabolisme van cocaine tot benzoylecgonine.....	28
Figuur 14: Structuur heroïne; Heroïne gebruik.....	29
Figuur 15: Metabolisme van heroïne en codeïne tot 6-acetylmorfine en morfine.....	29
Figuur 16: Structuur van Morfine.....	30
Figuur 17: Structuur 6-Monoacetylmorfine.....	30
Figuur 18: Structuur methadon.....	31
Figuur 19: Extractie-buisjes voor vloeistof-vloeistof extractie van drugs.....	34
Figuur 20: Oasis® MCX 96-well platen 30µm (30mg).....	35
Figuur 21: Schematische weergave GC.....	35
Figuur 22: Schematische weergave HPLC.....	37
Figuur 23: Acquity UPLC.....	38
Figuur 24: Afbuiging van fragmenten in het magnetisch veld.....	39
Figuur 25: Voorbeeld massaspectrum met EI van Amfetamine.....	39
Figuur 26: Schematische voorstelling quadrupool.....	40
Figuur 27: Schematische voorstelling ESI.....	41
Figuur 28: MS/MS.....	42
Figuur 29: Weergave ionisatie door ESI.....	42
Figuur 30: MCX-molecule met pKa en ion-uitwisselend vermogen.....	45
Figuur 31: Retentie van analiet i.f.v. de pH voor het MCX-sorptiemiddel.....	46
Figuur 32: Structuur van BEH C18.....	46
Figuur 33: Extractie-efficiëntie na initiële aanpassingen.....	59
Figuur 34: Extractie-efficiëntie na finale aanpassingen.....	60
Figuur 35: Matrixeffect op hoog en laag concentratieniveau.....	68
Figuur 36: Resultaat meetonzekerheid.....	69

VERKLARENDE WOORDENLIJST

Afkorting	Vertaling
%RE	Percentage relatieve fout
AC	Wisselstroom
ANOVA	Unifactoriële variantie-analyse
API	Atmosferische druk ionisatie
BEH C18	Bridged ethyleen hybride met octadecaan
CI	Confidentie interval
CID	Collision induced dissociation
D	Deuterium
DC	Gelijkstroom
DUID	Rijden onder de invloed van drugs
ECD	Electron capture detector
EDDP	2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine
EE	Extractie efficiëntie
EI	Elektron ionisatie
ELS	Evaporative light scattering
ES+	Positieve electrospray
ESI	Electrospray ionisatie
F	Response factor
FID	Vlam ionisatie detector
GC	Gaschromatografie
$G_{exp/tabel}$	Resultaat Grubbstest
HPLC	Hoge prestatie vloeistofchromatografie
HSGC	Headspace gaschromatografie
ICP	Inductief gekoppeld plasma
IS	Interne standaard
ISR	Incurred Sample analysis
KB	Koninklijk besluit
Kd	Distributieconstante
LC	Vloeistofchromatografie
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
m/z	De verhouding van lading op massa
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MAM	Monoacetylmorfine
mCPP	Meta-chloor-phenyl-piperazine
MCX	Mixed-mode, strong cation exchange
MDA	3,4-methyleendioxyamfetamine
MDMA	3,4-methyleendioxymethamfetamine
ME	Matrixeffect

MM	Molaire massa
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massaspectrometrie
MS/MS	Tandem MS, een opeenvolging van twee massaspectrometers
NICC	Nationaal instituut voor criminalistiek en criminologie
PDCA	Plan, Do, Check, Act
pH	Zuurtegraad
pKa	Logaritmische zuurconstante
Q	Quadrupool
QC	Kwaliteitscontrole stalen
R ²	Determinatiecoëfficiënt
RSD	Relatieve standaarddeviatie
RT	Retentietijd
S/N	Signaal/ruis-ratio
SPE	Solid fase extractie
stdev	Standaarddeviatie
TCD	Thermal conductivity detector
THC	Tetrahydrocannabinol
TQS	Trippel quadrupool massaspectrometer
UPLC	Ultra prestatie vloeistofchromatografie
UV	Ultraviolet
WCX	Weak cation exchange
WS	Werkoplossing
XTC	Ecstasy

SAMENVATTING

Rijden onder invloed verhoogt het risico op ongevallen. Door nieuwe wetgeving neemt het aantal te controleren speekselstalen toe, hierdoor volstaat de huidige analysemethode niet langer. Er wordt gezocht naar een nieuwe methode voor de analyse van basische drugs in speeksel. Deze drugs zijn amfetamine, MDMA, cocaïne, benzoylecgonine, morfine en 6-monoacetylmorfine. Dit project beoogt de huidige extractiekolommen, Oasis[®] MCX 3cc 30 µm (60 mg), te vervangen door de Oasis[®] MCX 96-well platen 30 µm (30 mg). De methode moet voldoen aan de basisvoorwaarden die opgelegd worden door de methodevalidatie.

De methode wordt geoptimaliseerd met behulp van de extractie-efficiëntie en daarna verder gevalideerd. De validatiekarakteristieken zijn: selectiviteit, lineariteit, accuraatheid, analytische grenzen, carry-over, matrixeffect en stabiliteit. Daarnaast wordt de meetonzekerheid en incurred sample analysis (ISR) bepaald. De extractie van de drugs gebeurt via SPE. De uiteindelijke analyse wordt uitgevoerd via UPLC-MS/MS.

Na de optimalisatie wordt er een extra droogstap en een verlaging van het elutievolume ingevoerd. Voor de methodevalidatie voldoen enkel de accuraatheid en matrixeffect volledig aan de acceptatiecriteria, de andere karakteristieken voldoen niet of gedeeltelijk. De stabiliteit en ISR zijn niet bepaald en moeten later worden uitgevoerd. Voordat de nieuwe kolommen gebruikt worden bij de analyse van basische drugs, moet er verder gevalideerd worden. Eventueel zijn er nieuwe aanpassingen op de analysemethode nodig.

ABSTRACT

Driving under the influence increases the risk of accidents. Because of new legislation the number of saliva samples increases, which results in the current analysis method no longer being sufficient. A new method for the analysis of basic drugs in saliva is being sought. These drugs include amphetamine, MDMA, cocaine, benzoylecgonine, morphine, and 6-monoacetylmorphine. This project aims to replace the current extraction columns, Oasis[®] MCX 3cc 30 μ m (60 mg), with the Oasis[®] MCX 96-well plates 30 μ m (30 mg). The method must meet the criteria imposed by the method validation.

The method is optimized using the extraction efficiency and then further validated. The validation characteristics are: selectivity, linearity, accuracy, analytical limits, carry-over, matrix effect and stability. In addition, the uncertainty of measurement is determined and the incurred sample analysis (ISR) is performed. The drugs are extracted via SPE. The eventual analysis is performed using UPLC-MS/MS.

After the optimization, an extra drying step and a reduction of the elution volume are introduced. For the method validation, only the accuracy and matrix effect fully meet the acceptance criteria, the other characteristics do not meet these criteria or only partially. The stability and ISR have not been determined and need to be performed in the future. Before the new columns are used in the analysis of basic drugs, further validation is required. New adjustments to the analysis method may be necessary.

1 INLEIDING

1.1 Situering

Dit onderzoek wordt uitgevoerd in het Nationaal Instituut voor Criminalistiek en Criminologie (NICC) te Brussel, een onderzoeksinstituut die zich bezighoudt met forensisch onderzoek. Hieronder valt zowel criminalistiek als criminologie. Criminalistiek is wetenschappelijk onderzoek om aanwijzingen objectief te analyseren en zo daders van misdrijven op te sporen. Het NICC specialiseert zich in: brandonderzoek, DNA-onderzoek, drugs en toxicologie, onderzoek van menselijke en dierlijke haren, vezels en textiel, wapens, munitie en kruitresten, verfsporen, glas en veiligheidsinkten. Criminologie doet meer onderzoek naar de aard van criminaliteit en de preventie ervan [1].

Rijden onder de invloed van drugs (DUID) vormt een wereldwijd probleem. De verhoging van het risico in vergelijking met nuchtere chauffeurs wordt weergegeven in tabel 1. Uit deze tabel is af te leiden dat het risico op ongevallen varieert naargelang de substantie en of meerdere stoffen simultaan gebruikt worden. De verkeersveiligheid kan verbeterd worden door wetten toe te passen die gericht zijn op het opsporen van gebruikers in het verkeer [2],[3]. Dankzij een nieuwe wetgeving van 1 april 2019 mag de politie na afname van een positieve speekseltest (immunoassay) ook speekselstalen afnemen in daartoe voorziene speekselcollectoren met name Intercept I2 speekselcollectors (zie figuur 1). De nieuwe wetgeving is ter vervanging van het koninklijk besluit (KB) van 4 juni 1999 en werd gepubliceerd op 30 november 2015. De wet van 31 juli 2009 en het KB van 27 november 2015 regelen de invoer van de speekselanalyses. De speekselcollectoren worden, onder andere, naar het toxicologielabo gestuurd van het NICC. Speeksel is een goede matrix om recent druggebruik aan te tonen in het verkeer. Daarnaast kan een speekselstaal worden afgenomen door de politie in tegenstelling tot een bloedafname waar de aanwezigheid van een arts nodig is. Dit maakt ook dat de tijd tussen de positieve speekseltest en staalafname voor de bevestigende analyse korter is en een beter beeld kan verkregen worden van de concentratie op het moment van de feiten. Door de gebruiksvriendelijkheid van deze collectorsystemen stijgt het aantal stalen [4], [5].



Figuur 1: INTERCEPT I2 speekselcollector [6]

Tabel 1: Risico op ongevallen in vergelijking met nuchtere chauffeurs [3]

Basische drug	Risico op ongevallen	Risiconiveau
Cocaïne	2-10x	Gemiddeld verhoogd
Heroïne	2-10x	Gemiddeld verhoogd
Amfetamines/MDMA	5-30x	Sterk verhoogd
Combinatie van drugs	5-30x	Sterk verhoogd
Combinatie met Alcohol	20-200x	Extreem verhoogd

Wanneer de speekselstalen binnenkomen op de afdeling drugs en toxicologie, voegt de politie steeds een verslag van het klinisch onderzoek toe waarbij het resultaat van de kwalitatieve immunoassay vermeld staat. Enkel deze parameters mogen in het labo opgespoord worden ter bevestiging van dit preliminaire resultaat. In het toxicologielabo zijn hiervoor twee analytische methoden ontwikkeld, een eerste voor de bepaling van THC in speeksel en een tweede methode die alle basische (alkalische) drugs, die in de DUID-wetgeving zijn opgenomen, omvat. Vrijwel alle drugs zijn basisch, enkel THC en bepaalde medicatie niet. De drugs waarop getest wordt zijn: amfetamine, MDMA, cocaïne en heroïne. amfetamine en MDMA worden als dusdanig opgespoord. Cocaïne wordt vastgesteld door de aanwezigheid van cocaïne zelf en de aanwezigheid van zijn metaboliet benzoyllecgonine. Heroïne (diacetylmorfine) wordt in het menselijk lichaam onmiddellijk afgebroken en zal bepaald worden door de aanwezigheid van de metabolieten morfine en 6-acetylmorfine.

Stalen kunnen vaak meer dan één analiet bevatten bijvoorbeeld bij het meervoudig gebruik van verschillende drugssoorten. Voor de staalvoorbereiding wordt er gebruik gemaakt van SPE. In de standaardmethode zijn dit de Oasis[®] MCX 3cc (60mg) extractiekolommen (figuur 2). Bij de huidige methode kunnen slechts 30 stalen per keer geanalyseerd worden in combinatie met een ijklijn, blanco en QC's (48 in totaal). Na extractie worden de stalen geanalyseerd met behulp van UPLC-MS/MS (figuur 3).



Figuur 2: Oasis[®] MCX 3cc (60mg) extractiekolom [7] Figuur 3: UPLC-MS/MS [8]

1.2 Probleemstelling en onderzoeksvraag

De huidige analysemethode dient te worden aangepast aan de noden van vandaag. Door de nieuwe wetgeving neemt het aantal stalen die dagelijks geanalyseerd worden toe. In 2019 zag het labo toxicologie een verdubbeling van het aantal stalen ten opzichte van 2015 en bijna een verdrievoudiging ten opzichte van 2013. Dit leidt tot een verhoogde werkdruk bij de werknemers. De huidige analysemethode volstaat niet meer om de grote hoeveelheid stalen te verwerken en moet worden aangepast om de wettelijke doorlooptijd van 2 weken te kunnen blijven garanderen. Daarnaast kunnen de lange werklijsten leiden tot stress op de werkvloer.

Verder zou een nieuwe methode tot een economisch voordeel kunnen leiden omdat de volumes van de reagentia tijdens de staalvoorbereiding eventueel verminderd kunnen worden. Zo kan er worden uitgetest of de conditioningsstap noodzakelijk is voor een goede extractie-efficiëntie. Het volume stabiliserende buffer waarin het speekselstaal wordt verdund kan eveneens verlaagd worden. Daarnaast wordt er ook gekeken of de was- en conditioningsstappen van meerdere stalen tegelijk uitgevoerd kunnen worden door het gebruik van een multichannel pipetten. In de huidige methode is dit niet mogelijk. Tenslotte moet de aangepaste analysemethode gevalideerd worden. Methodevalidatie is

een basisvoorwaarde om kwaliteit en een objectieve vergelijking van analyses te garanderen.

De vraag die hier gesteld kan worden is "Hoe kan de huidige methode worden aangepast om een snellere en economisch interessantere methode te verkrijgen? Welke aanpassingen worden uiteindelijk doorgevoerd en waarom? Op welke manier voldoet deze methode aan de basisvoorwaarden volgens de methodevalidatie?"

1.3 Doelstellingen

Het hoofddoel van dit project is om, tegen het einde van de stageperiode (29 mei 2020), de methode aan te passen zodat het aantal stalen die verwerkt kunnen worden minstens verdubbeld kan worden, van 48 stalen (inclusief calibratoren, blanco en QC's) naar 96 stalen. Momenteel is het de bedoeling dat de huidige extractiekolommen, Oasis[®] MCX 3cc 30 μ m (60 mg), vervangen kunnen worden door de Oasis[®] MCX 96-well platen 30 μ m (30 mg) (figuur 4).

Het verschil tussen deze twee kolommen zit in de hoeveelheid vaste fase en het volume dat er kan worden toegevoegd. De diameter van de deeltjes en het materiaal van de vaste fase zijn voor beide extractiekolommen hetzelfde, namelijk 30 μ m Oasis[®] MCX-deeltjes. Het voordeel van de Oasis[®] MCX 96-well platen 30 μ m (30 mg) is dat er sneller gewerkt kan worden en meer stalen tegelijk kunnen worden meegenomen onder andere door het gebruik van een multichannel pipet.

Daarnaast moet, na optimalisatie, de methode gevalideerd worden om na te gaan of deze voldoet aan de basisvoorwaarden die opgelegd worden. De volgende validatiekarakteristieken worden hierbij vastgelegd: selectiviteit, lineariteit van de kalibratiecurve, accuraatheid, analytische grenzen (LOQ en LOD), carry-over, extractie-efficiëntie, matrixeffect en stabiliteit. Daarnaast zal ook de meetonzekerheid bepaald worden en de 'incurred sample analysis' (ISR) worden uitgevoerd. Afhankelijk welke validatiekarakteristiek er bepaald wordt, zal er gewerkt worden met blanco's, standaardoplossingen, QC-stalen, controlestalen, enz. De validatie en criteria voor goedkeuring van de methode worden besproken bij 'praktische aanpak'.

In deze thesis zal er eerst dieper worden ingegaan op de forensische toxicologie en basische drugs. Dan worden een aantal analysetechnieken uitgeklaard die gebruikt kunnen worden voor de analyse van basische drugs in speeksel. De praktische aanpak van het project, waaronder de validatie, zal als volgende worden toegelicht. Hierna worden de resultaten weergegeven en tenslotte wordt er een besluit gevormd.



Figuur 4: Oasis[®] MCX 96-well platen 30 μ m (30mg) [9]

2 THEORETISCHE ACHTERGROND

2.1 Forensisch onderzoek

Binnen het vakgebied van forensisch onderzoek wordt één doel vooropgesteld, namelijk het zoeken en identificeren van sporen. Het woord 'forensisch' is afgeleid van het Latijn 'forensis', wat 'van het forum' betekent. Forum slaat dan weer op het zogenaamde bestuurlijk centrum zoals in het Romeinse rijk het 'forum Romanum' het politieke, juridisch, religieus en commercieel centrum was. Forensisch onderzoek kan worden opgesplitst in twee hoofdtakken: criminologie en criminalistiek. Criminologie doet onderzoek naar de aard van criminaliteit en de preventie ervan. Daarnaast draait criminalistiek eerder om het vergaren en analyseren van bewijzen. Criminalistiek omvat verschillende disciplines van de wetenschap zoals geneeskunde, genetica, ballistiek, toxicologie, enz. Deze hebben als doel verscheidene juridische vragen te beantwoorden. Aangezien deze stage plaatsvindt in het toxicologielabo zal dit verder worden uitgewerkt [10], [11].

2.2 Kwaliteit binnen het forensisch onderzoek

Binnen forensisch onderzoek is het belangrijk dat er voldaan wordt aan bepaalde kwaliteitsnormen. Forensische analyse kan herleid worden naar een proces waarbij iets 'IN' komt, verschillende stappen zal doorlopen en vervolgens wordt overgedragen, als product/dienst, aan de klant, het zogenaamde 'UIT'. Hierbij representeert de 'IN' de ontvangst van bewijsmateriaal, ofwel het overtuigingsstuk, en de vordering. De 'OUT' staat voor het moment waarop het rapport het labo verlaat. De gebruikte tussenstappen kunnen worden opgedeeld, rekening houdend met de cirkel van Deming (PDCA: Plan-Do-Check-Act) [10].

De eerste stap die volgt na de 'IN' is het evalueren van de aanvraag. Hier wordt er beslist welke methode er nodig is voor de vraag. Bij deze stap gaat het om het plannen (Plan) in de cirkel van Deming. Deze stap wordt gevolgd door de uitvoering van de gevalideerde methode. Om zeker te zijn van de gekozen methoden wordt deze dus gevalideerd. Validatie bestaat uit een reeks experimenten waarbij er wordt nagegaan of de methode steeds gelijkaardige resultaten levert ondanks wijzigende omstandigheden. Onder wijzigende omstandigheden wordt bijvoorbeeld een andere uitvoerder, verschillende toestellen, andere leverancier, ... verstaan. Na validatie kan de methode ook effectief worden uitgevoerd: Do. Als derde stap is er een controle nodig van de uitgevoerde analyse. Dit om na te gaan of alles wel goed verlopen is. Hier gaat het dus om de Check-stap van PDCA. De laatste stap in de Deming cirkel is 'Act'. In deze stap worden corrigerende maatregelen ingevoerd indien er afwijkingen worden opgemerkt. Als laatste is er nog het rapporteren van de resultaten. Forensisch onderzoek is onderhevig aan bijkomende processen. Hieronder vallen de sturende processen zoals: voldoen aan de wetgeving, richtlijnen binnen de organisatie, afspraken met de klant, interne audits, management review. Anderzijds zijn er ook nog de ondersteunende processen zoals: beheer van competenties, beheer van toestellen etc., beheer van documenten en risicoanalyses. Deze zullen op elke afdelingen van het NICC worden toegepast waaronder ook op de afdeling toxicologie [10].

2.3 Toxicologie

De definitie van toxicologie luidt als volgt, "Toxicologie is de wetenschap die de nadelige effecten bestudeert van chemische en biologische stoffen op levende organismen". Bij forensische toxicologie wordt er op zoek gegaan naar lichaamsvreemde stoffen en de effecten hiervan. Deze lichaamsvreemde stoffen worden ook niet-endogene stoffen

genoemd. In forensische context gebeurt dit ofwel 'ante mortem' ofwel 'post mortem'. Bij 'ante mortem' wordt er gezocht waarom een levende persoon zich anders of vreemd gaat gedragen. In dit geval gaat het meestal over het gebruik van drugs, alcohol of geneesmiddelen. Uiteraard is het moment van staalname een momentopname, daarom wordt er bij 'ante mortem' onderzoek gesproken van de 'concentratie op het moment van staalname'. 'Post mortem' is het onderzoek waarbij er gezocht wordt naar de doodsoorzaak van een persoon. Met behulp van toxicologisch onderzoek wordt er nagegaan of drugs, alcohol of geneesmiddelen aan de basis liggen van het overlijden. De focus bij dit project ligt op de gedragstoxicologie of ante-mortem toxicologie [10], [12].

2.3.1 Dosis

Iedere stof kan toxisch zijn. Dit hangt volledig af van de ingenomen dosis. De stoffen die aanzien worden als toxisch zijn in dit geval de stoffen die een relatief lage dosis nodig hebben om een toxisch effect te veroorzaken. Er zal gesproken worden van een therapeutische, toxische of lethale dosis [10].

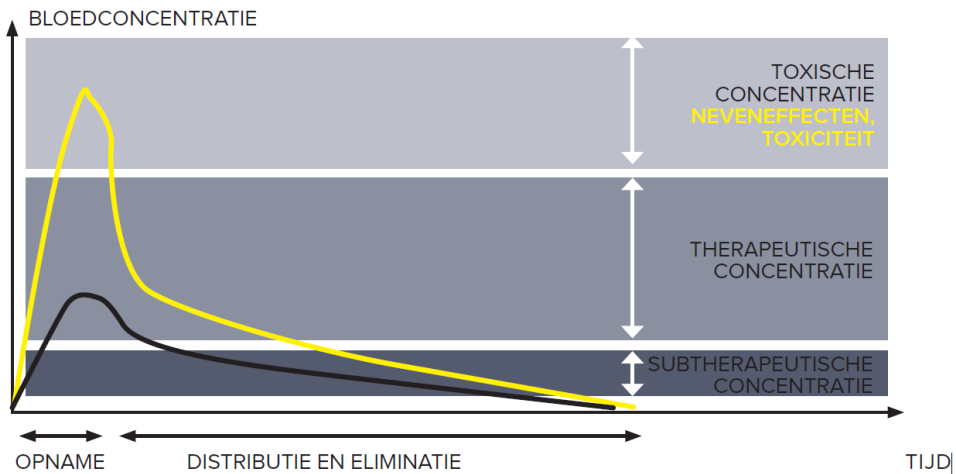
De therapeutische dosis is de dosis die nodig is voor het gewenste effect. In het geval van drugs is de therapeutische dosis, de dosis waarbij de 'roes' optreedt. De toxische dosis is dan weer de dosis waarbij er voornamelijk nevenwerkingen optreden [10]. Deze gaan van misselijkheid, hoofdpijn en diarree, tot jeuk en huiduitslag. In ernstige gevallen kunnen deze bijwerkingen leiden tot een ziekenhuisopname [13]. De lethale dosis is de dosis die bij de meeste mensen potentieel tot de dood kan leiden. Belangrijk om op te merken is dat dezelfde dosis niet altijd hetzelfde effect heeft op iedereen [10].

2.3.2 Farmacokinetiek en farmacodynamiek

Na inname van een stof zal de concentratie, onafhankelijk van de toedieningsvorm, in het bloed pieken. Als de stof in het bloed terecht is gekomen, zal het verdeeld worden over de weefsels. Dit maakt dat bloed een belangrijke toxicologische matrix is. Als het doelwitweefsel bereikt is, zal de drug zijn effect gaan uitoefenen door te binden en activeren van specifieke proteïnen, nucleïnezuren of andere molecule (bijvoorbeeld Insulinereceptoren, b2-adrenoreceptoren) [10]. Interactie met deze stoffen, maar vooral polymorfisme in genen die coderen voor het 'doelwit', zullen bepalend zijn voor de gevoeligheid voor bepaalde drugs. Deze polymorfisme kunnen zorgen voor grote farmacodynamische verschillen ten opzichte van andere gebruikers [14].

Hierna zal de stof zich verder over het lichaam verdelen en worden afgebroken in de lever. Dit gebeurt door het cytochroom P450 enzym. Dit is de eerste fase van het metabolisme voor toxische stoffen. Het P450 enzym zal de toxische stoffen gaan converteren naar elektrofile intermediairen die in de tweede fase worden omgezet naar hydrofiele derivaten die kunnen worden uitgescheiden via urine. Dit proces is afhankelijk van de toedieningsvorm en heeft invloed op de concentratie die uiteindelijk het doelwitweefsel bereikt [14]. De bloedconcentraties in functie van de tijd worden weergegeven in figuur 5.

Daarnaast kan er gewenning optreden bij herhaaldelijk druggebruik. Drugs kunnen zorgen voor een prikkeling van het genotscentrum waardoor er dopamine wordt vrijgezet. Indien dit genotscentrum continu geprikkeld wordt door eenzelfde stof, zal er meer van deze stof moeten ingenomen worden voor eenzelfde effect. Ook zullen andere 'gewone' stimuli niet meer datzelfde gevoel met zich meebrengen. Hierdoor worden mensen afhankelijk van een stof en wordt er gesproken van verslaving [10]. De ernst van afhankelijkheid/verslaving, is mede afhankelijk van de aard van het molecule en de toedieningswijze. Zo zullen heroïne en morfine bijvoorbeeld de productie van endorfines inhiberen waardoor er geen natuurlijke pijnstilling mogelijk is. Bij onthouding zal in dit geval ernstige pijn optreden die bestreden zal worden met een nieuwe dosis van deze drug [15].



Figuur 5: Bloedconcentratie i.f.v. de tijd [12]

2.3.3 Toxicologische matrices

Druggebruik kan worden aangetoond door de analyse van diverse biologische matrices, ook wel toxicologische matrices genoemd. Welke toxicologische matrix er gekozen wordt voor onderzoek hangt af van de gewenste informatie en moment van afname van het staal. De componenten die teruggevonden worden na analyse, wijzen op het gebruik van bepaalde drugs. Dit wordt in het toxicologielabo steeds bepaald met chromatografische technieken die gekoppeld worden aan massaspectroscopie. Elke matrix heeft zijn eigen voor- en nadelen. De meest voorkomende toxicologische matrices zijn: bloed, urine, haar en speeksel. Enkel bloed geeft een betrouwbare inschatting van het effect van de stof op de gebruiker op moment van staalname. Naar aanleiding van de nieuwe wetgeving omtrent rijden onder invloed van drugs, zal in dit project met speeksel als toxicologische matrix gewerkt worden [10], [16].

2.3.3.1 Speeksel

Speeksel is praktischer dan urinestalen en bovendien wordt er in dit geval gescreend op recenter gebruik. In het geval van urinestalen zou er eerder gescreend worden op afbraakproducten. Daarom heeft urine een langer detectievenster en is er soms geen sprake meer van recent druggebruik wat kan leiden tot vals positieve resultaten tijdens de preliminaire test. Bij chronische gebruikers kan THC-COOH, het belangrijkste afbraakproduct van cannabis, zelfs tot een maand na het laatste gebruik in een urinestaal gedetecteerd worden. Bovendien dient er voor de staalafname van het urinestaal steeds een toilet aanwezig te zijn, en is er het gevaar voor vervalsing/verdunding van het staal tijdens het toiletbezoek. Vandaar dat er wordt overgegaan naar speekselstalen. [10].

Voor de staalname worden speekselcollectoren gebruikt. Anders dan bij bloedstalen is er in dit geval geen arts nodig. Dit maakt dat speeksel een interessante matrix is voor de detectie van druggebruik in het verkeer. In 2009 werd daarom de drugswet van 1999 aangepast. Drugs hebben voornamelijk een effect op de hersenen. Hier kan natuurlijk geen staal van worden genomen dus moet er gezocht worden naar een alternatief. Bloed is in dit geval de meest aangewezen matrix. Eén van de doelen van de wetgever was echter het aantal controles op te drijven. Omwille van zijn gebruiksgemak en het relatief kort detectievenster (ongeveer 24u), werd ervoor gekozen om speeksel te gebruiken als toxicologische matrix. Deze is in ieder geval veelbelovend voor de strijd tegen drugs in het verkeer [10].

De nieuwe staalname gebeurt met speciale speekselcollectoren, intercept I2 (zie figuur 6). De speekselcollector bestaat uit twee delen, het collectorgedeelte en het bewaringsgedeelte. Het collectorgedeelte bestaat uit een absorberend deel dat onder de tong wordt geplaatst. Deze zal verkleuren indien verzadigd met speeksel. De speekselcollectie mag in alle gevallen stopgezet worden na vijf minuten, zelfs al is er geen verkleuring waar te nemen. Na speekselcollectie wordt het absorberend deel zelf in een stabiliserende oplossing geplaatst. In dit geval is de stabiliserende oplossing 'intercept'-buffer. Dit is het bewaringsgedeelte van de collector. In het labo zullen de speekselcollectoren worden gewogen. Deze info wordt mee gebruikt in de verwerking van de resultaten [12]. In het uiteindelijke rapport wordt immers de berekende concentratie per milliliter puur speeksel gerapporteerd, berekend aan de hand van de formule zoals vermeld in Art 12.1 van het KB van 27/11/2015. Er moet bij de analyses echter wel rekening worden gehouden met de meetonzekerheid. Het finale resultaat is het resultaat bekomen door rekening te houden met de meetonzekerheid die wettelijk vastgelegd is op 30% [17], [18].



Figuur 6: INTERCEPT I2 speekselcollector [19]

2.4 Basische drugs

Drugs zijn substanties die mentale processen, zowel cognitieve als emotionele, kunnen beïnvloeden. Deze kunnen legaal of illegaal zijn naargelang de wetgeving [10]. Drugs kunnen worden opgedeeld op basis van de verschillende effecten. De drie effecten zijn: stimulerend, verdovend en bewustzijnsverruimend. Bij stimulerende middelen (uppers) verhoogt de hartslag en ademhaling. De spieren zullen zich bij dit soort drugs opspannen en de gebruiker krijgt het gevoel alerter te zijn en meer energie te hebben. Voorbeelden van stimulerende middelen zijn cocaïne en amfetamines. Bij verdovende middelen zal de ademhaling en hartslag vertragen en de spieren zullen ontspannen. Dit zorgt voor een roes bij de gebruikers. Onder de verdovende middelen vallen de opiaten zoals heroïne. Bewustzijnsverruimende drugs zijn drugs die ervoor zorgen dat de gebruiker de wereld anders gaat beleven of waarnemen. Een welgekend voorbeeld van dergelijke drug is cannabis. Sommige drugs, zoals MDMA, combineren twee van deze effecten. In het geval van MDMA kan er gesproken worden van zowel een stimulerend als een bewustzijnsverruimend effect [20], [21].

Vrijwel alle drugs en psychotrope middelen hebben basische eigenschappen met uitzondering van THC en bepaalde medicatie. De PKa-waarden van de in dit werk besproken drugs en metabolieten, worden weergegeven in tabel 2. Onder basische drugs vallen dus ook de opiaten en opioïde drugs. Dit zijn narcotische analgetica of downers die eveneens zorgen voor een goed gevoel. Deze kunnen van natuurlijke of semisynthetische aard zijn. Opiaten zijn producten die afkomstig zijn van opium. Dit is de bron van alle narcotische analgetica. Opium wordt als hars gewonnen uit de 'papaver somniferum', ook wel de slaapbol genoemd (zie figuur 7). De plant wordt vandaag de dag voornamelijk teruggevonden in Pakistan en Afghanistan. Het opium-hars zelf bevat meerdere opiaten zoals morfine, codeïne en thebaïne [10], [22]. Morfine en cocaïne vallen daarnaast ook onder de alkaloiden. Dit zijn plantaardige stoffen die één of meerdere basische

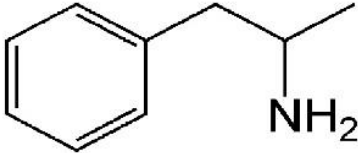
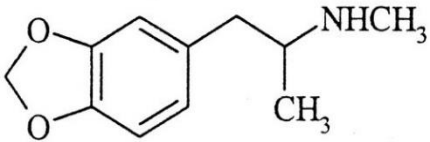
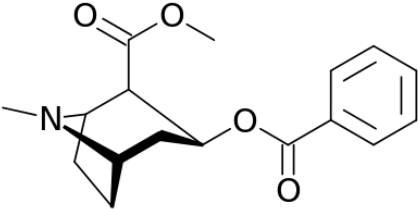
stikstofatomen bevatten in een heterocyclische ring. Dit stikstofatoom is in staat om een proton op te nemen en zorgt dus voor het basische reageren van de stoffen [23].

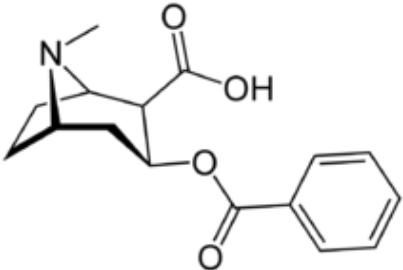
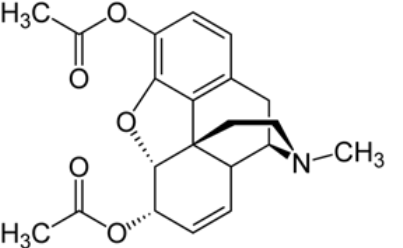
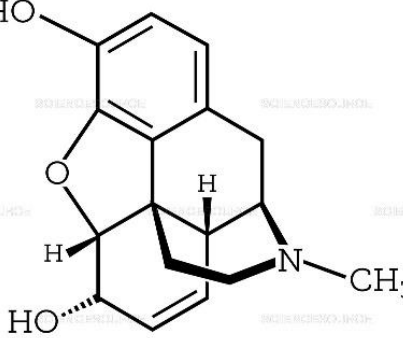
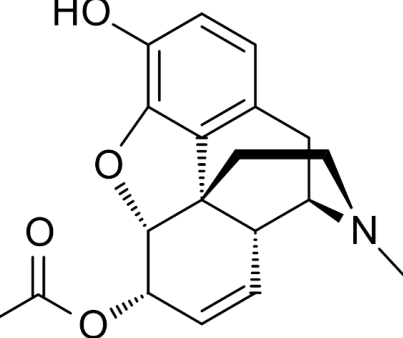
Naast de opiaten zijn er ook nog de opioïden. Dit zijn verbindingen die een vergelijkbare werking vertonen als morfine, maar niet uit opium worden gewonnen. Bij langdurig gebruik van opiaten treedt er tolerantie op die aanleiding geeft tot verslaving omdat de gebruiker het effect steeds opnieuw wil ervaren [22]. De basische drugs die behandeld worden in dit project zijn: amfetamines, MDMA, cocaïne en heroïne. Deze zullen verder nog in detail worden besproken samen met enkele belangrijke metabolieten.



Figuur 7: *Papaver somniferum* met opium-hars [24]

Tabel 2: Pka-waarden basische drugs [25],[26]

Basische drugs	Structuur	Groep	Pka
Amfetamine		Primaire amine	10,01
MDMA		Secundaire amine	10,14
Cocaïne		Tertiaire amine	8,85

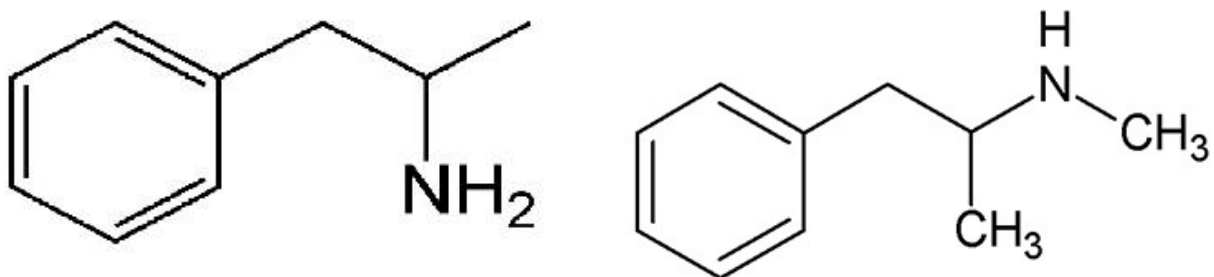
Benzoyllecgonine		Tertiaire amine	9,54
		carboxylfunctie	3,15
Heroïne		Tertiaire amine	9,10
Morfine		Tertiaire amine	9,12
Monoacetylmorfine		Tertiaire amine	9,08

2.4.1 Amfetamine

Amfetamines zijn psychoanaleptica of stimulantia. Het is een verzamelnaam voor verschillende synthetische drugs met als gemeenschappelijk kenmerk een langdurige en stimulerende werking op het centraal zenuwstelsel [27]. Deze kunnen ook therapeutisch gebruikt worden door de anorectische (tegen obesitas) en vasoconstrictieve eigenschappen (neussprays). De zoutvorm van amfetamine, amfetamine-sulfaat, is poedervormig en wordt veelal verwerkt als pasta of tabletten. Onder deze vorm wordt het nog steeds verkocht bij apotheken. De illegale variant die geproduceerd wordt, is de basevorm. Dit is een olie die eerst tot een pasta moet worden omgezet door toevoeging van methanol en zwavelzuur. De amfetamine kan dan versneden worden met cafeïne. In dit geval wordt er gesproken van 'speed'. Tijdens de analyse zal amfetamine langzaam vervluchtigen bij kamertemperatuur, vandaar dat er redelijk snel moet gewerkt worden [10].

De meest voorkomende gebruiksmethoden zijn het snuiven van het poeder en inslikken als pil of 'bommetje'. Een bommetje is wanneer het product wordt ingewikkeld in een vloeitje. Deze wordt dan doorgeslikt met water. Uitzonderlijk kan het ook worden ingespoten [27], [28].

Amfetamine mag niet verward worden met metamfetamine. De structuur van metamfetamine bevat een extra methylgroep aan de amino-functie ter vorming van een secundair amine. Beide stoffen zullen inwerken op dezelfde receptoren. De affiniteit van metamfetamine voor deze receptoren is echter tien keer sterker dan deze van amfetamine. Dit maakt dat metamfetamine een veel sterker effect en een langere werkingstijd hebben dan amfetamine. In figuur 8 kunnen de structuurformules van amfetamine en metamfetamine worden teruggevonden [29], [30].



Figuur 8: Structuur amfetamine (links) en metamfetamine (rechts) [31], [32]

2.4.2 MDMA

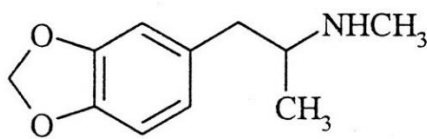
MDMA (3,4-methylenedioxyamfetamine), ook wel ecstasy (XTC) genoemd, is een stimulerend en bewustzijnsverruimend middel. De structuurformule is weergegeven in figuur 10. Deze drug is nauw verwant aan amfetamine maar is daarnaast ook verwant met de stof 'mescaline' een stof die teruggevonden kan worden in de peyotecactus. Het heeft een typisch entactogeen effect (een gevoel van verbondenheid) omdat het de intimiteit met anderen en het geluksgevoel versterkt. Vandaar dat deze ook wel eens de bijnaam 'knuffeldrug' krijgt. In hogere dosissen veroorzaken deze ook hallucinaties, depressie en irrationeel gedrag [10], [33].

Stimulantia zoals MDMA zullen daarnaast hongergevoel, dorst en vermoeidheid onderdrukken terwijl deze ook de lichaamstemperatuur, hartritme en bloeddruk gaan verhogen. Dit geeft dat het gebruik van deze drug een verhoogd risico heeft op dehydratie. Omdat deze vaak gebruikt worden als partydrug is het overlijden na gebruik van MDMA vaak te wijten aan hyperthermie [10].

MDMA is een synthetische drug en komt doorgaans voor als olie. Deze zal eerst moeten worden uitgekristalliseerd door toevoeging van aceton en zoutzuur. Na het drogen van deze kristallen worden ze verwerkt tot tabletten. Het is echter zo dat gelijkaardige tabletten kunnen verschillen in het gehalte MDMA. Hierdoor wordt de kristalvorm van MDMA populairder wegens hoge zuiverheid. Het gebruik van deze kristallen staat beter bekend als 'Molly' [10]. De tabletten of 'XTC-pillen' bestaan in een variatie van vormen en kleuren. Deze bevatten vaak een specifieke afdruk (Zie figuur 9). Zulke 'pil' wordt vaak vernoemd naar de vorm of kleur van het tablet of naar het logo van de gemaakte afdruk [33].



Figuur 9:MDMA pillen [34]



Figuur 10:MDMA structuur [34]

2.4.3 Cocaïne

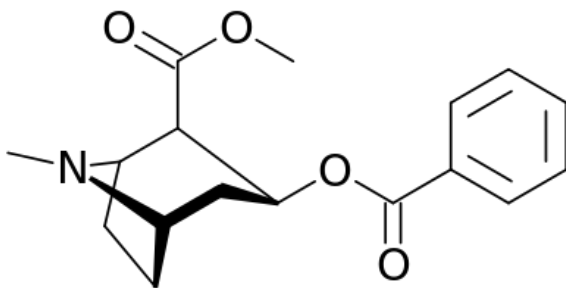
Cocaïne is een psychoanalepticum of stimulerend middel dat het centrale zenuwstelsel stimuleert. De structuurformule is weergegeven in figuur 12. Daarnaast kent het ook therapeutische toepassingen als lokaal anestheticum. Het is afkomstig van de cocaplant (*Erythroxylum Coca*), een plant die te vinden is in het Andesgebergte in Zuid-Amerika (zie figuur 11). Initieel werd er op de bladeren van deze plant gekauwd. Hierdoor kwam de cocaïne geleidelijk, via het maag-darmstelsel, in het bloed terecht. De effecten bij kauwen op de bladeren zijn dan ook minder heftig ten opzichte van de hedendaagse inname van cocaïne [10],[22].

Het cocaïne-zout, ofwel cocaïne-hydrochloride, is een wit poeder (zie figuur 11). Dit wordt gesnoven en kan makkelijk worden omgezet naar cocaïne-base. Anders dan de poedervorm van het cocaïne-zout, bestaat de basische vorm eerder uit brokjes. De basische vorm wordt gerookt. In dit geval wordt er ook gesproken van crack omdat het roken hiervan een krakend geluid maakt. In uitzonderlijke gevallen kan cocaïne samen in combinatie met heroïne geïnjecteerd worden als de zogenaamde 'snowball' [10].

Cocaïnegebruik zorgt ervoor dat het aantal dopaminereceptoren in de hersenen zullen verminderen. Hierdoor zullen stimuli als eten, drinken of seks niet meer volstaan om de gebruiker een goed gevoel te geven. De gebruiker zal teruggrijpen naar de drug. Dit werkt verslaving in de hand. Cocaïne zal in het lichaam hydrolyseren tot benzoylecgonine. Benzoylecgonine is de belangrijkste metaboliet van cocaïne die teruggevonden kan worden in het lichaam [10].



Figuur 11: Cocaplant (*Erythroxylum Coca*) (Links) [35]; Cocainepoeder (Rechts) [36]

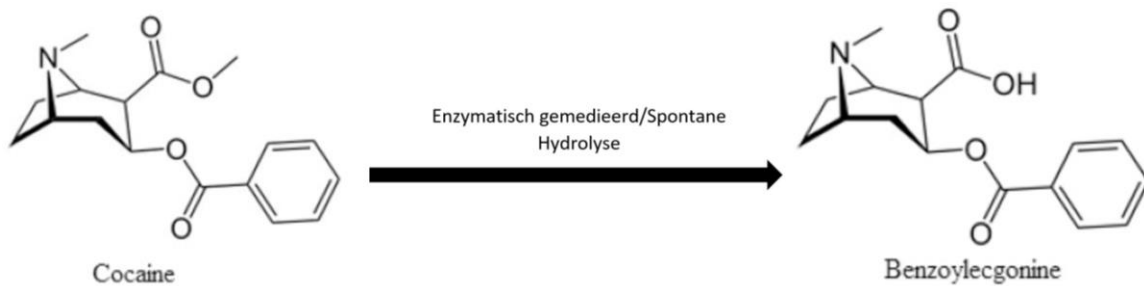


Figuur 12: Cocaine structuur [37]

2.4.4 Benzoylecgonine

Zoals eerder aangehaald is benzoylecgonine een metaboliet van cocaine. Deze ontstaat door hydrolyse van één de esterfuncties van cocaine, namelijk de methylester-groep (zie ook figuur 13). Deze vormt na hydrolyse een carboxyl-functie. De hydrolyse kan zowel enzymatisch als niet-enzymatisch verlopen en zal plaatsvinden ter hoogte van de lever. Vorming van de carboxylfunctie maakt dat benzoylecgonine meer polair is dan cocaine en dus beter wateroplosbaar. Dit zorgt er ook voor dat benzoylecgonine moeilijker te extraheren is uit biologische matrixen [38].

Indien de carboxyl-functie aanwezig blijft als anion worden de ion-uitwisselende eigenschappen verstoord en wordt benzoylecgonine niet weerhouden. Algemeen zullen zwitterionen slecht weerhouden worden op een ion-uitwisselingskolom. Benzoylecgonine komt voor als zwitterion bij pH 6. Indien het voorkomt als een eenvoudig kation, kan het wel weerhouden worden op de kolom, vandaar dat er gewerkt wordt met een acetaat buffer van pH 4. Daarnaast zijn er nog andere metabolieten afkomstig van cocaine, maar enkel benzoylecgonine zal opgespoord worden in dit werk [39].

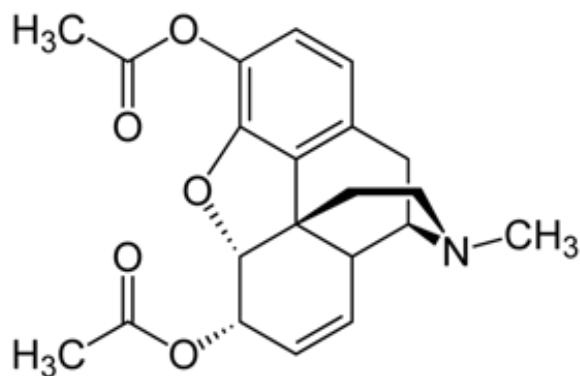


Figuur 13: Metabolisme van cocaïne tot benzoylecgonine [38], [39]

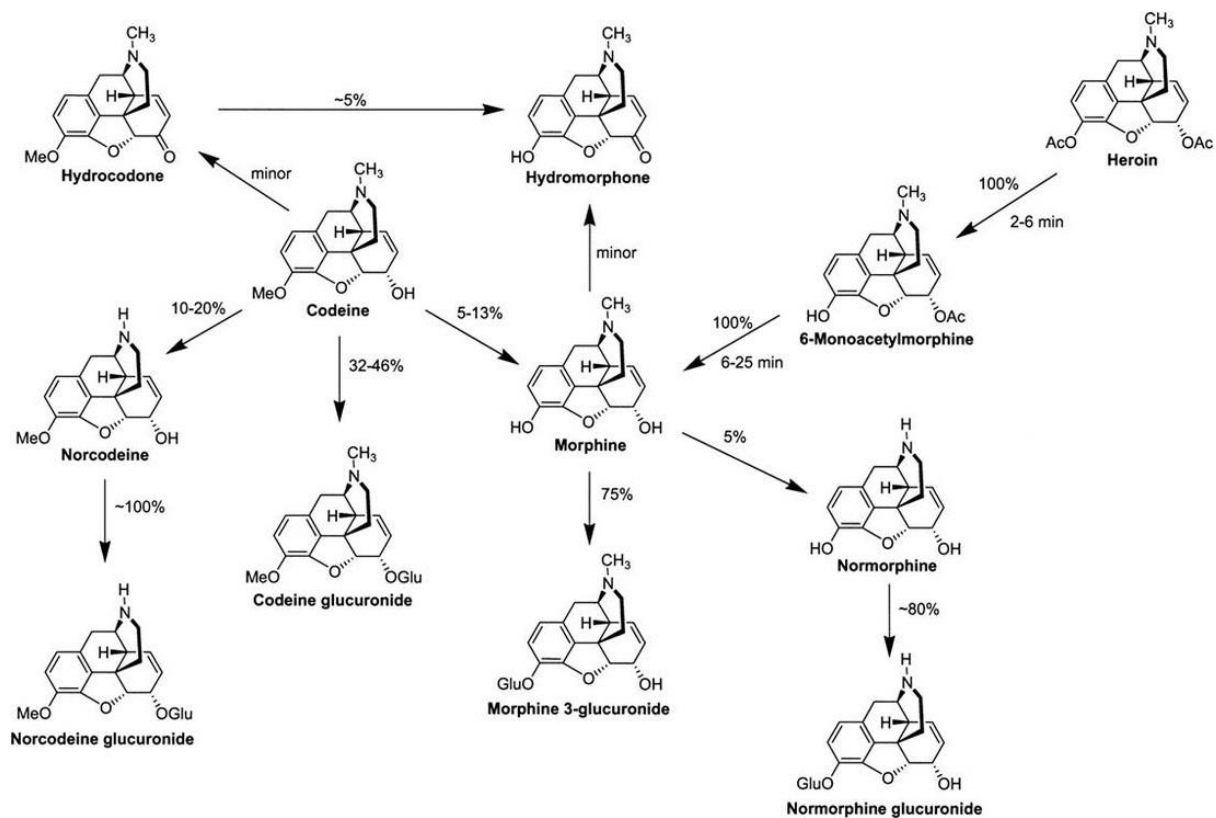
2.4.5 Heroïne

Heroïne, ook wel diacetylmorfine genoemd, is een narcotisch analgeticum dat gesynthetiseerd wordt vanuit morfine (zie figuur 14). Dit maakt van Heroïne een semisynthetische drug. Deze wordt gesynthetiseerd uitgaande van morfine. De morfine die hiervoor gebruikt wordt, wordt gewonnen uit opium afkomstig van 'papaver somniferum'. Morfine kan worden omgezet naar heroïne met behulp van azijnzuuranhydride. Dit geeft een azijnachtige geur aan het eindproduct. Heroïne is meer vet-oplosbaar dan morfine. Dit zorgt ervoor dat het sneller door de bloedhersenbarrière gaat en dus sneller een effect geeft. Heroïne gaat binden op receptoren in de hersenen die normaal endorfines binden. Daarnaast zal de toediening ervoor zorgen dat de productie van deze endorfines wordt geremd. Omdat endorfines natuurlijke pijnstillers zijn die het lichaam aanmaakt, zal stoppen met het gebruik van heroïne moeilijk zijn, alleen al door de fysieke pijn. Om deze pijn te stillen wordt er teruggegrepen naar dezelfde stof. De fysieke ontwenningssverschijnselen van heroïne zijn vrij hevig en worden 'cold turkey' genoemd. Heroïne wordt voornamelijk intraveneus toegediend via injectie. Het is ook mogelijk om heroïnedampen te inhaleren na verhitting, het zogenaamde 'chinezin'. Heroïnegebruik zal worden aangetoond door de aanwezigheid van de metabolieten 6-acetylmorfine en morfine [10].

Het metabolisme van opiaten, zoals heroïne, is zeer complex. Deze zal een reeks oxidaties/reducties, methylaties/demethylaties en acylaties/deacylaties ondergaan. De voornaamste katalysator voor deze processen is het cytochroom P450 enzym, die terug te vinden is in de lever. Vooraleer deze opiaten kunnen geëxcreteerd worden, zullen deze enzymatisch worden gegluconeerd. In figuur 15 is de metabole pathway weergegeven van enkele opiaten, namelijk codeïne en heroïne. Deze figuur geeft echter wel een onvolledig beeld van de afbraak van deze opiaten wegens een beperkt begrip van de pathways [40].



Figuur 14: Structuur heroïne (links) [41]; Heroïne gebruik (rechts)[42]

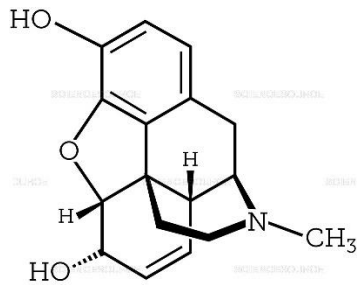


Figuur 15: Metabolisme van heroïne en codeïne tot 6-acetylmorfine en morfine [40]

2.4.6 Morfine

Morfine, genoemd naar Morpheus (god van de slaap) is een narcotisch analgeticum die gewonnen wordt uit 'papaver somniferum'. Het is dan ook een bestanddeel van opium [10]. Morfine wordt gebruikt tijdens en na operatieve ingrepen. Daarnaast wordt het ook gebruikt voor de bestrijding van ernstige pijn bij terminale patiënten. Ook hier zal er tolerantie optreden met kans op verslaving. Structuurformule wordt weergegeven in figuur 16 [22].

Om heroïnegebruik aan te tonen wordt er gezocht naar verschillende metabolieten, morfine is hier één van. Morfine is echter eveneens een metaboliet die voorkomt na inname van codeïne. Daarom wordt er om zeker te zijn dat het om heroïnegebruik gaat, op zoek gegaan naar een ander metaboliet, namelijk 6-acetylmorfine [43].

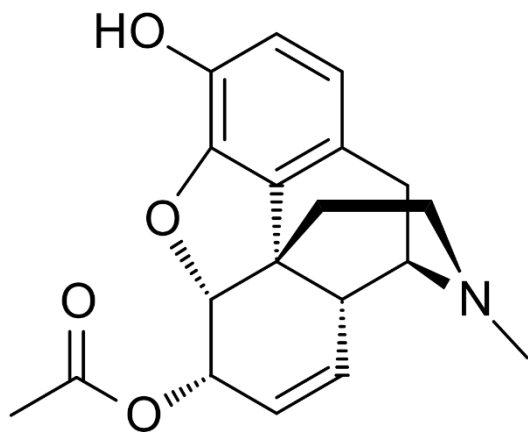


Figuur 16: Structuur van Morfine [44]

2.4.7 6-Monoacetylmorfine

Wanneer er gezocht wordt naar mogelijk heroïnegebruik, wordt er voornamelijk gezocht naar de aanwezigheid van 6-acetylmorfine, ook wel 6-monoacetylmorfine (MAM) genoemd (zie figuur 17). Dit is de enige metaboliet die een onweerlegbaar bewijs vormt van heroïnegebruik [43].

Heroïne zal eerst worden omgezet naar MAM alvorens het verder hydrolyseert tot morfine. Omzetting tot MAM gebeurt redelijk snel met een halfwaardetijd van ongeveer negen minuten. Door deze korte halfwaardetijd is het detectievenster voor heroïne beperkt. Dit verklaart mede waarom de detectie van MAM de enige sluitende manier is om heroïnegebruik aan te tonen. Er wordt aangenomen dat het effect van heroïne op de opioïdereceptoren voornamelijk te wijten is aan de gevormde metabolieten zoals MAM. Omdat MAM, net zoals heroïne, beter vet-oplosbaar is dan morfine, zullen deze stoffen de bloedhersensbarrière makkelijker doordringen [45].

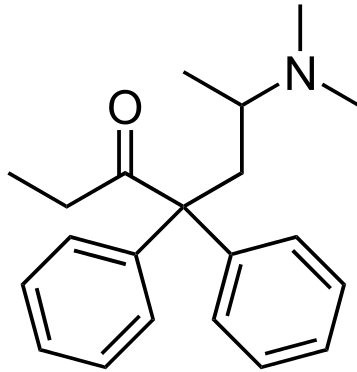


Figuur 17: Structuur 6-Monoacetylmorfine [46]

2.4.8 Methadon

Methadon wordt vaak gebruikt om heroïneverslaving te behandelen door de afkickpijnen te verlichten. Dit leidt niet noodzakelijk tot het afkicken van heroïne. Aangezien methadon dezelfde fysieke afhankelijkheid veroorzaakt als heroïne, is het nadeel dat indien gebruikt

als afkickmethode, de initiële verslaving aan heroïne, vaak ingeruild wordt voor een methadon verslaving. Methadon zou zelfs sterker verslavend zijn. De structuurformule wordt weergegeven in figuur 18 [10]. Een alternatieve ontwenningmethode is het gebruik van naltrexon. Dit wordt zowel toegepast voor heroïne- als voor alcoholverslaving. In het geval van heroïne zal naltrexon na toediening, de opiaatreceptoren in de hersenen blokkeren. Hierdoor zal er geen roes meer optreden na heroïnegebruik [22].



Figuur 18: Structuur methadon [47]

2.5 Wetgeving

Naarmate de drugsproblematiek toenam, was er een internationale samenwerking nodig voor de bestrijding van drugs. Deze werd opgesteld in de 20^{ste} eeuw in twee VN-verdragen. In België dateert de drugswet van 21 februari 1921. Deze werd gekoppeld aan uitvoeringsbesluiten, KB van 31 december 1930 en KB van 22 januari 1998. Het nadeel aan deze wetgeving was dat deze nominatief was (beperkt tot de stoffen die met naam vermeld werden). De stoffen die niet op de lijst stonden waren in principe dus legaal. Het spreekt voor zich dat deze wetgeving nood had aan revisie. Met de wet van 7 februari 2014 kwam er een verbod op stoffen met gelijkaardige structuur. Met de komst van het KB van 6 september 2017 werden het KB van 31 december 1930 en 22 januari 1998 opgeheven. In dit nieuwe KB werd een classificatie opgesteld op basis van gemeenschappelijke chemische structuur en kwam er een wettelijk kader rond gamma-butyrolactone en 1,4-butanediol [10].

De wet van 31 juli 2009 voert speekseltesten in voor de controle van drugs in het verkeer. De politie overloopt een checklist, indien de chauffeur mogelijke tekenen van druggebruik vertoont, wordt ter plekke een immunologische test uitgevoerd met speeksel. Indien deze test de mogelijke aanwezigheid van stoffen aantoonde die de rijvaardigheid beïnvloeden, zoals amfetamine, MDMA, morfine, 6-acetylmorfine, benzoylcgonine en cocaïne, kan het gehalte verder worden bepaald via speeksel- of bloedanalyse. Of de chauffeur vervolgd wordt, hangt af of het gehalte van de drug die teruggevonden wordt in het speeksel- of bloedstaal, boven een bepaalde limiet-waarde ligt. Deze limietwaarde kan teruggevonden worden in tabel 3 [48]-[50].

Tabel 3: Grenswaarden voor basische drugs in speeksel en bloed [49]

Basische drugs	Limiet in speeksel (ng/mL)	Limiet in bloed (ng/mL)
Amfetamine	25,0	25,0
MDMA	25,0	25,0
Morfine	5,00	10,0
6-acetylmorfine	5,00	/
Cocaïne	10,0	25,0
Benzoylecgonine	10,0	25,0

Het KB van 27 november 2015 staat in voor de uitvoering van de wet van 16 maart 1968 betreffende de politie over het wegverkeer. Dit betreft de speeksel- en bloedanalyses bij het rijden onder de invloed van psychotrope drugs. Het speekselcollectorsysteem, intercept i2, werd via Ministerieel Besluit gegund in het kader van artikel 13 van dit KB gegund voor de staalname van speeksel in het verkeer [51]. De speekselstalen die worden verwerkt in dit project, zullen worden geanalyseerd met behulp van UPLC-MS/MS.

2.6 Analytische achtergrond

In dit deel zullen de belangrijkste methoden worden toegelicht. Staalvoorbereiding kan zowel via SPE als vloeistof-vloeistofextractie. In dit project wordt SPE gebruikt als de methode voor de staalvoorbereiding. Deze methode wordt gebruikt om de gewenste componenten namelijk de verschillende analieten, te scheiden van ongewenste componenten. Daarnaast wordt dit ook gebruikt om nadien de stalen aan te concentreren. Als de stalen klaar zijn, kunnen ze worden geanalyseerd.

Om aan de vereisten van de wet te voldoen, wordt de analyse verplicht uitgevoerd via chromatografische methode. Hierbij is de keuze tussen gaschromatografie (GC) of UPLC gekoppeld met massaspectrometrie. Semi-kwantitatieve methoden zoals immunoassays zijn niet toegelaten. Als analysemethode wordt er in dit project gebruik gemaakt van UPLC gekoppeld met tandem MS. Daarnaast zal er als interne standaard (IS) gebruik worden gemaakt van gedeuteerde analogen. Deze zullen eerst worden toegelicht.

2.6.1 Gedeuteerde standaard

Er zal gebruik worden gemaakt van gedeuteerde analogen als IS. Een interne standaard moet zich hetzelfde gedragen als het analiet tijdens de extractie maar moet ervan gescheiden kunnen worden tijdens de chromatografische analyse. Het doel van zo'n interne standaard is het corrigeren van fouten ten gevolge van adsorptie, verlies bij monstervoorbereiding, niet-reproduceerbaar injecteren, enz. Zolang de concentratie IS gekend is, kan het juiste gehalte aan analiet bepaald worden [52]. Deuterium (D) is een stabiel nuclide van waterstof en bevat naast een proton ook nog een neutron in de atoomkern. De naam 'deuterium' verwijst naar deze twee deeltjes in de kern. Het grootste verschil ten opzichte van een gewoon waterstofatoom is dat de atoommassa van deuterium twee keer zo groot is. Dit zorgt ervoor dat deuteriumverbindingen verschillen in fysische eigenschappen ten opzichte van de niet-gedeuteerde variant [53].

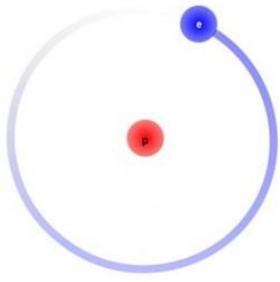
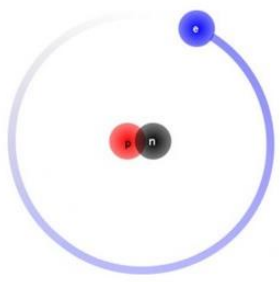
Om een IS te gebruiken moet eerst de responsfactor (F) bepaald worden. Dit is geen constante omdat de respons van elk analiet verschillend is. Zo zal de area van 10mM IS verschillen van de area 10mM amfetamine. Om F te bepalen wordt een gekend mengsel van IS en analiet bereid. Dit wordt gemeten en met behulp van de bekomen area's kan F bepaald worden, zie formule 1. Als deze gekend is, evenals de concentratie aan IS, kan de onbekende concentratie analiet bepaald worden met dezelfde formule [54].

$$\frac{Ax}{[X]} = F \cdot \frac{As}{[S]} \quad (1)$$

Met:

- Ax = Area van het analiet
- [X] = Concentratie van het analiet
- As = Area van de interne standaard
- [S] = Concentratie interne standaard

Tabel 4: Waterstof VS Deuterium [53], [55]

	Waterstof	Deuterium
Schets		
	Hydrogen	Deuterium
Symbool	H	D
Elektronen	1	1
Protonen	1	1
Neutronen	0	1
Atoom massa (u)	1,008	2,014

2.6.2 Vloeistof-vloeistof extractie

Een eerste manier om basische drugs te extraheren is vloeistof-vloeistof extractie. Bij deze extractiemethode worden er twee niet mengbare vloeistoffen samengevoegd waarbij het analiet is opgelost in één van deze twee. Bij de voorbereiding van speekselstalen is de eerste van deze vloeistoffen de speekselmatrix, die voornamelijk uit water bestaat. Hieraan wordt de tweede, niet-mengbare, vloeistof toegevoegd, eventueel een organisch solvent. Dan wordt er goed geschud zodat er voldoende contact is tussen de twee vloeistoffen en daarna wordt er gedurende een tijd gewacht tot de twee fasen terug van elkaar gescheiden zijn. Het analiet zal zich nu verdeeld hebben over deze twee fasen in een vaste verhouding afhankelijk van de relatieve oplosbaarheid. Deze verhouding wordt de distributiecöëfficiënt (Kd) genoemd. Hierbij zullen de polaire componenten zich over de waterige matrix verdelen en apolaire over het organisch solvent. De extractie-efficiëntie kan verhoogd worden door de fase waar het analiet zich uiteindelijk in bevindt te vervangen door verse fase en de extractie te herhalen [56].

Een voordeel van het gebruik van vloeistof-vloeistof extractie ten opzichte van SPE is dat het extract zuiverder is. Een nadeel van vloeistof-vloeistof extractie is dat het nadien vaak wordt aangeconcentreerd. Dit vormt een nadeel omdat hierbij het solvent, waarin de analiet-moleculen zich nu bevinden, verdampt wordt en dit zorgt ervoor dat vluchtige analieten deels mee zullen verdampen. Dit gebeurt meestal onder stikstofstroom [57]. Het is daarom nodig om het solvent zodanig te kiezen dat deze, naast niet-mengbaar te zijn

met de andere vloeistof, vluchtig genoeg is om eenvoudig te kunnen worden verdampt. Het kookpunt nagaan van het te gebruiken solvent is dan ook aanbevolen [56].

Conventionele vloeistof-vloeistof extractie wordt uitgevoerd met behulp van extractie buisjes die voorgevuld zijn met buffer en een organisch solvent. Voorbeelden van zulke buisjes zijn de Toxi-Tubes® A en B (Zie figuur 19). De A-buisjes worden gebruikt voor de extractie van basische tot neutrale drugs terwijl de B-buisjes worden gebruikt voor zure tot neutrale drugs [58]. Dat gezegd zijnde hoeft vloeistof-vloeistof extractie niet per se uitgevoerd worden via aangekochte buisjes. Zo kan er aan de biologische matrix rechtstreeks organisch solvent worden toegevoegd. Een voorbeeld hiervan is de extractie van amfetamines uit bloed met behulp van ethylacetaat. Hierbij is het belangrijk dat de pH wordt aangepast zodanig dat het analiet overgaat naar de organische fase.



Figuur 19: Extractie-buisjes voor vloeistof-vloeistof extractie van drugs [58]

2.6.3 Solid phase extractie

Solid phase extractie (SPE) is een veelgebruikte methode voor staalvoorbereiding met als doel storende en interfererende bestanddelen te verwijderen. In dit project zal er gebruik worden gemaakt van SPE. Het is gebaseerd op het verschil in affiniteit van een component voor een stationaire of mobiele fase. Het analiet zou een zo groot mogelijke affiniteit moeten hebben voor de stationaire fase. Interfererende bestanddelen zouden slechts een lage affiniteit voor de stationaire fase moeten hebben. Dit zodanig dat de interfererende bestanddelen kunnen worden weggespoeld [59].

De stationaire fase voor SPE bestaat vaak uit een silica basis met specifiek gebonden groepen. Deze groepen zullen bepalen om welke SPE het zal gaan. Zo is een SPE-kolom waarbij er koolwaterstof-ketens gebonden zijn, dus een stationaire fase minder polaire dan de mobiele fase, een reversed phase SPE. Silica's die korte alkylketens bevatten met polaire groepen en dus zorgen voor een polaire stationaire fase ten opzichte van de mobiele fase, worden gebruikt voor normal phase SPE. De groepen die bij deze gebonden zijn, zijn bijvoorbeeld -CN, -NH₂ of een diol-functie. Als de silica amino- of carboxylfuncties bevat, gaat het om ionuitwisselings-SPE. De amino-groepen worden gebruikt voor anionuitwisseling, de carboxylgroepen voor kationuitwisseling. Het analiet zal adsorberen aan de stationaire fase. Dit kan door verschillende mechanismen zoals: ion-ion interacties, waterstofbruggen, dipool-dipoolinteracties en Londonkrachten [60].

SPE verloopt typisch in vier stappen: het conditioneren, het laden van het staal, het wassen en elutie. Bij het conditioneren wordt de silica pakking van de SPE-kolom bevochtigd. Hierna wordt het staal geladen op de kolom. Het analiet zal in deze stap, samen met nog

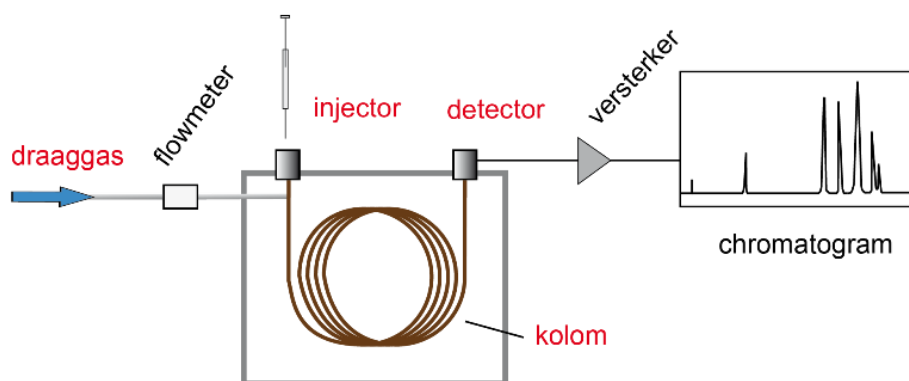
enkele onzuiverheden, weerhouden worden door de vaste fase. In de wasstap worden de onzuiverheden weggespoeld zodanig dat het analyt over blijft. Het analyt wordt van de kolom gehaald in de elutie stap. Deze wordt opgevangen in een geschikt recipiënt [59], [60]. Ondertussen zijn er nieuwe formaten van SPE-kolommen geïntroduceerd zoals de 96 well-SPE platen zoals bijvoorbeeld de Oasis® MCX 96-well platen 30µm (30mg) (zie figuur 20). In dit project zal er gebruik worden gemaakt van een dergelijke 96 well-SPE [61].



Figuur 20: Oasis® MCX 96-well platen 30µm (30mg) [61]

2.6.4 Gaschromatografie

Een eerste methode om basische drugs te analyseren is gaschromatografie. Deze kan worden gekoppeld aan een massaspectrometer. Gaschromatografie (GC) is net zoals elke chromatografische methode, gebaseerd op het verschil in affiniteit van de componenten met de stationaire en mobiele fase. De GC bestaat uit verschillende onderdelen, namelijk: draaggas, flowmeter, injector, kolom, kolom-oven en de detector. Deze worden schematisch weergegeven in onderstaande figuur (zie figuur 21) [62].



Figuur 21: Schematische weergave GC [62]

Het draaggas is een inert gas dat onoplosbaar is in de stationaire fase van de kolom. De meest gebruikte draaggassen zijn He, H₂ en N₂. Helium wordt het meeste toegepast, maar heeft het nadeel dat het relatief duur is. Waterstofgas kan ook gebruikt worden maar heeft dan weer het nadeel dat het zorgt voor explosiegevaar. Daarom wordt er nog vaak teruggesproken naar het goedkopere en veiligere stikstofgas. De flowmeter zorgt voor een continue toevoer van het draaggas [62], [63].

Er zijn twee mogelijkheden voor de injector, namelijk een standaardinjector en een splitinjector. De standaardinjector is een verdampingsinjector en werkt dus op verhoogde temperatuur. Hierdoor worden de te bepalen componenten vervluchtigd tot een gas alvorens ze naar de kolom worden gevoerd. Deze wordt toegepast voor gepakte kolommen. De splitinjector is eveneens een injector die op verhoogde temperatuur wordt gehouden en wordt toegepast bij capillaire kolommen. Hierbij wordt een deel van het vervluchtigde staal weggevoerd [62]. Het te onderzoeken monster wordt dus via één van deze injectorsystemen in het draaggas geïnjecteerd en verdampt. Vervolgens worden de gasvormige componenten met het draaggas meegevoerd naar de kolom die zich op een bepaalde temperatuur bevindt. [63]

In de kolom wordt het mengsel van componenten van elkaar gescheiden. Er worden twee soorten GC-kolommen onderscheiden. De gepakte kolommen worden gebruikt voor grotere hoeveelheden monster. Deze wordt echter nog nauwelijks toegepast vanwege de lage resolutie. Capillaire kolommen worden meer toegepast voor kwantitatieve analyses. Er wordt gesproken van een capillaire kolom als de inwendige diameter kleiner dan 1 mm is [62]. De kolom wordt op temperatuur gehouden met behulp van de kolom-oven. De gekozen temperatuur wordt bepaald door kookpunten van de componenten en moet gelijk zijn aan het kookpunt van de componenten waarvan deze het hoogste is [63].

Belangrijk is dat de stationaire fase bestaat uit een verbinding die hoge temperaturen kan weerstaan. Daarnaast wordt de keuze van stationaire fase vooral bepaald door de eigenschappen van de te bepalen componenten zoals de polariteit, dampspanning en oplosbaarheid. [63].

De detector is het meetinstrument, waarmee veranderingen in de samenstelling van het uit de kolom komende gasstroom wordt gemeten. Voorbeelden van detectoren zijn TCD, FID, ECD of MS [62], [63].

Een speciale vorm van GC is headspace gaschromatografie (HSGC). Hierbij wordt de dampfase boven de vloeistof van het monster in een afgesloten fles overgebracht naar de inlaat van de GC [64].

2.6.5 Vloeistofchromatografie

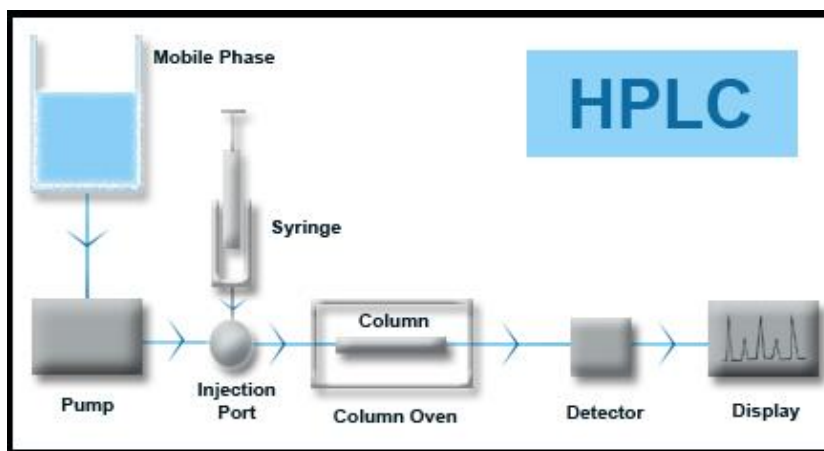
De analysemethode die in dit project gebruikt wordt is een UPLC die gekoppeld is aan een tandem MS. UPLC is een vorm van vloeistofchromatografie (LC). Een vloeistofchromatograaf is een toestel waarmee componenten van elkaar worden gescheiden met behulp van een kolom. Deze kolom bevat de stationaire fase. De vloeistof die de componenten meedraagt door de kolom is de mobiele fase. Hierbij interageren de componenten in de oplossing met de kolom. Deze verschillen in affiniteit voor de stationaire fase, waardoor ze beter of slechter weerhouden worden. Hoe groter de affiniteit voor de stationaire fase, hoe beter de component weerhouden wordt en dus, hoe later deze de kolom zal verlaten. Anderzijds, hoe groter de affiniteit voor de mobiele fase, hoe sneller deze componenten van de kolom zullen komen. De componenten worden dus gescheiden op basis van het verschil in affiniteit voor de mobiele en stationaire fase [65].

Het analiet vormt in de kolom een band van analiet-moleculen waarbij het midden van deze band de hoogste concentratie heeft. Bij het verlaten van de kolom passeren deze componentbanden een detector. Deze worden gemeten ten opzichte van een achtergrond van mobiele fase. Er zijn verschillende soorten detectoren zoals de UV-detector, ELS, FID,

enz. Deze nemen het analyt waar en sturen het overeenkomstig elektrisch signaal naar een computer. In de computer wordt dit signaal omgezet naar een chromatogram. Een chromatogram geeft een serie van pieken weer die overeenstemmen met de gemeten analietbanden. Elke piek komt overeen met een verschillend component en wordt gekarakteriseerd door de oppervlakte onder de piek en de retentietijd. De retentietijd geeft informatie over de component, bijvoorbeeld is deze polair of apolair. Daarnaast is de retentietijd verschillend voor elke component en elke kolom. Daarom is het belangrijk de retentietijd te weten van de componenten die worden bepaald met de gekozen kolom. De oppervlakte onder de piek geeft informatie over de concentratie van de component. [66].

2.6.5.1 HPLC

De eerste vloeistofchromatograaf die wordt besproken is de "high performance liquid chromatografie" ofwel de HPLC. Het HPLC-toestel bestaat uit verschillende onderdelen, namelijk: reservoir met mobiele fase, pompen, injector, kolom, kolom-oven en de detector. De onderdelen worden schematisch weergegeven in onderstaande figuur (zie figuur 22) [67].



Figuur 22: Schematische weergave HPLC [67]

Het reservoir met mobiele fase gaat om een transparante glazen fles waar de mobiele fase aan wordt toegevoegd. Het voordeel van te werken met een transparante fles is dat er makkelijk gecontroleerd kan worden of er nog voldoende mobiele fase aanwezig is. De pompen van de HPLC zorgen dan weer voor de regeling van de flow van de mobiele fase [67].

Het injectiesysteem zorgt ervoor dat er een consequent volume van het staal wordt aangebracht. Dit gebeurt meestal met behulp van een autosampler en kan via partiële- of full-loop modus [67].

De chromatografische kolom is de belangrijkste component van de UHPLC en bevat de stationaire fase. De stationaire fase is pakking materiaal dat gecoat is met polaire, apolaire of ion-uitwisselende groepen. De temperatuur van deze kolom kan worden geregeld met behulp van de kolom-oven. Aanpassing van de temperatuur kan leiden tot een betere scheiding of betere retentietijd. De temperatuur wordt behouden door een luchtstroom te laten circuleren bij de gewenste temperatuur [67].

Tot slot is er de detector die een signaal geeft indien de componenten gedetecteerd worden. De detector die wordt gebruikt mag geen signaal geven op de mobiele fase of de

gebruikte solventen. Dit zou de detectie van de analiet-moleculen storen. Het signaal van de detector wordt naar een computer gestuurd die bezit over de gepaste software. Daar wordt het omgezet naar een visuele representatie van de resultaten, namelijk de chromatogrammen [67].

2.6.5.2 UPLC

UPLC of 'ultra-performance liquid chromatografie' is een vloeistofchromatograaf waarbij de resolutie, snelheid en gevoeligheid drastisch verbeterd is ten opzichte van klassieke LC en HPLC. Deze techniek werd in 2004 gelanceerd door de firma 'Waters'. De afkorting UPLC werd door Waters getrademarked waardoor gelijkaardige methoden de benaming UHPLC kregen. Net zoals de klassieke LC worden ook hier opgeloste componenten gescheiden met behulp van een scheidingskolom [65].

Het UPLC-toestel (zie figuur 23) verschilt van de HPLC in de lengte van de kolom. Deze is korter en smaller om de hoge druk van de UPLC te kunnen behouden. De UPLC gebruikt namelijk hogere drukken dan de gewone HPLC. Daarnaast is er ook een verschil in de pompen. Deze moeten hogere drukken kunnen weerstaan om slijtage te minimaliseren. Door de hogere drukken worden de componenten sneller geëluëerd van de kolom. Daarom is er bij UPLC nood aan een detector met een hogere responsnelheid. [68].



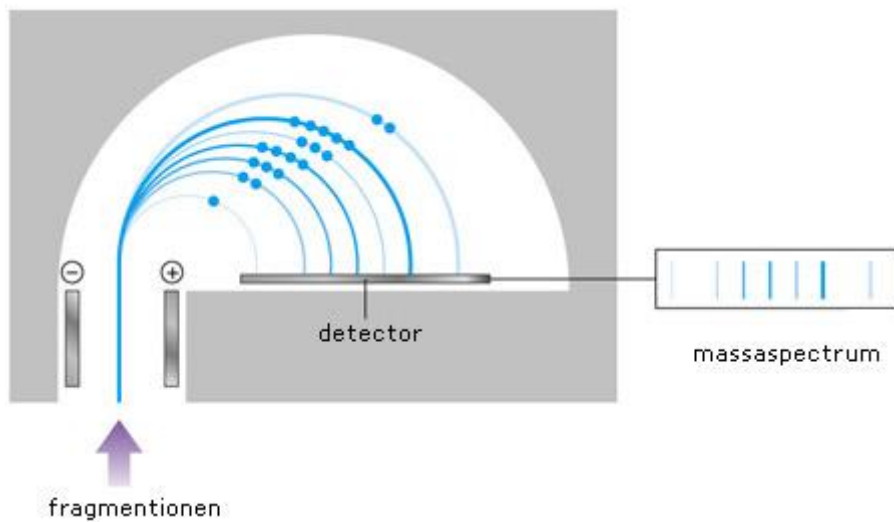
Figuur 23: Acquity UPLC [69]

2.6.6 Massaspectrometrie

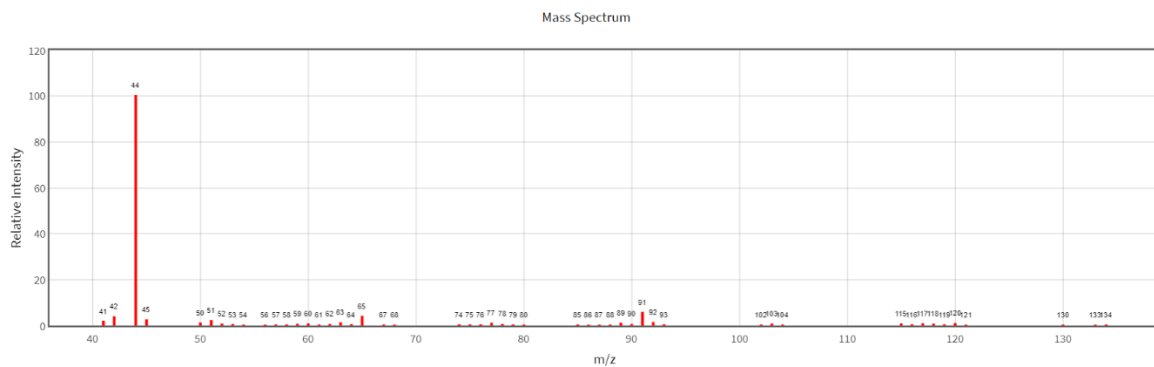
Massaspectrometrie (MS) wordt in een labo-omgeving voornamelijk gebruikt als detector bij bijvoorbeeld ICP, GC, HPLC of UPLC. Algemeen zal de MS componenten die binnenkomen omzetten naar ionen die nadien worden gescheiden op basis van hun massa en lading alvorens deze gedetecteerd zullen worden [70].

Als eerst wordt het staal met behulp van een vacuümpomp gasvormig gemaakt alvorens het verder door het apparaat gezogen. Hierna passeert het de ionisatiekamer. Hier worden de moleculen van het staal geïoniseerd. Dit kan gebeuren op verschillende manieren zoals EI, ESI, API, MALDI, enz. Op deze manier wordt er een mengsel van verschillende ionen bekomen. Deze éénwaardig positieve ionen worden molecuulionen genoemd. Deze ionen zijn relatief instabiel en kunnen uiteenvallen in brokstukken. Dit proces wordt fragmentatie genoemd. De fragmenten die bekomen worden zijn karakteristiek voor de molecule in kwestie. Deze fragmenten worden versneld in een elektrisch veld en komen vervolgens in een magnetisch veld terecht. In dit magnetisch veld worden de fragmenten afgebogen waardoor er een bocht wordt gemaakt (zie figuur 24). De mate van afbuiging hangt af van

de massa van het ion-fragment. De ionen worden opgevangen door de detector. De ionenbundels worden als functie van de massa geregistreerd, hierdoor ontstaat het zogenaamde massaspectrum. Als voorbeeld kan het massaspectrum van amfetamine teruggevonden worden in figuur 25 [71].

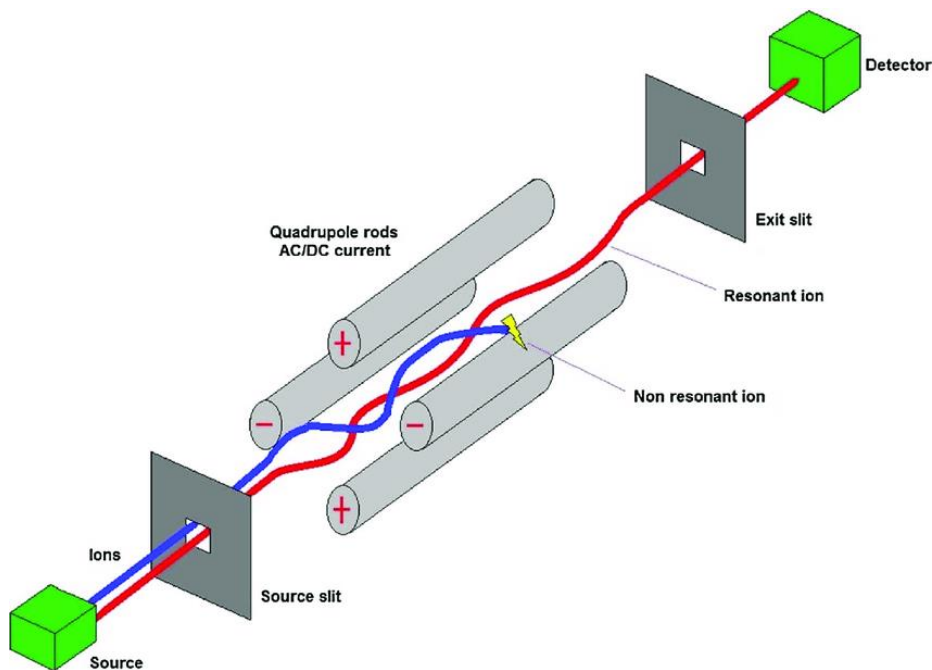


Figuur 24: Afbuiging van fragmenten in het magnetisch veld [71]



Figuur 25: Voorbeeld massaspectrum met EI van Amfetamine [72]

Een andere manier om ionen te selecteren is het gebruik van een quadropool. Een quadropool bestaat uit vier metalen staven die parallel ten opzichte van elkaar staan. Door deze staven wordt direct current (DC) en alternating current (AC) gejaagd. Dit creëert een elektromagnetisch veld waardoor de ionen die in gasfase zijn en de massaspectrometer binnenkomen bij het passeren in een spiraal langs de as passeren. De voltage kan worden aangepast om een bepaalde m/z verhouding van de ionen te laten passeren. De ionen die hierbuiten vallen, zullen niet volledig de quadropool passeren en worden bijgevolg niet waargenomen door de detector (zie figuur 26) [73].



Figuur 26: Schematische voorstelling quadrupool [74]

2.6.6.1 Tandem-MS

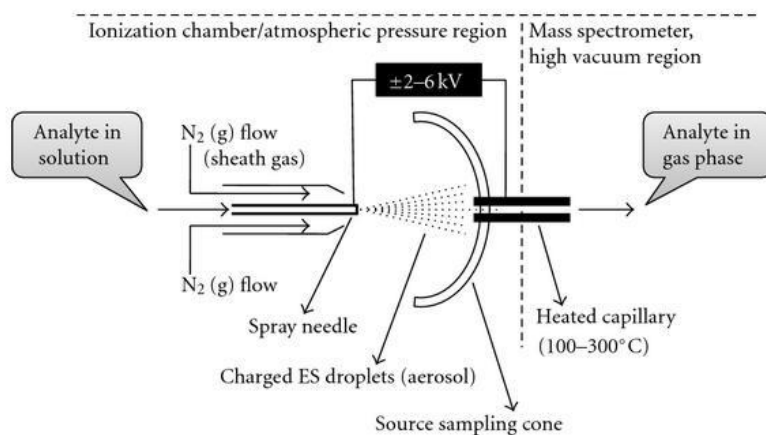
Tandem MS, ook wel MS/MS genoemd (zie figuur 28), is een opeenvolging van twee massaspectrometers. In dit geval wordt deze gekoppeld aan de UPLC. Het staal dat van de kolom komt, na analyse met UPLC, wordt geïoniseerd. Dit kan gebeuren op verschillende manieren zoals EI, ESI, API, MALDI, enz. Op deze manier wordt er een mengsel van verschillende ionen bekomen. Deze precursor ionen worden dan door de eerste MS geselecteerd op basis van de verhouding massa/lading. Het geselecteerde ion wordt het moeder-ion genoemd. Tussen de twee massaspectrometers wordt er een collision cel geplaatst. De cel bevat een inert gas (bijvoorbeeld Argon, Helium of stikstofgas). Wanneer de geselecteerde ionen botsen met deze gasdeeltjes, zal er verdere fragmentatie optreden. Deze fragmentatiemethode wordt Collision Induced Dissociation genoemd ofwel CID. De nieuwgevormde fragmenten, die door de tweede MS zullen gaan, worden dochterionen genoemd. Deze zullen dan gedetecteerd kunnen worden. Algemeen kan er dus gesproken worden van selectie-fragmentatie-detectie. De drie stappen kunnen gescheiden worden op twee manieren. Een eerste manier is scheiding in ruimte, een tweede is scheiding in tijd. Een voordeel van tandem-MS is dat de effecten van de matrix nagenoeg verdwijnen. De achtergrondruis wordt verwaarloosbaar klein zodanig dat deze methoden gevoeliger wordt [75], [76].

In dit project wordt er gebruik gemaakt van de Xevo TQS, mode MRM-massaspectrometer met positieve electrospray ionisatie (ES+). Trippel quadrupool massaspectrometrie (TQS) is, zoals de naam doet vermoeden, massaspectrometrie die gebruik maakt van drie quadrupolen. Twee van deze quadrupolen, Q1 en Q3, doen dienst voor de selectie van de ionen. Q1 doet dienst voor de selectie en Q3 voor de detectie. De tweede quadrupool, Q2, doet dienst als de zogenaamde collision cell. In deze regio vinden er botsingen plaats tussen de ionen en het collision gas (N₂ of Ar). Q2 zorgt dus voor de fragmentatie [72].

MRM staat voor 'multiple reaction monitoring'. Het is een techniek waarmee verbinding in complexe mengsels selectief kunnen worden gekwantificeerd. Deze techniek maakt gebruik van triple quadrupool MS om één of meerdere dochterionen te selecteren voor kwantificatie. Enkel verbindingen die een specifiek moederion en dochterionen hebben die overeenkomen met de geselecteerde massa van het doelmolecule, worden geïsoleerd.

Door alle andere ionen die in de massaspectrometer stromen te negeren, wint het experiment aan gevoeligheid, terwijl het een voortreffelijke nauwkeurigheid behoudt [77].

De gebruikte analysemethode maakt gebruik van ES+ voor de initiële ionisatie van het staal. Electrospray ionisatie (ESI) is een zachte ionisatietechniek die gebruikt wordt voor de productie van ionen in gasfase zonder dat er bij deze al fragmentatie optreedt. Hierbij wordt het analiet geïnjecteerd door een roestvrijstalen capillair bij een laag debiet. Het uiteinde van deze capillair wordt onder een zeer hoge spanning van 2-6 kV gehouden ten opzichte van de bemonsteringskegel. Dit elektrisch veld veroorzaakt dispersie van het staal tot een aerosol van geladen electrospray-druppeltjes. Een gasstroom rond het capillair van N₂-gas zorgt voor een betere verneveling en helpt om de zogenaamde "spray" naar de massaspectrometer te leiden. De druppeltjes zullen in volume afnemen door verdamping van het oplosmiddel (zie figuur 27). Uiteindelijk wordt het analiet vrijgezet uit de druppels. Sommige van deze analiet-moleculen komen in de bemonsteringskegel terecht en worden op die manier naar de massaspectrometer geleid die onder vacuüm staat. [78].

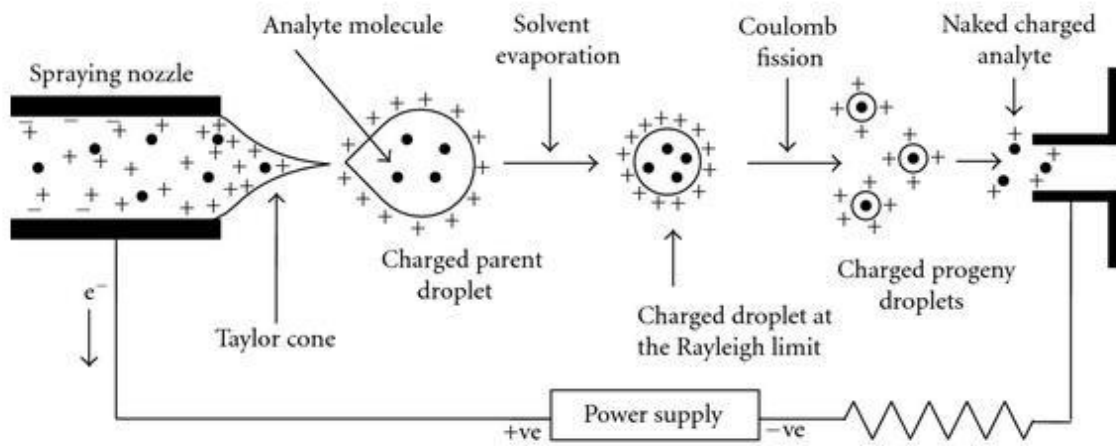


Figuur 27: Schematische voorstelling ESI [78]

Bij ES+ wordt het uiteinde van het capillair onder positieve potentiaal gehouden. De ionisatie gebeurt hierbij via protonatie of soms ook methylering ter vorming van een positieve aerosol. Wanneer het staal door het capillair wordt gepompt die onder spanning staat, treden er elektrochemische reacties op van het oplosmiddel. Bij de positieve ionenmodus gebeurt er oxidatie van het oplosmiddel. Deze oxidatiereacties leveren positieve ionen op in de oplossing. De geaccumuleerde positieve lading wordt afgestoten door het capillair omdat deze dezelfde polariteit bezit. De ionen migreren naar het vloeistofoppervlak aan het uiteinde van het capillair. Onder invloed van het elektrische veld worden de ladingen aan het oppervlak gedestabiliseerd en vormen een kegel. Dit wordt de Taylor-kegel genoemd. Bij een hoge elektrische veldsterkte vloeit een fijne vloeistofstraal uit de top van de kegel naar de tegenelektrode. Deze straal valt makkelijk uiteen in druppeltjes. De geladen druppels worden van elkaar afgestoten en drijven weg in de richting van het elektrische veld, naar de tegenelektrode (zie figuur 29) [78].



Figuur 28: MS/MS [79]



Figuur 29: Weergave ionisatie door ESI [78]

3 PRAKTISCHE AANPAK

De analieten die van belang zijn bij deze analyse zijn: amfetamine, MDMA, cocaïne, benzoylecgonine, morfine en MAM. Deze kunnen allemaal simultaan geïdentificeerd en gekwantificeerd worden met behulp van de UPLC-MS/MS. Bij de huidige methode wordt er gebruik gemaakt van de Oasis[®] MCX 3cc 30 µm (60 mg) voor SPE. Als er een correcte kalibratiecurve opgesteld is, wordt een eerste test gedaan met de aangepaste methode. Hierbij wordt er opnieuw een kalibratiecurve opgesteld met het verschil dat de SPE-kolommen vervangen worden door de Oasis[®] MCX 96-well platen 30 µm (30 mg). Als een correcte kalibratiecurve bekomen wordt, kan er worden overgegaan naar optimalisatie. Hierna kan er verder gevalideerd worden.

3.1 Principe analyse van basische drugs

Voordat er wordt overgegaan naar materiaal en methoden, zal kort het principe worden toegelicht waarmee de basische drugs geïdentificeerd en gekwantificeerd worden. Eerst werd er vanuit de werkoplossing 'WS basic drugs saliva UPLC-MS/MS' een reeks verdunningen bereid (WS0, WS1, WS2, WS3). Met deze verdunningen werden de calibratoren aangemaakt. Naast de calibratoren werd ook een blanco en QC's bereid. Van het speekselstaal werd een bepaald volume genomen en samen met de IS toegevoegd aan acetaat buffer [80].

Als de stalen bereid waren, werden de analieten geëxtraheerd met behulp van SPE. De kolommen werden geconditioneerd voordat de stalen erop aangebracht werden. Hierna werden de kolommen gewassen. De kolommen werden daarna gedurende een tijd vacuümgetrokken tot deze goed droog waren. nadien kon het staal van de kolommen worden geëlueerd. De elutie gebeurde rechtstreeks in een opvangplaat die in de UPLC-MS/MS kon geplaatst worden. Hierbij werd een stap uitgesloten waarbij eventuele staalverwisseling kon optreden. De elutie-oplossing moest hierbij telkens vers worden aangemaakt. Het is belangrijk dat er voor elutie waterstofchloride in 2-propanol werd toegevoegd aan de well-plaat of vials waarin het staal werd opgevangen. Dit werd toegevoegd ter preventie van de vervluchtiging van de amfetamines bij kamertemperatuur [80].

Na elutie werd de elutie-oplossing droog gedampt in een vacuümcentrifuge en daarna opnieuw opgelost in ammoniumformaatbuffer. Nu konden de stalen geanalyseerd worden met behulp van de UPLC-MS/MS [80]. Deze methode werd geoptimaliseerd met behulp van de extractie-efficiëntie. Deze validatiekarakteristiek werd simultaan bepaald met het matrixeffect. Vanaf dat de extractie-efficiëntie voor de analieten gelijk was aan 50% en goed reproduceerbaarheid ($RSD \leq 20\%$) was, werd er verder gegaan met de validatie. De validatie wordt in een volgend paragraaf verder toegelicht.

3.2 Materiaal

De reagentia en apparatuur die gebruikt zijn in dit project kunnen teruggevonden worden in bijlagen A en B. Info over de werkoplossingen, gebruikte SPE-kolommen, UPLC-kolom en MS/MS worden in onderstaande delen besproken.

3.2.1 Werkoplossing basische drugs

Tijdens dit project werden er verschillende basische drugs getest: amfetamine, MDMA, cocaïne, benzoylecgonine, morfine en MAM. Hoewel deze drugs de focus hebben in dit project, bevatte de werkstock daarnaast ook andere drugs die kunnen opgespoord worden

namelijk: MDA, metamfetamine, mephédronne, mCPP, méthylphenidate, codeïne, methadone en EDDP. De specificaties van deze werkoplossing, 'WS basic drugs saliva UPLC-MS/MS' worden weergegeven in onderstaande tabel [80].

Tabel 5: Stock concentratie basische drugs [80]

Drug	Stock concentration (µg/mL).
amfetamine	5,00
MDMA	5,00
Cocaïne	2,00
Benzoylecgonine	2,00
Morfine	1,00
MAM	1,00
MDA	5,00
Metamfetamine	5,00
mephédronne	5,00
mCPP	5,00
méthylfenidaat	5,00
codeïne	1,00
methadone	1,00
EDPP	1,00

3.2.2 Werkoplossing gedeuteerde standaard

Als IS werd er gebruik gemaakt van gedeuteerde analogen. Niet elke stof uit tabel 5 heeft een gedeuteerde analoog. De basische drugs die van belang zijn voor dit project hebben dit wel, waaronder ook nog andere basische drugs die in de werkoplossing aanwezig zijn. Merk op dat de benaming van het analoog eerst de naam van de stof weergeeft, gevolgd door -d#. Dit laatste duidt op het aantal waterstofatomen die vervangen zijn door deuterium. De gedeuteerde analogen in deze werkoplossing zijn: amfetamine-d11, MDMA-d5, metamfetamine-d5, MDA-d5, cocaïne-d3, benzoylecgonine-d8, morfine-d3, MAM-d6, codeïne-d6, methadone-d9 en EDDP-d3. De specificaties worden weergegeven in tabel 6 [80].

Tabel 6: Stock concentratie van de gedeuteerde analogen [80]

Gedeuteerd analoog	Stock concentration (ng/mL).
amfetamine-d11	80,0
MDMA-d5	80,0
Cocaïne-d3	80,0
Benzoylecgonine-d8	80,0
Morfine-d3	40,0
MAM-d6	40,0
MDA-d5	80,0
Metamfetamine-d5	80,0
codeïne-d6	40,0
methadone-d9	40,0
EDDP-d3	40,0

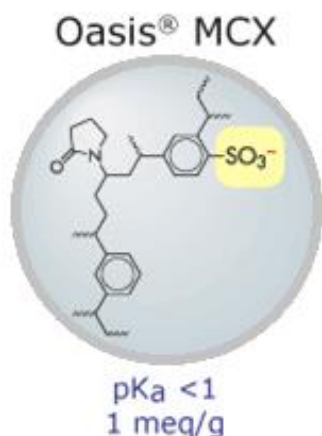
3.2.3 SPE

De MCX 96-well platen 30µm (30mg) bevatten het Oasis MCX-sorptiemiddel. MCX staat voor Mixed-mode, Cation-eXchange. Dit is een nieuw mixed-mode polymeer dat geoptimaliseerd is om een hogere selectiviteit en gevoeligheid voor de extractie van basische verbindingen met kation uitwisselende groepen. Het is een reversed-phase kolom die goed bevochtigbaar is met water. De molecule van het MCX-sorptiemiddel wordt weergegeven in figuur 30. Op deze figuur is te zien dat de belangrijkste groep een sulfiet-groep ($-\text{SO}_3^-$) is met een $pK_a < 1$. De lage pK_a zorgt ervoor dat deze groep van het MCX-molecule praktisch altijd geïoniseerd is en dus een negatieve lading zal dragen [82], [83]. Dit kan afgeleid worden met behulp van de Henderson-Hasselbalch-vergelijking die weergegeven wordt in formule 2.

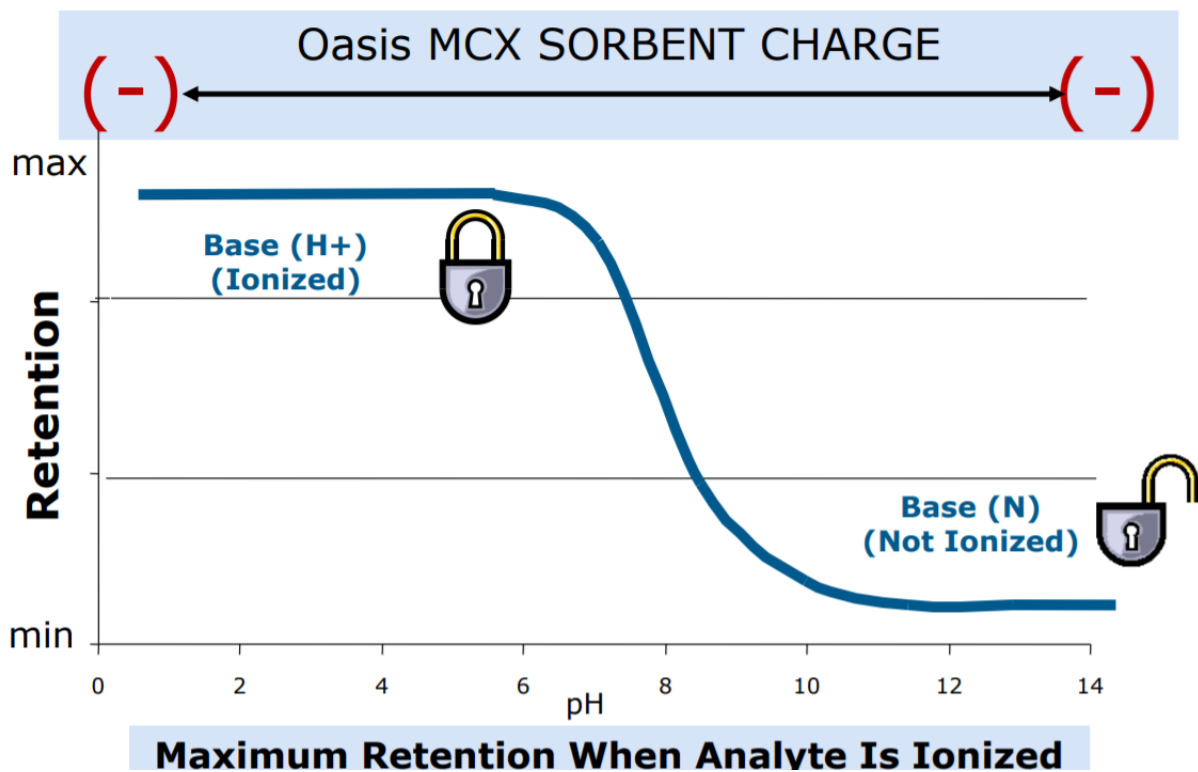
Als de analieten, de basische drugs en metabolieten, geïoniseerd zijn, zal de retentie van deze stoffen maximaal zijn. Dit wordt verduidelijkt in figuur 31. In de praktijk werd dit bekomen door te werken met een acetaat-buffer met pH 4. Met behulp van de pK_a -waarden weergegeven in tabel 1 en de Henderson-Hasselbalch vergelijking kan er worden bepaald of de geïoniseerde vorm van de drug voorkomt of de niet-geïoniseerde vorm. Bij pH 4 komt elk analiet voor onder de geïoniseerde, positief geladen, vorm. Door de goede kation-uitwisselende eigenschappen van MCX en door de negatief geladen sulfiet-groep, zullen deze goed worden weerhouden [84]. Elutie werd bekomen doordat de analiet moleculen overgaan naar het meer organische milieu van de elutie-vloeistof. In dit project werd er gebruik gemaakt van 40 mL dichloormethaan, 10 mL 2-propanol en 1 mL Ammoniak oplossing 32%. Hierbij zullen de NH_3 moleculen de plaats innemen van de NH_2 -groepen van de analiet-moleculen.

Een alternatief op MCX is het Oasis WCX-sorptiemiddel. Dit is net zoals MCX een mixed-mode, reversed-phase kolom. In dit geval gaat het echter wel om zwakke kationuitwisseling dus, Weak Cation-eXchange. Oasis WCX wordt voornamelijk gebruikt voor sterke basen, vandaar dat MCX de voorkeur krijgt [84].

$$\text{Henderson-Hasselbalch: } pH = pKa + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad (2)$$



Figuur 30: MCX-molecule met pK_a en ion-uitwisselend vermogen [83]



Figuur 31: Retentie van analiet i.f.v. de pH voor het MCX-sorptiemiddel [84]

3.2.4 UPLC

In dit project werd gebruik gemaakt van de Bridged Ethyleen Hybrid (BEH) C18, reversed phase, UPLC-kolom. Deze kolom bevat trifunctionele ligandbindingschemie op 1,7 μm BEH-deeltjes (zie figuur 32). Dit zorgt voor stabiliteit over een breed pH-spectrum. Er wordt gebruik gemaakt van nieuwe endcapping-processen die zorgen voor goede piekvorming van basische analieten. Door de aanwezigheid van de lange koolstofketen, worden de verschillende analieten via hydrofobe interacties van elkaar gescheiden [85], [86].

De injectie verliep volgens de full-loop injectiemodus met behulp van een autosampler. Deze wordt gekarakteriseerd door betere recovery ten opzichte van partiële-loop injecties en wordt gelimiteerd door het groter verbruik van staal en een grotere variabiliteit van lus tot lus [87].



Figuur 32: Structuur van BEH C18 [86]

3.2.5 Tandem MS

Zoals reeds aangehaald werd er in dit project gebruik gemaakt van de Xevo TQS, mode MRM-massaspectrometer. Dit is een tandem quadrupole massa spectrometer ontworpen voor kwantitatieve analyses via UPLC [88]. De ionisatie die hier toegepast werd, is

positieve Electrospray ionisatie modus (ES+). De instellingen die hiervoor gebruikt werden, zijn weergegeven in onderstaande tabel (zie tabel 7).

Tabel 7: Instellingen MS

Instelling MS	Van:	Tot :
Spanning capillaire (kV)	3,00	3,12
Spanning kegel (V)	30,0	121,3
Bron offset spanning (V)	50,0	50,0
Temperatuur bron (°C)	150	150
Desolvatatie Temperatuur (°C)	650	650
Gasflow Kegel (L/h)	150	145
Desolvatatie gasflow (L/h)	1000	994
Collision-cell gasflow (mL/min)	0,150	0,140
Gasflow vernevelaar (Bar)	7,00	6,41

3.3 Methode

3.3.1 Analyse basisch drugs

De methode die gevolgd werd is gebaseerd op document "[80]". Dit verklaart eventuele overeenkomst. Op basis van dit document zal een overzicht gegeven worden van de methodes en bereidingen voor de analyse van basische drugs.

3.3.1.1 Bereiding calibratoren

In dit project werden de calibratoren bereid uitgaande van verdunningen van de werkstock 'WS basic drugs saliva UPLC-MS/MS' (zie tabel 5). Hierbij werd er 250 µL werkstock (WS) verdund met 750 µL MeOH en gehomogeniseerd (vortex) voor de bereiding van WS0. Vanuit WS0 werden de andere verdunningen bereid volgens onderstaande tabel (tabel 8). De standaardreeks van 11 kalibratiepunten wordt nadien bereid volgens tabel 9 [80].

Tabel 8: Bereiding verdunningen [80]

Verdunning	V_{ws}	V_{MeOH}
WS1	100µL WS0	900 µL
WS2	200 µL WS1	800 µL
WS3	50,0 µL WS1	950 µL

Tabel 9: Bereiding calibratoren [80]

	Volume niet-gedeutereerd	Volume Interne standaard	Volume Acetaat buffer	Concentratie aan amfetamine en MDMA	Concentratie aan cocaïne en benzoylecgonine	Concentratie aan morfine en MAM
Cal 1	50 µL WS3	50 µL	750 µL	12,5 ng/mL	5 ng/mL	2,5 ng/mL
Cal 2	100 µL WS3	50 µL	750 µL	25 ng/mL	10 ng/mL	5,0 ng/mL
Cal 3	50 µL WS2	50 µL	750 µL	50 ng/mL	20 ng/mL	10 ng/mL
Cal 4	100 µL WS2	50 µL	750 µL	100 ng/mL	40 ng/mL	20 ng/mL
Cal 5	40 µL WS1	50 µL	750 µL	200 ng/mL	80 ng/mL	40 ng/mL
Cal 6	80 µL WS1	50 µL	750 µL	400 ng/mL	160 ng/mL	80 ng/mL
Cal 7	120 µL WS1	50 µL	750 µL	600 ng/mL	240 ng/mL	120 ng/mL
Cal 8	160 µL WS1	50 µL	750 µL	800 ng/mL	320 ng/mL	160 ng/mL
Cal 9	25 µL WS0	50 µL	750 µL	1250 ng/mL	500 ng/mL	250 ng/mL
Cal 10	50 µL WS0	50 µL	750 µL	2500 ng/mL	1000 ng/mL	500 ng/mL
Cal 11	100 µL WS0	50 µL	750 µL	5000 ng/mL	2000 ng/mL	1000 ng/mL

3.3.1.2 Bereiding controlestalen

Naast de calibratoren werden er ook controlestalen (QC's) meegenomen bij elke analyse, namelijk drie in-house aangemaakte QC's. De interne QC's werden aangemaakt uitgaande van werkoplossing 'WS Saliva QC'. Dit gebeurt volgens onderstaande tabel (zie tabel 10). Vervolgens werden deze gealiquoteerd als controles van 1 mL. Uit de tabel kan worden afgelezen dat er gebruik werd gemaakt van de zogenaamde intercept buffer. Dit is de buffer waarin de speekselstalen worden opgevangen om daarna opgestuurd te worden naar het labo. Daarnaast werd gebruik gemaakt van blanco speeksel. Dit is speeksel die afgenomen werd bij de NICC medewerkers. De concentratie aan basische drugs voor elke in-house QC wordt weergegeven in tabel 11. De bereide QC's werden bewaard in de vriezer [80], [89].

Tabel 10: Aanmaak QC's [89]

Product	QC_LOW	QC_MEDIUM	QC_HIGH
Werkoplossing: WS Saliva QC	60,0 µL	250 µL	960 µL
Speeksel (blanco)	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL
Intercept buffer	Tot 30,0 mL	Tot 30,0 mL	Tot 30,0 mL

Tabel 11: Concentratie basische drugs interne QC's [80]

Basische drug	Concentratie (ng/mL)		
	QC_LOW	QC_MEDIUM	QC_HIGH
Amfetamine	24,0	100	384
MDMA	24,0	100	384
Cocaïne	9,00	37,5	144
Benzoylecgonine	9,00	37,5	144
Morfine	6,00	25,00	96,0
MAM	6,00	25,00	96,0

3.3.1.3 Voorbehandeling stalen en blanco

Naast de calibratoren en de QC's werden ook blanco's en stalen voorbereid. Deze bereiding wordt weergegeven in onderstaande tabel. Het is belangrijk om hier te vermelden dat aan elke extractiereeks een blanco-staal moet toegevoegd worden. Deze blanco werd bereid vanuit 1 mL blanco speeksel en 2 mL interceptbuffer. Dit wordt gedaan omdat de speekselstalen die worden doorgestuurd door de politie eveneens bestaan uit een theoretische 1/2-verhouding speeksel/buffer-mengsel [80].

Tabel 12: Voorbereiding stalen [80]

Type	Volume mengsel speeksel/Intercept buffer (1:2, v/v)	Volume speekselstaal	Volume IS	Volume acetaat buffer
QC_BLANCO	75,0 µL	/	50,0 µL	750 µL
Stalen	/	75,0 µL	50,0 µL	750 µL

3.3.1.4 Extractie van de basische drugs

Voor de extractie werden eerst de extractiekolommen, Oasis® MCX 96-well platen 30µm (30mg), geconditioneerd door achtereenvolgens 1 mL methanol (voor chromatografie), 1 mL water (HPLC) en tenslotte 1 mL acetaat buffer 0.1 M pH 4.0 aan te brengen op de kolom. Hierna werden de stalen, na nog eens goed vortexen, volledig aangebracht op de kolommen. De analiet moleculen worden dan weerhouden door de kolommen [80].

Nadat het staal door de kolommen was gelopen, werd deze gewassen. Voor deze wasstap werden een aantal aanpassingen doorgevoerd na optimalisatie. Eerst werd er 1 mL HCl (0,1N) aangebracht op de kolommen. Dit dient om de binding tussen de geïoniseerde analiet-moleculen en de sulfietgroep te verbeteren zodanig dat deze niet worden weggespoeld met de volgende wasstap. Na de toevoeging van HCl werd de kolom 1,5 minuut gedroogd onder vacuüm bij 3"Hg. Hierna volgde de tweede wasstap, namelijk 1mL MeOH. Hierdoor werden storende stoffen die nog op de kolom zaten weggespoeld terwijl de analiet moleculen gebonden bleven. Hierna werden de kolommen weer 1,5 minuut gedroogd onder vacuüm (3"Hg) tot deze goed droog waren [80].

Voor de elutie werd er aan de 96-well plaat, waar de stalen in werden opgevangen, 25 µL waterstofchloride 1,25M in 2-propanol toegevoegd. Dit dient om te voorkomen dat de amfetamines vervluchtigde in de elutie-oplossing. De extractiekolommen werden op de well-plaat geplaatst en de analieten werden geëluëerd met 750 µL van de elutie-oplossing. De elutie-oplossing moet elke dag opnieuw bereid worden. Deze bestaat uit 40 mL dichloormethaan voor chromatografie, 10 mL 2-propanol voor chromatografie en 1 mL de Ammonia solution 32% [80].

De elutie-oplossing werd droog gedampt met behulp van de vacuümcentrifuge en elk staal werd heropgelost in 1000 µL ammonium formaat buffer. Nadien werd er gehomogeniseerd onder vortex [80].

3.3.1.5 Analyse met UPLC-MS/MS

De UPLC was, zoals reeds besproken, uitgerust met een BEH C18, reversed phase, UPLC-kolom. Deze kolom werd op 55°C gebracht vooraleer er geïnjecteerd werd. De stalen werden in de autosampler op 5°C gehouden. Van elk staal werd er 5 µL geïnjecteerd volgens de full loop injectie modus. Daarnaast was de UPLC aangesloten op twee mobiele fasen en drie verschillende washes [80]. Deze zijn:

- Mobiele fase A: 0.1% formic acid in water
- Mobiele fase B: Methanol, ULC-MS
- Seal Wash: Mengsel 90% water, HPLC /10% MeOH, ULC-MS (90/10).
- Weak Wash: Mengsel 90% van 0.1% formic acid in water, HPLC /10% MeOH, ULC-MS (90/10).
- Strong wash: Methanol, ULC/MS : water, HPLC: Acetonitrile ULC/MS : 2-propanol, for chromatography : Formic acid for mass spectroscopy, 98% (25:25:25:25:0.1, v/v)

De elutie-gradiënt die werd gebruikt bij deze analyse wordt weergegeven in onderstaande tabel (zie tabel 13). Deze gradiënt werd gebruikt om een betere scheiding te krijgen tussen de verschillende analieten aangezien deze simultaan geanalyseerd werden. Een voordeel van het gebruik van zo'n elutie-gradiënt is dat de analysetijd verkort kan worden. Eén run duurt bij deze methode negen minuten.

Tabel 13: Elutie-gradiënt i.f.v. de tijd

	Tijd (min)	Flow	A (%)	B (%)
1.	0,00	0,450	90,0	10,0
2.	0,30	0,450	90,0	10,0
3.	6,00	0,450	30,0	70,0
5.	6,10	0,450	0,00	100
5.	7,00	0,450	0,00	100
6.	7,10	0,450	90,0	10,0
7.	9,00	0,450	90,0	10,0

Met de gebruikte elutie-gradiënt werden de analieten van elkaar gescheiden. De retentietijden voor de analieten worden weergegeven in onderstaande tabel samen met de molaire massa (MM) en de bruto formule van de analieten.

Tabel 14: Retentietijden basische drugs

Drugs	RT	Formule	MM (g/mol)
Amfetamine	1,91	C ₉ H ₁₃ N	135,23
MDMA	2,02	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193,27
Cocaïne	2,95	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,39
Benzoylcegonine	2,67	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289,36
Morfine	0,76	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285,37
MAM	1,81	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327,41

3.3.1.6 Berekening van de concentratie

Omdat er niet exact 1 mL speekselstaal wordt opgevangen met de speekselcollectoren moet er, voor de bepaling van de concentratie basische drugs, gecorrigeerd worden voor dit verschil in volume. Dit is echter enkel van belang voor de analyse van basische drugs in de routine. Dat gezegd zijnde gebeurt deze berekening met behulp van onderstaande formule [80].

$$C_{staal} = \frac{C_{LC/MS} * (2+w-x)}{3*(w-x)} \quad (3)$$

Met:

$C_{LC/MS}$ = Concentratie van het staal ten opzichte van de ijklijn

C_{staal} = Concentratie in het staal berekend met de hoeveelheid afgenomen speeksel

W = Gewicht van de collector na speekselafname

X = Gewicht van de collector voor speekselafname:

Hierbij moet ook rekening gehouden worden met het wettelijk vastgelegde, gemiddelde gewicht van de collectorbuisjes en de etiketten namelijk:

Gemiddeld gewicht Intercept = 9,9199 g

Gemiddeld gewicht etiket = 0,1756 g

3.3.2 Optimalisatie

Door het gebruik van de Oasis[®] MCX 96-well platen 30 μm (30 mg) moeten er nog enkele zaken worden aangepast aan het protocol. In eerste instantie werd een minimum aan aanpassingen gedaan. De belangrijkste aanpassing was het volume elutievlloeistof. Deze werd verminderd tot 500 μL omdat een eerste test aantoonde dat 1 mL elutievlloeistof overvloeit bij gebruik van de vacuümcentrifuge en dus aanleiding geeft tot contaminatie. Daarnaast werd het volume acetaatbuffer verminderd van 2,5 mL in de routine naar 750 μL in deze nieuwe methode. De specificaties worden nog eens weergegeven in onderstaande tabel (zie tabel 15).

Tabel 15: Aanpassingen aan het protocol

		Initiële wijzigingen protocol	Finale wijzigingen protocol
Monster:	monstervoorbereiding:	750 μL acetaatbuffer pH4	750 μL acetaatbuffer pH4
		75 μL speeksel/buffer mengsel	75 μL speeksel/buffer mengsel
		50 μL gedeuteerde standaard	50 μL gedeuteerde standaard
SPE:	conditioneren:	1mL MeOH	1mL MeOH
		1mL H ₂ O	1mL H ₂ O
		1mL acetaatbuffer	1mL acetaatbuffer
	staal overbrengen	Volledig	Volledig
	wasstap	1mL HCL	1mL HCL
		1mL MeOH	1,5' 3''Hg drogen
		5' drogen	1mL MeOH
			1,5' 3'' Hg drogen
	elueren	500 μL Elutie-oplossing	750 μL Elutie-oplossing

De extractie-efficiëntie (EE) werd gebruikt om de methode verder te optimaliseren alvorens de andere validatiekarakteristieken werden bepaald (uitz. matrixeffect). Hieruit bleek dat er nog verdere aanpassingen nodig zijn die eveneens teruggevonden kunnen worden in tabel 15. De aanpassingen zullen besproken worden bij "resultaten en discussie". De extractie-efficiëntie zal hieronder verder worden toegelicht.

3.3.2.1 Extractie-efficiëntie

De extractie-efficiëntie is de transfer van de analieten van de matrix naar het primaire extract. Dit wordt bepaald door de ratio van de respons na analyse van een blanco staal, waar een hoeveelheid analieten aan toegevoegd werden vóór de extractie, en de respons bekomen na analyse van een blanco staal, waar dezelfde hoeveelheid analieten aan toegevoegd werden na de extractie [81]. De berekening voor EE gaat dan als volgt:

$$EE (\%) = \frac{Response_{Analiet\ voor\ extractie\ toegevoegd}}{Response_{Analiet\ na\ extractie\ toegevoegd}} * 100\% \quad (4)$$

Praktisch werden tien controlestalen meegenomen waar de analieten en IS na extractie werden toegevoegd en tien stalen waar deze voor de extractie werden toegevoegd. Dit gebeurde voor verschillende concentratieniveaus: QC_High QC_Low (zie tabel 16). Er werden steeds minstens twee concentratieniveaus meegenomen voor de bepaling van de extractie-efficiëntie. De verschillende stalen werden getest in dezelfde matrix, namelijk ½-Speeksel/interceptbuffer. Belangrijk is dat deze matrix die van de reële stalen zo goed mogelijk benaderd [81].

De extracten moeten reproduceerbaar zijn met een relatieve standaarddeviatie die kleiner of gelijk is aan 20%. Bij voorkeur is de EE groter dan 50%. Methodes met een lagere extractie-efficiëntie worden aanvaard zolang de limietwaarden bereikt worden en de waarden reproduceerbaar zijn [81].

Tabel 16: De concentratieniveaus die getest worden

Basische drugs	QC_High (ng/mL)	QC_Low (ng/mL)
Amfetamine	500	20,0
MDMA	500	20,0
Benzoylecgonine	200	8,00
Cocaïne	200	8,00
MAM	100	4,00
Morfine	100	4,00

3.3.3 Validatie

Voor de validatie werd een validatieplan opgesteld op basis van document "[81]". Op basis van dit document zal een overzicht gegeven worden van de verschillende validatiekarakteristieken die gebruikt werden, namelijk: selectiviteit, lineariteit van de calibratiecurve, accuraatheid, analytische grenzen, carry-over, matrix effect, extractie efficiëntie, stabiliteit [81].

Daarnaast werd de meetonzekerheid bepaald om de methode te evalueren bij routinegebruik op lange termijn. Als laatste zou eveneens de incurred sample analysis (ISR) uitgevoerd worden om na te gaan of de methode bruikbaar is voor reële stalen [81].

3.3.3.1 Selectiviteit

Selectiviteit is het vermogen om de analieten te onderscheiden van elkaar en van andere stoffen die mogelijks aanwezig zijn. Er mogen dus geen storende pieken zijn die de detectie en identificatie van de analieten bemoeilijken [81].

Voor de bepaling van de selectiviteit werden minstens tien blanco stalen bereid zonder IS en twee die wel IS bevatten, deze laatste worden de zerostalen genoemd. De blanco's zonder IS waren van verschillende oorsprong en komen zo dicht mogelijk in de buurt van reële stalen die werden geanalyseerd. Aan de blanco's werden stoffen toegevoegd, anders

dan de analieten, die mogelijks aanwezig zijn in reële stalen. De blanco's met de toegevoegde stoffen werden afzonderlijk geïnjecteerd om interferentie te voorkomen tijdens de analyse [81].

De gemeten area van de blanco's mag niet hoger zijn dan 20% van de LOQ. Daarnaast wordt er een confidentie interval (CI) bepaald rond het gemiddelde van de blanco respons area's en het gemiddelde van de LOQ respons area's. De bovengrens van het CI voor de blanco's moet vijf keer lager zijn dan de ondergrens van het CI voor LOQ om de afwezigheid van storende stoffen te kunnen garanderen [81]. Het CI wordt berekend als volgt:

$$CI = [\text{mean} - t(0.975) * \text{sd}/\sqrt{n}; \text{mean} + t(0.975) * \text{sd}/\sqrt{n}] \quad (5)$$

3.3.3.2 Lineariteit van de calibratiecurve

Lineariteit van de calibratiecurve is het vermogen om, binnen een bepaald bereik, de testresultaten weer te geven die proportioneel zijn met het gehalte analiet in het staal. Hiervoor wordt een 'werkbereik' gedefinieerd. Het werkbereik is het interval van de analietconcentraties waarvoor de lineariteit aangetoond kan worden. Deze wordt gekozen op basis van de analiet concentraties die terug gevonden worden in reële stalen [81].

Er werden minstens zes calibratoren meegenomen voor de bepaling van de lineariteit. Voor de bepaling van basische drugs werden er elf calibratoren meegenomen. De calibratoren werden aangemaakt zoals weergegeven in '3.4.1.1'. De concentraties werden verdeeld over het werkbereik met als laagste punt de LOQ. De LOQ was gekozen op basis van de wettelijke grenswaarden voor basische drugs in speeksel (zie tabel 3). De calibratiecurve, met elke concentratie, werd opgesteld op minstens acht verschillende dagen. Uitschieters werden geëvalueerd via de Grubbstest. Twee uitschieters op hetzelfde concentratieniveau zijn niet toegelaten [81]. Voor de Grubbstest zijn er twee waarden van belang namelijk, G_{exp} en G_{tabel} . Indien $G_{exp} < G_{tabel}$, is de waarde geen uitschieter. G_{tabel} kan worden afgelezen uit tabellen als de kritische waarde (voor $p=0,005$) bij een bepaalde steekproefgrote. In dit geval is de grote van de steekproef gelijk aan 8. Hiervoor bedraagt de waarde van G_{tabel} 2,126. G_{exp} wordt berekend op onderstaande manier:

$$G_{exp} = \frac{|\text{waarde} - \text{mean}|}{\text{stdev}} \quad (6)$$

Regressie werd toegepast om een eerste beeld te krijgen van de lineariteit en moet resulteren in een $R^2 > 0,995$. Daarnaast moeten de richtingscoëfficiënten reproduceerbaar zijn en dus een $RSD \leq 15\%$ hebben [81].

De 'goodness of fit' werd bepaald op basis van het percentage relatieve fout (%RE). Het %RE wordt berekend door het verschil te nemen tussen de gemeten en nominale waarde van de calibrator, gedeeld door de nominale waarde, vermenigvuldigd door 100% (Zie formule 7). Deze moet kleiner zijn dan 15%. Voor calibratoren op het LOQ niveau moet %RE kleiner zijn dan 20% [81].

$$\%RE = \frac{\text{Gemeten} - \text{nominale}}{\text{nominaal}} * 100\% \quad (7)$$

3.3.3.3 Accuraatheid

De accuraatheid is de afstand van de gemeten waarde ten opzichte van de nominale waarde. Deze wordt veroorzaakt door systematische en random (precision) fouten die gemaakt worden tijdens de uitvoering van de methode [81].

De accuraatheid werd bepaald met behulp van QC-stalen op drie verschillende concentratieniveaus. Deze werden bereid door de analieten toe te voegen aan blanco stalen. Externe controles konden eveneens gebruikt worden voor de bepaling van de accuraatheid indien deze aan dezelfde voorwaarden voldeden. Twee QC-stalen van elke concentratie werden geanalyseerd op minstens acht verschillende dagen [81]. De QC's die gebruikt werden zijn dezelfde als de QC's gebruikt voor de routine. Deze zijn reeds weergegeven in tabel 11 bij 'bereiding controlestalen'.

De juistheid is een eerste parameter die bepaald werd om de accuraatheid te bepalen. Juistheid is de afstand tussen het gemiddelde en de nominale waarde en heeft betrekking op de systematische fouten die gemaakt worden. Deze wordt dus ook als systematische fout of 'bias' uitgedrukt. De 'bias' moet binnen een interval van $\pm 15\%$ liggen [81]. De 'bias' wordt bepaald met behulp van onderstaande formule:

$$Bias (\%) = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} * 100\% \quad (8)$$

Met:

\bar{X} = Gemiddelde van alle bepalingen

μ = Nominale waarde

Naast de juistheid werd ook de precisie bepaald. De precisie geeft de spreidingsgraad weer van de metingen van eenzelfde homogeen staal bij multipele staalname. Precisie wordt verdeeld in drie categorieën namelijk: herhaalbaarheid, intermediaire precisie en de reproduceerbaarheid [81].

Herhaalbaarheid is de precisie die bepaald wordt door een aantal onafhankelijke metingen uit te voeren van eenzelfde staal in hetzelfde labo en met hetzelfde materiaal in een kort tijdsinterval. Met behulp van een single-factor ANOVA (met $\alpha = 0.05$), ook wel unifactoriële variantieanalyse genoemd, kan dan de herhaalbaarheid bepaald worden. De herhaalbaarheid wordt weergegeven als RSD_r (%). De herhaalbaarheid is aanvaardbaar voor $RSD_r \leq 15\%$ [81]. De berekening gebeurt via onderstaande formule:

$$RSD_r (\%) = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{X}} = \frac{\sqrt{MS_{binnen}}}{\bar{X}} \quad (9)$$

Met:

RSD_r = Herhaalbaarheid

s_r^2 = Herhalingsvariantie

MS_{binnen} = De variantie binnen de groepen

\bar{X} = Gemiddelde van alle bepalingen

Intermediaire precisie is de precisie bepaald door analyse van eenzelfde staal in hetzelfde labo, op verschillende dagen. De intermediaire precisie wordt weergegeven als RSD_t (%) en wordt aanvaard als $RSD_t \leq 15\%$ [81]. Deze wordt berekend met behulp van onderstaande formule:

$$RSD_t (\%) = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{X}} * 100\% \quad (10)$$

Met :

RSD_t = 'Time-different' intermediaire precisie

s_r^2 = Herhalingsvariantie

s_t^2 = Variantie tussen de dagen = $\frac{MS_{tussen} - MS_{binnen}}{n}$

\bar{X} = Gemiddelde van alle bepalingen

MS_{tussen} = De variantie van de observaties tussen de groepen (dagen)

MS_{binnen} = De variantie van de observaties binnen de groepen (dagen)

n = Aantal herhalingen per dag

Indien s_t^2 een negatieve waarde is, wordt er aangenomen dat deze factor gelijk is aan 0 voor de verdere berekening [81].

De laatste parameter met betrekking op de accuraatheid is de reproduceerbaarheid. Dit wordt bepaald door hetzelfde staal met dezelfde methode te analyseren, maar in verschillende laboratoria, verschillend materiaal en door verschillende mensen. In de praktijk zal de reproduceerbaarheid bepaald worden door analyse van QC-stalen in verschillende laboratoria [81].

3.3.3.4 Analytische grenzen

Onder analytische grenzen worden de 'Limit of quantification' (LOQ) en de 'Limit of detection' (LOD) verstaan. De LOQ is de laagste concentratie analiet die kwantitatief bepaald kan worden in een staal met voldoende precisie. De LOQ werd bepaald aan de hand van twee parameters, namelijk RSDr en RSDt. De criteria voor deze parameters is dat deze zijn kleiner moeten zijn dan 20% met een 'bias' van maximaal 20%. Beneden de LOQ is de methode enkel kwalitatief of semi-kwantitatief. Omdat dit project betrekking heeft op de kwantificatie van basische drugs is het niet van belang om de LOD te bepalen [81].

In de praktijk werden beide parameters bepaald met een LOQ staal onafhankelijk van de calibratiecurve (het LOQ staal bevindt zich in een matrix die de reële stalen benadert). Eerst werd de LOQ geschat door een reeks verdunningen te maken rond de gewenste LOQ. Deze geschatte LOQ werd vastgelegd op een concentratie met $S/N > 10$. Na de schatting werden twee LOQ-stalen, met een concentratie gelijk aan 1,4 keer de geschatte LOQ, op acht verschillende dagen worden geanalyseerd. RSDr en RSDt worden nadien bepaald met behulp van een single-factor ANOVA [81].

Een LOQ van 12,5 ng/mL voor amfetamine en MDMA, 2,5 ng/mL voor morfine en MAM en 5ng/mL voor cocaïne en benzoylecgonine is vastgelegd in het kader van de wet van 31 juli 2009 betreffende "de invoering van speekseltesten inzake rijden onder de invloed van drugs". In deze wet wordt de wettelijke grenswaarde van deze drugs gehanteerd (zie tabel 17) [81]. Het LOQ-staal wordt als volgt bereid:

Werkoplossing: zie tabel 5

- WS0 = 1/4 verdunning van 'WS basic drugs saliva UPLC-MS/MS (250µL + 750µL MeOH)
- WS1 = 1/10 verdunning van WS0 (100 µl WS0 + 900 µl MeOH)
- WS2 = 1/5 verdunning van WS1 (200 µl WS1 + 800 µl MeOH)
- WS3 = 1/20 verdunning van WS1 (50,0 µl WS1 + 950 µl MeOH)

Tabel 17: De geschatte LOQ [81]

	Concentratie aan amfetamine en MDMA	Concentratie aan cocaïne en benzoylecgonine	Concentratie aan morfine en MAM	Volume WS3	Volume Interne standaard	Volume Acetaat buffer
LOQ- stalen	12,5 ng/mL	5,00 ng/mL	2,50 ng/mL	50,0 µL	50,0 µL	750µL

3.3.3.5 Carry-over

Storende stoffen afkomstig van stalen die eerder in de run geanalyseerd zijn, kunnen worden overgedragen naar een volgend staal. Dit wordt carry-over genoemd en kan de nauwkeurigheid en precisie van de analyse beïnvloeden. Voor de bepaling van de carry-over werden tien stalen gespiked met een concentratie die vijf keer hoger ligt dan die van de hoogste standaard (zie tabel 18). Na elk staal werd een blanco geanalyseerd die IS bevat [81].

Tabel 18: Concentraties carry-over staal

	Concentratie amfetamine en MDMA	Concentratie cocaïne en benzoylecgonine	Concentratie morfine en MAM
Carry-over staal	25000 ng/mL	10000 ng/mL	5000 ng/mL

De concentratie die gemeten werd in de blanco's mag maximum 20% zijn ten opzichte van de LOQ. Er werd eveneens een CI bepaald rond de gemiddelde van de blanco respons area en het gemiddelde van de LOQ respons area. Deze werden berekend op dezelfde manier als formule 5. De bovengrens van het CI voor de blanco's moeten vijf keer lager liggen dan de ondergrens voor LOQ. Indien aan deze voorwaarde voldaan wordt, kan er gegarandeerd worden dat er geen storende stoffen zijn overgedragen op de blanco's. [81].

3.3.3.6 Matrixeffect

Het matrixeffect (ME) is het optreden van een gewijzigde respons van de analieten door de aanwezigheid van andere stoffen in de biologische matrix. Componenten die samen met de analieten geëluëerd worden, kunnen zo bijvoorbeeld de respons verhogen (ion-enhancement) of verlagen (ion-suppressie). De respons is de ratio van de analiet area op de IS area. De matrixeffecten, die gecompenseerd worden door de IS, worden bepaald door de ratio te nemen van de respons na analyse van een blanco waar de analieten na de extractie worden toegevoegd en de respons van de originele, niet-geëxtraheerde oplossing die dezelfde hoeveelheid analieten bevat [81]. De formule voor de berekening van ME is als volgt:

$$ME_{IS}(\%) = \frac{Response_{Analiet\ na\ extractie\ toegevoegd}}{Response_{Originele\ oplossing\ met\ analiet}} * 100\% \quad (11)$$

Praktisch werden tien controlestalen meegenomen waar de analieten en IS na extractie worden toegevoegd en tien stalen die de originele, niet-geëxtraheerde oplossing bevatten. Dit gebeurde voor verschillende concentratieniveaus: QC_High en QC_Low (zie tabel 16). Er werden steeds telkens minstens twee concentratieniveaus meegenomen voor de bepaling van het matrixeffect. De verschillende stalen werden getest in dezelfde matrix, namelijk ½-speeksel/interceptbuffer. Belangrijk is dat deze matrix die van de reële stalen zo goed mogelijk benadert. In de praktijk werd het matrixeffect samen met de extractie-efficiëntie bepaald. Het matrixeffect moet bij voorkeur lager zijn dan 15% voor ME_{IS} met een RSD ≤ 20% [81].

3.3.3.7 Stabiliteit

Met de stabiliteit wordt voornamelijk gerefereerd naar de stabiliteit van reeds voorbehandelde monsters, de zogenaamde 'processed sampe' stabiliteit. Dit is de stabiliteit van analiet in reeds voorbereide stalen onder analysecondities [81].

Praktisch waren er QC-stalen (zie tabel 11) die meteen geanalyseerd werden, dit waren de controlestalen. Nadien werden QC-stalen geanalyseerd die bewaard waren geweest onder de te testen condities, dit zijn de stabiliteitsstalen. Hiermee werd dan het gemiddelde berekend van elk piekoppervlak van elke component, dus ook van de IS. Dit gebeurde zowel voor de controle stalen als voor de stabiliteitsstalen [81].

Het procentueel verschil tussen het gemiddelde van de stabiliteitsstalen op het gemiddelde van de controle stalen mag niet hoger zijn dan 25%. Dit wordt ook wel de instabiliteit genoemd. Bij een resultaat groter dan 25%, moet er aangetoond worden dat de gevoeligheid gewaarborgd is en de instabiliteit door de IS gewaarborgd wordt zodat er geen probleem optreedt bij de kwantificatie [81].

3.3.3.8 ISR

De ISR moest bepaald worden om na te gaan of de methode effectief bruikbaar is voor reële stalen. Hierbij worden 20 authentieke stalen geanalyseerd met deze nieuwe methode. Het verschil van de resultaten van 67% van de stalen mag niet hoger zijn dan 20% ten opzichte van de resultaten bekomen met de huidige routinemethode [81].

3.3.3.9 Meetonzekerheid

De meetonzekerheid (u) beschrijft de dispersie van de waarden en geeft weer in welke mate de resultaten betrouwbaar zijn. Dit wordt weergegeven met behulp van een interval. Om een idee van de meetonzekerheid te verkrijgen kunnen de validatiegegevens van de interne controles gebruikt worden. Bij inter-laboratoria testen (bekwaamheidstesten) kunnen gegevens van de performantie van de methode gebruikt worden voor de bepaling van de meetonzekerheid [81]. Indien bekwaamheidstesten worden uitgevoerd, kan deze parameter bepaald worden met behulp van volgende formule:

$$u = \sqrt{[u(\text{bPT})]^2 + u(\text{Cref})^2 + u(\text{RSDt})^2} \quad (12)$$

Met:

bPT = Bias berekend uit minimum 5 bekwaamheidstest (PT) resultaten

$$= \sqrt{[(\Sigma (100 \cdot \text{bias}^2 / \text{referentie concentratie})) / (\text{aantal PT})]} \quad (13)$$

$$C_{ref} = [\Sigma((100 \cdot SDPT)/reference\ concentratie)/(aantal\ PT)] / \sqrt{(aantal\ deelnemende\ labs)}$$

RSDt = Relatieve standaarddeviatie van de intermediaire precisie

Als er geen bekwaamheidstesten worden uitgevoerd of deze onvoldoende statistische zekerheid bieden, wordt de meetonzekerheid bepaald op een andere manier. Bij deze methode wordt de meetonzekerheid bepaald als relatieve standaarddeviatie van de intermediaire precisie [81]. Dit gebeurt met behulp van onderstaande formule:

$$RSDt (\%) = \frac{\sqrt{s^2}}{\bar{x}} * 100\% \quad (14)$$

Met:

RSDt = Relatieve standaarddeviatie 'intermediate precision'

$$s^2 = \text{Herhalingsvariantie} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (15)$$

\bar{x} = Gemiddelde van alle bepalingen over tenminste 3 maanden

x_i = Waarde van de i-de meting

n = Aantal metingen

Daarnaast kan ook de uitgebreide meetonzekerheid (U) bepaald worden voor het gewenste significantieniveau [81]. Dit gebeurt als volgt:

$$U = k \times u \quad (16)$$

Met:

U = Globale of uitgebreide meetonzekerheid

k = 'Coverage factor' en is gelijk aan 2 voor een significantieniveau van 95% en tenminste 50 bepalingen; voor minder aantal bepalingen: gebruik de gepaste t- waarde

Indien U bepaald is kan het interval bepaald worden als volgt:

$$Interval = [y \pm U] \quad (17)$$

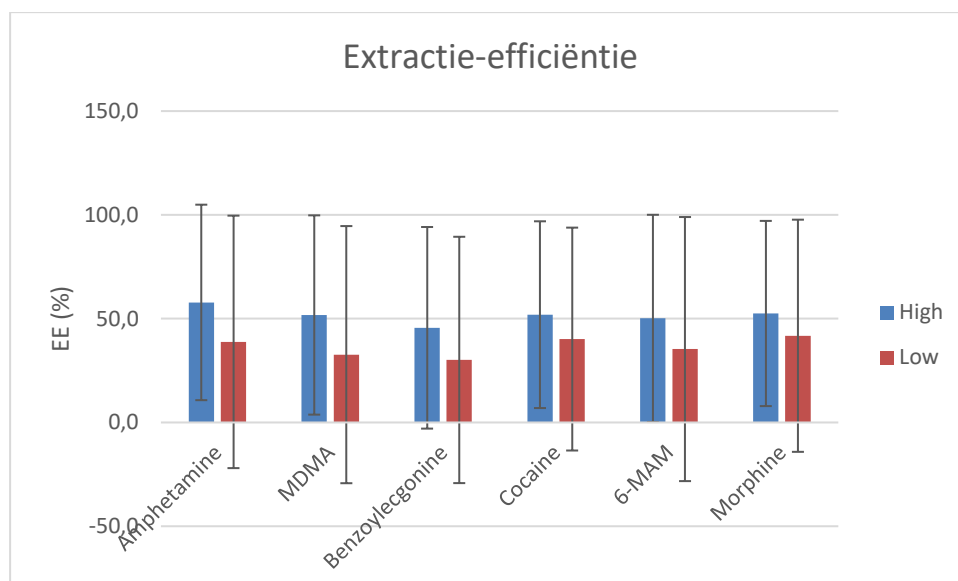
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 Optimalisatie

4.1.1 Extractie-efficiëntie

4.1.1.1 Resultaten

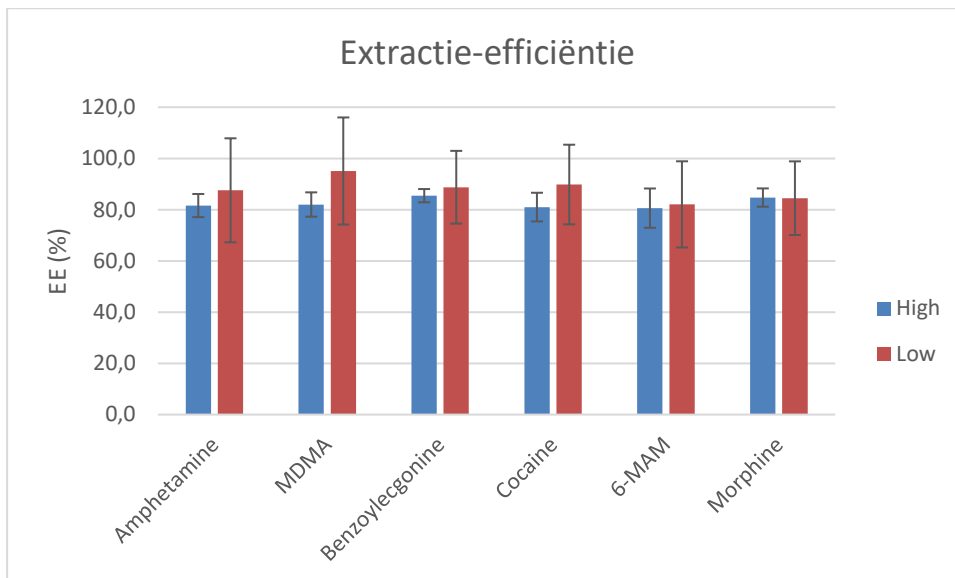
In eerste instantie wordt de extractie-efficiëntie bepaald zoals weergegeven in tabel 15 "initiële wijzigingen protocol". Er worden twee verschillende concentratieniveaus getest namelijk, QC_High en QC_Low. De resultaten worden visueel weergegeven in onderstaande figuren (zie figuur 33) en kunnen worden teruggevonden in bijlage C.



Figuur 33: Extractie-efficiëntie na initiële aanpassingen

De resultaten weergegeven in figuur 33 tonen een duidelijk verschil tussen QC_High en QC_Low. De extractie-efficiëntie ligt hoger bij QC_High. Op dit concentratieniveau bereikt enkel benzoyllecgonine geen extractie-efficiëntie groter of gelijk aan 50%. Voor het QC_Low niveau valt af te leiden dat geen enkel analiet 50% haalt. De foutbalken geven de RSD(%) weer en deze zijn vrij groot voor elk analiet. De RSD voor MAM haalt zelfs een waarde van 63,6%. De mate waarin de waarde van de extractie-efficiëntie verschillend zijn is dus redelijk groot.

Deze resultaten kunnen vergeleken worden met deze weergegeven in figuur 34. Deze zijn uitgevoerd met de aanpassingen weergegeven in tabel 15, "finale wijzigingen protocol". Ook hier worden twee verschillende concentratieniveaus getest namelijk QC_High en QC_Low.



Figuur 34: Extractie-efficiëntie na finale aanpassingen

Uit figuur 34 kan worden afgeleid dat de resultaten voor QC_High schijnbaar lager liggen dan die van QC_Low met uitzondering van morfine. Dit contradicteert de resultaten weergegeven in figuur 34. Dat gezegd zijnde hebben de resultaten voor QC_Low een duidelijk grotere RSD. De extractie-efficiëntie is voor elk analiet, ongeacht concentratieniveau, groter dan 50%. De RSD is voor de meeste analieten lager dan 20%, enkel amfetamine en MDMA voor QC_Low hebben een RSD die groter is (20,3% en 20,9% respectievelijk).

4.1.1.2 Discussie

De extractie-efficiëntie is bij voorkeur groter dan 50%. Voor de resultaten in figuur 33 geldt dit enkel op het QC_High niveau met uitzondering van benzoyllecgonine. Voor QC_Low bereikt geen enkel analiet de kaap van 50% extractie-efficiëntie. In de literatuur worden methodes met een lagere extractie-efficiëntie aanvaard, zolang de analytische limietwaarden bereikt zijn en de waarden reproduceerbaar zijn. De extractie-efficiëntie is reproduceerbaar indien $RSD \leq 20\%$. Zoals kan worden afgeleid uit figuur 33 liggen de RSD's voor elk analiet, ongeacht het concentratie niveau, hoger dan 20%. De resultaten zijn dus onvoldoende reproduceerbaar.

Gezien de resultaten van de extractie-efficiëntie de verwachtingen niet inlossen, wordt er verder gezocht naar een manier om de extractie-efficiëntie te verbeteren. Vermoedelijk bevindt het probleem zich bij de wasstap van de SPE en het drogen met de vacuümpomp. De lage resultaten voor de extractie-efficiëntie kunnen te wijten zijn aan het feit dat de kolommen met de vacuümpomp onvoldoende gedroogd worden, waardoor de waterige fractie niet volledig verwijderd is. De plates van de kolommen zijn dus niet volledig droog te krijgen. Een oplossing voor dit probleem zou zijn om de waterige fractie met meerdere wasstappen met MeOH weg te spoelen. Dit zou echter de monstervoorbereiding langer maken. De eerste wasstap, met HCl, wordt uitgevoerd om de binding van het analiet met het sorptiemiddel te versterken. Dit is echter een waterige fractie. Daarom wordt er na deze stap al gedroogd onder vacuüm om zeker te zijn dat de waterige fractie in de volgende wasstap volledig kan worden weggewassen. Een tweede aanpassing is een verhoging van het elutievolume naar 750 μL om zeker te zijn dat de analieten volledig van de kolom worden geëlueerd. Daarnaast wordt een nieuwe vacuümpomp aangeschaft aangezien de druk van de huidige pomp niet kon worden nagegaan. De resultaten van figuur 34 zijn bekomen met behulp van de nieuwe vacuümpomp. De aanpassingen worden weergegeven in tabel 15.

De resultaten van de extractie-efficiëntie in figuur 34 zijn voor elk analiet ongeacht concentratieniveau groter dan 50%, hetgeen gewenst is. Daarnaast is de RSD voor de meeste analieten lager dan 20%, wat wijst op voldoende reproduceerbaarheid. Er zal met deze aanpassingen op het protocol verder gegaan worden met de bepaling van de overige validatiekarakteristieken.

4.2 Validatie

4.2.1 Selectiviteit

4.2.1.1 Resultaat

De selectiviteit kan worden nagegaan op twee manieren. De eerste manier is om na te gaan of de area's van de blanco's kleiner of gelijk zijn aan 20% van de area's van LOQ. Dit wordt eveneens nagegaan voor de zero stalen. De resultaten worden weergegeven in onderstaande tabel (tabel 19).

Tabel 19: Selectiviteit op basis van %LOQ

Selectiviteit	% van LOQ				
	Blanco	Zero	Grens	Blanco	Zero
Basische drugs					
Amfetamine	38,9	3,50	≤20%?	Niet ok	Ok
MDMA	7,80	1,84	≤20%?	Ok	Ok
Benzoylecgonine	20,0	0,230	≤20%?	Ok	Ok
Cocaïne	55,5	18,9	≤20%?	Niet ok	Ok
MAM	10,1	0,570	≤20%?	Ok	Ok
Morfine	13,2	2,19	≤20%?	Ok	Ok

Uit deze resultaten kan worden afgeleid dat enkel de blanco stalen van amfetamine en cocaïne groter zijn dan 20%. De rest van de blanco stalen en de zero stalen zijn minder dan 20% van LOQ.

De tweede manier om de selectiviteit aan te tonen is om CI's op te stellen. Hierbij is het de bedoeling dat de bovengrens van het CI van de blanco vijf keer lager is dan de ondergrens van het CI van LOQ. De resultaten worden weergegeven in onderstaande tabel (tabel 20).

Tabel 20: Selectiviteit op basis van CI

Selectiviteit	5x Higher CI		Grens	Lower CI LOQ	Blanco	Zero
	Blanco	Zero				
Basische drugs						
Amfetamine	28573	45034	<?	4680	Niet ok	Niet ok
MDMA	9866	17365	<?	4868	Niet ok	Niet ok
Benzoylecgonine	18026	2645	<?	2230	Niet ok	Niet ok
Cocaïne	22485	94860	<?	2709	Niet ok	Niet ok
MAM	2414	1455	<?	1156	Niet ok	Niet ok
Morfine	10323	2645	<?	459	Niet ok	Niet ok

Zoals weergegeven in tabel 20 voldoet geen enkel analiet voor de acceptatiecriteria. Dit geldt voor zowel de blanco stalen als voor de zero stalen.

4.2.1.2 Discussie

Uit de resultaten van %LOQ valt af te leiden dat er enkel noemenswaardige interferenties optreden bij de blanco stalen van amfetamine en cocaïne. De andere blanco's en zero stalen vertonen geen noemenswaardige interferenties. Deze zijn allen lager dan 20%.

De resultaten op basis van CI zijn minder gunstig. Zoals eerder vermeld voldoet hier geen enkel analiet aan de opgelegde acceptatiecriteria en dit voor zowel de blanco's als de zero stalen. Hieruit valt af te leiden dat er toch noemenswaardige interferenties zijn voor zowel de blanco als zero stalen. Dit is vermoedelijk te wijten aan contaminatie die optreedt bij het verdampen van de elutievlloeistof met de vacuümcentrifuge. Dit moet verder nagegaan worden om contaminatie te elimineren.

4.2.2 Lineariteit van de calibratiecurve

4.2.2.1 Resultaat

Eerst wordt er visueel nagegaan welke calibratiemodel er gebruikt zal worden. Dit wordt gedaan door de R^2 en RE (%) van de verschillende modellen te vergelijken voor elk analiet. In functie van de wetgeving werd er uitgegaan van een model met $1/x$. Hierdoor wegen de lagere concentraties zwaarder door bij het opstellen van de curve. Hieruit volgde dat voor elk analiet een kwadratisch model ($y=ax^2+bx+c$) met $1/x$ de beste resultaten gaf met uitzondering van cocaïne. Cocaïne vertoonde betere resultaten bij een lineaire model ($y=ax+b$) met $1/x$. De resultaten van de calibratiecurven kunnen worden teruggevonden in bijlage D.

Nadat de regressiemodellen vastgelegd waren, werd er gecontroleerd op uitschieters met behulp van de Grubbstest. Hierbij mochten de waarden van G_{exp} niet groter zijn dan deze van G_{tabel} namelijk, 2,126. In onderstaande tabel, tabel 21, wordt voor elk analiet weergegeven welk calibratiepunt een uitschieter was voor deze test.

Tabel 21: Resultaten Grubbstest

Basische drugs	Uitschieters			
	Dag	Calibratiepunt	G_{exp}	G_{tabel}
Amfetamine	3	9	2,166	2,126
	3	10	2,424	2,126
MDMA	3	8	2,201	2,126
Benzoylecgonine	/	/	/	2,126
Cocaïne	5	6	2,215	2,126
MAM	/	/	/	2,126
Morfine	2	10	2,264	2,126
	3	8	2,254	2,126

Zoals uit de tabel valt af te leiden, zijn er geen uitschieters voor de curven van benzoylecgonine en MAM. Amfetamine en morfine hebben beide twee uitschieters. De andere analieten, MDMA en cocaïne, vertonen slechts één uitschieter. Er valt op dat er geen twee uitschieters zijn voor eenzelfde concentratieniveau.

Het tweede dat wordt bepaald na vastleggen van de regressiemodellen is of de RE <15% voor calibratoren en RE <20% voor de calibratoren op LOQ niveau. In tabel 22 wordt weergegeven voor welke calibratiepunten dit niet het geval was.

Tabel 22: Resultaten %RE

Basische drugs	Dag	Calibratiepunt	RE (%)	Grenswaarde (%)
Amfetamine	6	1 (LOQ)	-20,6	20,0
	7	1 (LOQ)	-25,0	20,0
MDMA	3	1 (LOQ)	34,9	20,0
Benzoylecgonine	/	/	/	/
Cocaïne	/	/	/	/
MAM	4	1 (LOQ)	49,2	20,0
	4	5	-24,3	15,0
	5	3	15,7	15,0
	6	7	-15,0	15,0
Morfine	/	/	/	/

Uit tabel 22 wordt afgeleid dat op niveau van LOQ het vaakst afwijking waargenomen wordt op de RE. Voor MAM worden er zelfs vier calibratiepunten waargenomen met een RE groter als de opgelegde acceptatiecriteria. Voor benzoylecgonine, cocaïne en morfine worden er geen RE's waargenomen die groter zijn dan de opgelegde criteria.

Hierna wordt er gekeken naar de gemiddelde R^2 van de calibratiecurven. Deze moet resulteren in een waarde groter dan 0,995. De resultaten worden weergegeven in tabel 23.

Tabel 23: Gemiddelde R^2 voor elke calibratiecurve

Basische drugs	R^2 gemiddeld
Amfetamine	0,9985
MDMA	0,9986
Benzoylecgonine	0,9988
Cocaïne	0,9989
MAM	0,9977
Morfine	0,9989

De gekozen regressiemodellen resulteerde voor ieder analiet in een gemiddelde $R^2 > 0,995$. Dit bevestigt dat de gekozen regressiemodellen inderdaad correct zijn.

Als laatste wordt er nagegaan of de coëfficiënten reproduceerbaar zijn. Dit gebeurt aan de hand van de RSD. Deze moet kleiner of gelijk zijn aan 15%. Voor de kwadratische modellen werd dit nagegaan voor zowel coëfficiënt a als b. Bij het lineaire model van cocaïne gebeurde dit enkel voor de richtingscoëfficiënt a. Resultaten zijn weergegeven in tabel 24.

Tabel 24: Relatieve standaard deviatie van de coëfficiënten

Basische drugs	RSD (%)	
	a	b
Amfetamine	-17,6	6,24
MDMA	-67,8	7,45
Benzoylecgonine	-74,3	53,1
Cocaïne	2,56	/
MAM	-175	13,0
Morfine	-682	4,88

Uit tabel 24 is af te leiden dat coëfficiënt a weinig reproduceerbaar is. Enkel bij het lineaire model van cocaïne blijft de RSD hier onder de 15%. De reproduceerbaarheid van coëfficiënt b is beter als die van a. Enkel bij benzoylecgonine is deze groter dan 15%.

4.2.2.2 Discussie

Uit bovenstaande resultaten volgt dat de lineariteit van de calibratiecurve niet volledig voldoet aan de acceptatiecriteria. Enerzijds zijn er geen twee uitschieters voor hetzelfde concentratieniveau en zijn de R^2 'en gemiddeld groter dan 0,995 voor elk analiet. Anderzijds is de RE niet voor elk punt van de calibratie kleiner dan 15% (20% indien LOQ niveau). Indien de waarde van RE negatief is, wijst dit op een experimentele waarde die lager is dan de nominale waarde. Wanneer een positieve RE bekomen wordt, wijst dit op een experimentele waarde die groter is dan de nominale. Dit kan wijzen op eventuele contaminatie op het LOQ niveau. Voor de andere concentraties is dit eerder te wijten aan problemen met het toestel. Daarnaast is de coëfficiënt a weinig reproduceerbaar met een RSD tot zelfs -682% voor morfine. Dit kan eveneens verklaard worden doordat er mogelijk problemen zijn met het toestel waardoor er op basis van de lineariteit verder geoptimaliseerd dient te worden. Coëfficiënt b was, voor de meeste analieten, wel goed reproduceerbaar.

4.2.3 Accuraatheid

4.2.3.1 Resultaat

De accuraatheid wordt bepaald aan de hand van de 'bias', herhaalbaarheid (RSD_r) en intermediaire precisie (RSD_t). De waarde van de 'bias' moet binnen het interval van $\pm 15\%$ liggen. Daarnaast moet RSD_r en RSD_t kleiner of gelijk zijn aan 15 %. Dit werd uitgevoerd voor de drie concentratieniveaus. De resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabellen. Tabel 25 geeft de resultaten van QC_Low weer, tabel 26 die van QC_Med en tabel 27 die van QC_High.

Tabel 25: Accuraatheid QC_Low

Accuraatheid	QC_Low		
	Bias (%)	RSD_r (%)	RSD_t (%)
Basische drugs			
Amfetamine	6,82	2,51	7,99
MDMA	8,39	7,42	9,84
Benzoylecgonine	10,3	5,04	8,47
Cocaïne	9,65	6,27	7,79
MAM	1,88	7,80	8,93
Morfine	10,5	5,21	5,21

Tabel 26: Accuraatheid QC_Med

Accuraatheid	QC_Med		
	Bias (%)	RSD _r (%)	RSD _(t) (%)
Basische drugs			
Amfetamine	11,4	6,80	6,81
MDMA	4,69	5,47	5,47
Benzoylecgonine	6,55	6,27	6,48
Cocaïne	8,9	7,27	7,27
MAM	-0,275	9,65	9,65
Morfine	6,95	5,77	8,71

Tabel 27: Accuraatheid QC_High

Accuraatheid	QC_High		
	Bias (%)	RSD _r (%)	RSD _(t) (%)
Basische drugs			
Amfetamine	6,97	5,16	6,79
MDMA	3,89	5,62	8,28
Benzoylecgonine	3,00	2,32	4,24
Cocaïne	5,61	5,06	7,90
MAM	-3,23	5,25	13,17
Morfine	-0,15	5,84	8,43

Uit bovenstaande tabellen kan worden afgeleid dat elk analiet, ongeacht concentratieniveau, voldoet aan de acceptatiecriteria. De waarde van de 'bias' ligt binnen het interval van $\pm 15\%$ voor elk analiet en voor elke concentratie. RSD_r en RSD_t zijn kleiner of gelijk zijn aan 15 % voor elk analiet ongeacht concentratieniveau.

4.2.3.2 Discussie

De resultaten van de accuraatheid voldoen volledig aan de acceptatiecriteria. Hieruit volgt dat er geen afwijkingen op de accuraatheid veroorzaakt worden door systematische ('bias') en random fouten. Er zit slechts een kleine graad van spreiding op de waarden op vlak van herhaalbaarheid en intermediaire precisie.

4.2.4 Analytische grenzen

4.2.4.1 Resultaat

Zoals eerder vermeld is de analytische grens die bepaald wordt de LOQ. Deze wordt bepaald op een gelijkaardige manier als de accuraatheid. Het verschil zit hier in de acceptatiecriteria. De 'bias' moet hier binnen het interval van $\pm 20\%$ liggen. RSD_r en RSD_t moeten kleiner of gelijk zijn aan 20%. De resultaten worden weergegeven in tabel 28.

Tabel 28: Precisie en 'bias' voor de bepaling van LOQ

Analytische grenzen	LOQ		
	Bias (%)	RSD _r (%)	RSD(t) (%)
Basische drugs			
Amfetamine	90,6	170	172
MDMA	92,8	161	161
Benzoylecgonine	91,6	161	161,
Cocaïne	115	174	174
MAM	111	178	178
Morfine	99,2	148	151

Uit tabel 24 kan worden afgeleid dat de 'bias' ver buiten het interval van 20% ligt voor elk analiet. De grootste 'bias' wordt behaald door cocaïne met een waarde van 115%. Hetzelfde geldt voor RSD_r en RSD_t waarvoor de waarde ver boven de 20% liggen.

4.2.4.2 Discussie

Uit de resultaten voor de LOQ kan worden afgeleid dat de acceptatiecriteria niet behaald worden. Dit is vermoedelijk te wijten aan contaminatie. Vermoedelijk vindt de contaminatie plaats tijdens het droogdampen in de vacuümcentrifuge. Hierbij kan een te hoge temperatuur mee aan de oorsprong liggen. Er moet hier ook vermeld worden dat de gevoeligheid van de detectietechniek die gebruikt wordt voor bepaalde componenten aan de limiet zit. Om dit op te lossen is verdere optimalisatie nodig. De bepaling van de LOQ zal in de toekomst dus opnieuw moeten worden uitgevoerd na verdere optimalisatie en eliminatie van de contaminatiebron.

4.2.5 Carry-over

4.2.5.1 Resultaat

Carry-over kan worden nagegaan op twee manieren, namelijk op basis van %LOQ, en op basis van de CI. Hierbij is het belangrijk dat de area's van de blanco's kleiner of gelijk zijn aan 20% van de area's van LOQ. Bij de methode met de CI's is het de bedoeling dat de bovengrens van het CI van de blanco vijf keer lager is dan de ondergrens van het CI van LOQ. De resultaten worden weergegeven in onderstaande tabellen (tabel 29 en tabel 30).

Tabel 29: Carry-over met behulp van %LOQ

Carry-over	% van LOQ		
	Blanco	Grens	Blanco
Basische drugs			
Amfetamine	0,00	≤20%?	Ok
MDMA	3,72	≤20%?	Ok
Benzoylecgonine	1,33	≤20%?	Ok
Cocaïne	13,7	≤20%?	Ok
MAM	3,58	≤20%?	Ok
Morfine	5,25	≤20%?	Ok

Uit tabel 29 kan worden afgeleid dat de area van de blanco's kleiner zijn dan 20% van de area's van LOQ voor elk analiet. Aan dit acceptatiecriterium wordt dus voldaan.

Tabel 30: Carry-over met behulp van CI

Carry-over	5x Higher CI Blanco	Grens	Lower CI LOQ	Blanco
Basische drugs				
Amfetamine	0,00	<?	338	Ok
MDMA	2472	<?	4183	Ok
Benzoylecgonine	939	<?	916	Niet ok
Cocaïne	4008	<?	2196	Niet ok
MAM	543	<?	1190	Ok
Morfine	372	<?	371	Niet ok

In tabel 30 is te zien dat de bovengrens van de CI van de blanco's vijf keer lager is dan de ondergrens van het CI van LOQ voor de analieten: Amfetamine, MDMA en MAM. Dit acceptatiecriterium wordt niet gehaald door benzoylecgonine, cocaïne en morfine.

4.2.5.2 Discussie

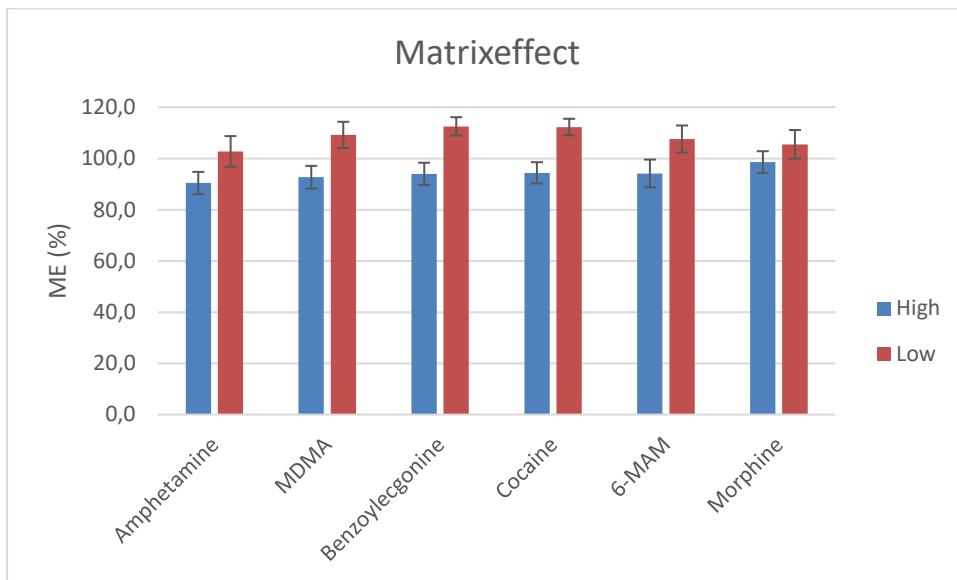
Carry-over wordt veroorzaakt door contaminatie afkomstig van een staal dat eerder in een run geanalyseerd wordt. Op basis van percentage van LOQ kan worden afgeleid dat er geen significante contaminatie aanwezig is van eerdere stalen die de resultaten kunnen beïnvloeden. Dit kan echter niet gezegd worden op basis van CI.

Op basis van de bepaling met CI's kan er gesproken worden van zulke contaminatie bij benzoylecgonine, cocaïne en morfine. Hieruit volgt dat de resultaten van deze analieten mogelijks beïnvloed worden door de carry-over op vlak van nauwkeurigheid en precisie. Wat belangrijk is om carry-over tegen te gaan, is het gebruik van de juiste spoelvloeistof voor de naald. In de toekomst kan verder nagegaan worden of betere spoelvloeistof een verschil kan maken op de resultaten van benzoylecgonine, cocaïne en morfine.

4.2.6 Matrixeffect

4.2.6.1 Resultaten

Het matrixeffect wordt, in de praktijk, simultaan bepaald met de extractie-efficiëntie en moet bij voorkeur lager zijn dan 15% na correctie door de IS. De resultaten worden visueel weergegeven in figuur 35 en kunnen worden teruggevonden in bijlage E.



Figuur 35: Matrixeffect op hoog en laag concentratieniveau

Uit de figuur kan worden afgeleid dat het matrixeffect voor QC_High tussen 80% en 100% liggen voor elk analiet. Hoe dichterbij 100% ligt, hoe beter. Dit duidt op de afwezigheid van ion-suppressie of ion-enhancement. Op het QC_Low niveau liggen de percentages boven de 100% voor elk analiet, maar in geen enkel geval boven de 120% ME. Daarnaast kan er worden afgeleid dat het concentratieniveau een invloed heeft op het resultaat. Bij het hogere concentratieniveau, QC_High, liggen de percentages onder de 100% terwijl de resultaten bij QC_Low boven 100% liggen.

4.2.6.2 Discussie

Het matrixeffect is bij voorkeur lager dan 15% voor elk analiet indien gecompenseerd wordt door de IS. De bekomen resultaten voldoen aan dit acceptatiecriterium voor beide concentratieniveaus. Daarnaast kan er worden afgeleid dat voor QC_High er eerder sprake is van ion-suppressie en bij QC_Low van ion-enhancement.

4.2.7 Stabiliteit

De stabiliteit kon niet worden bepaald wegens tijdsnood. Deze zal in de toekomst nog moeten worden uitgevoerd.

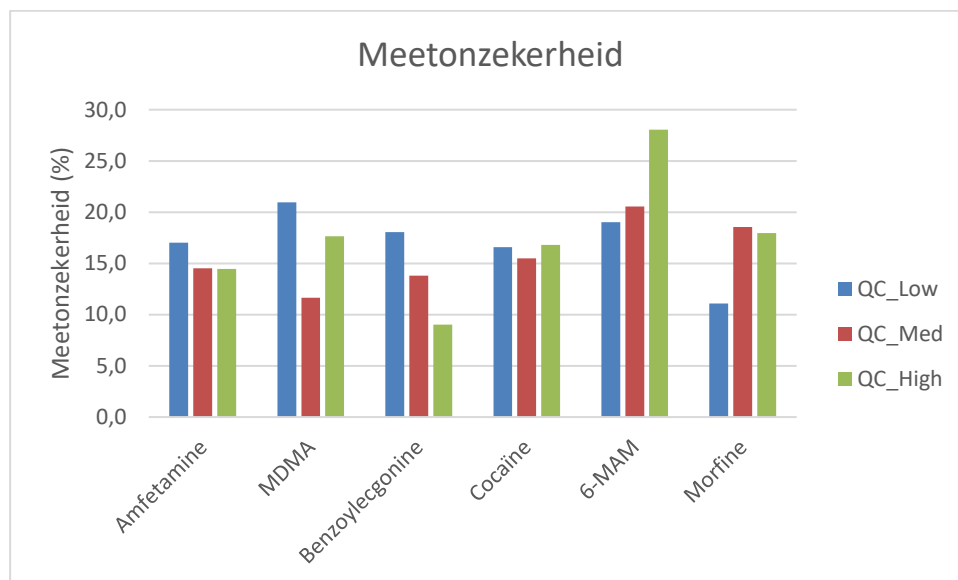
4.2.8 ISR

Evenals de stabiliteit kon de ISR niet worden uitgevoerd wegens tijdsnood. Deze zal in de toekomst nog moeten worden uitgevoerd.

4.2.9 Meetonzekerheid

4.2.9.1 Resultaat

De meetonzekerheid die hieronder wordt weergegeven is bepaald via de validatiedata. De meetonzekerheid U wordt hier berekend door de 'coverage factor' te vermenigvuldigen met de RSD_t . Dit gebeurt voor verschillende concentratieniveaus. De resultaten worden visueel weergegeven in onderstaande figuur (zie figuur 39) en kunnen worden teruggevonden in bijlage F.



Figuur 36: Resultaat meetonzekerheid

Uit figuur 36 kan worden afgeleid dat de meetonzekerheid varieert tussen de verschillende concentratieniveaus. Voor QC_Low varieert de meetonzekerheid tussen 11,1% voor morfine en 21,0% voor MDMA. Bij QC_Med varieert de meetonzekerheid tussen 11,7% voor MDMA en 20,5% voor MAM. Als laatste varieert de meetonzekerheid bij QC_High tussen 9,03% voor benzoylecgonine en 28,1% voor MAM.

4.2.9.2 Discussie

De meetonzekerheid geeft weer in welke mate een resultaat betrouwbaar is. De grootste meetonzekerheid wordt waargenomen voor MAM op het hoge concentratieniveau. De resultaten van dit analiet zijn dus het minst betrouwbaar. De laagste meetonzekerheid wordt eveneens bekomen op het hoge concentratieniveau voor benzoylecgonine. Hieruit kan worden afgeleid dat deze resultaten het meest betrouwbaar zijn.

5 BESLUIT

Het doel van dit project is om na te gaan of de huidige analysemethode kan worden aangepast om het aantal stalen dat per keer kan worden verwerkt te verhogen. Dit wordt bekomen door de huidige extractiekolommen, Oasis[®] MCX 3cc 30 µm (60 mg), te vervangen door de Oasis[®] MCX 96-well platen 30 µm (30 mg). Uit de eerste tests bleek dat het mogelijk was om deze extractiekolommen te vervangen. Hierna is overgegaan naar de optimalisatie met behulp van de extractie-efficiëntie. Na optimalisatie wordt er verder gevalideerd om na te gaan of de aangepaste methode eveneens voldoet aan de opgelegde acceptatiecriteria van de methodevalidatie.

De aanpassingen die worden doorgevoerd zijn een extra droogstap na toevoeging van 1 mL HCl en een verhoging van het elutievolume tot 750µL. Daarnaast heeft de nieuwe vacuümpomp ook zijn bijdrage geleverd bij het halen van een goede extractie-efficiëntie. Bij de methodevalidatie voldoen enkel de accuraatheid en het matrixeffect volledig aan de acceptatiecriteria. De andere validatiekarakteristieken voldoen niet of slechts gedeeltelijk aan de criteria. De selectiviteit vertoont noemenswaardige interferenties voor zowel blanco als zero stalen indien bepaald op basis van CI. Indien bepaald met het percentage van LOQ zijn er enkel interferenties bij amfetamine en cocaïne. Deze interferenties zijn mogelijks afkomstig van contaminaties ter hoogte van de vacuümcentrifuge. De lineariteit vertoont goede waarde op vlak van uitschieters en R^2 , maar niet voor RE(%) en reproduceerbaarheid van de coëfficiënten. Dit kan duiden op contaminatie op LOQ niveau en eventueel problemen met het gebruikte analysetoestel. Bij de bepaling van de LOQ is er mogelijks sprake van contaminatie, vermoedelijk ter hoogte van de vacuümcentrifuge. Voor de carry-over is er op basis van het percentage van LOQ geen significante contaminatie door eerdere stalen. Op basis van het CI is er wel contaminatie aanwezig van vorige stalen voor benzoylecgonine, cocaïne en morfine. Als laatste is de meetonzekerheid, op basis van de validatie, het grootst bij MAM op QC_High en het laagst voor benzoylecgonine op ditzelfde concentratieniveau.

Naar de toekomst toe moet de stabiliteit en ISR zeker nog worden uitgevoerd. Voor de selectiviteit moet er verder nagegaan worden of er effectief contaminatie optreedt ter hoogte van de vacuümcentrifuge. Op basis van de resultaten van de lineariteit is er een vermoeden van problemen met het analysetoestel. Daarom moet de methode verder geoptimaliseerd worden met behulp van deze validatiekarakteristiek. De bepaling van LOQ moet opnieuw worden uitgevoerd wanneer de bron van de contaminatie (vermoedelijk de vacuümcentrifuge) geëlimineerd is en de methode verder geoptimaliseerd. De carry-over kan tegen gegaan worden door de juiste spoelvoelstof te gebruiken voor de naald. Dit kan in de toekomst een verschil maken voor benzoylecgonine, cocaïne en morfine. Voordat de nieuwe kolommen effectief gebruikt kunnen worden voor de analyse van basische drugs in speeksel, moet er dus nog verder gevalideerd worden. Dit betekent ook dat er eventueel nieuwe aanpassingen op de analysemethode nodig zijn.

LITERATUURLIJST

- [1]"Onderzoek en ontwikkeling", *nicc.fgov.be*. [Online]. Available: <https://nicc.fgov.be/onderzoek-en-ontwikkeling>. [Accessed: 24- Mar- 2020].
- [2]V. Di Fazio, S. Wille, S. Toennes, J. van Wel, J. Ramaekers and N. Samyn, "Driving under the influence of cocaine: Quantitative determination of basic drugs in oral fluid obtained during roadside controls and a controlled study with cocaine users", *deepdyve*, 2018. [Online]. Available: <https://www.deepdyve.com/lp/wiley/driving-under-the-influence-of-cocaine-quantitative-determination-of-v1AB33PD83>. [Accessed: 30- Mar- 2020].
- [3]U. Meesmann and S. Boets, "Rijden onder invloed van alcohol en drugs. Resultaten van de driejaarlijkse attitudemeting over verkeersveiligheid van het BIVV.", *Ibsr.be*, 2014. [Online]. Available: <http://www.ibsr.be/publications/Rijden%20onder%20invloed%20van%20alcohol%20en%20drugs/Rijden%20onder%20invloed%20van%20alcohol%20en%20drugs%20-%20Attitudemeting%20over%20verkeersveiligheid.pdf>. [Accessed: 02- Apr- 2020].
- [4]"Wat u moet weten over forensisch toxicologisch onderzoek", *Nicc.fgov.be*. [Online]. Available: https://nicc.fgov.be/upload/images/OverhetNICC/2016_11_wat_u_moet_weten_over_forensisch_toxicologisch_onderzoek.pdf. [Accessed: 13- Mar- 2020].
- [5]*Belgisch staatsblad*, 2nd ed. Brussel: Belgisch staatsblad.
- [6]S. Wille and V. Di Fazio, "SPEEKSELANALYSES BIJ RIJDEN ONDER INVLOED VAN DRUGS", *Nicc.fgov.be*, 2019. [Online]. Available: https://nicc.fgov.be/upload/images/OverhetNICC/2019_05_speekselanalyse_bij_rijden_onder_invloed_van_drugs.pdf. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [7]"Oasis MCX 3 cc Vac Cartridge, 60 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm, 100/pk", *Waters.com*, 2020. [Online]. Available: <https://www.waters.com/nextgen/th/en/shop/sample-preparation--filtration/186000254-oasis-mcx-3-cc-vac-cartridge-60-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-1.html>. [Accessed: 25- Mar- 2020].
- [8]K. Craven, "Making UPLC/MS Accessible Through MassLynx Software", *Gimitec.com*, 2011. [Online]. Available: <https://gimitec.com/file/720004087en.pdf>. [Accessed: 25- Mar- 2020].
- [9]"Oasis MCX 96-well Plate, 30 mg Sorbent per Well, 30 µm, 1/pk", *Waters.com*. [Online]. Available: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000248-oasis-mcx-96-well-plate-30-mg-sorbent-per-well-30--m-1-pk.html>. [Accessed: 09- Mar- 2020].
- [10]P. Boel, G. De Boeck, I. Buys, L. Sartorius, D. Jordens and O. Leroux, *Handboek forensisch onderzoek*, 2nd ed. Brussel: Politeia, 2019, pp. 225-250.
- [11]"Criminology vs. Criminalistics: What's the Difference?", *Study.com*, 2018. [Online]. Available: https://study.com/articles/Criminology_vs_Criminalistics_Whats_the_Difference.html. [Accessed: 10- Mar- 2020].

- [12]"Wat u moet weten over forensisch toxicologisch onderzoek", *Nicc.fgov.be*. [Online]. Available: https://nicc.fgov.be/upload/images/OverhetNICC/2016_11_wat_u_moet_weten_over_forensisch_toxicologisch_onderzoek.pdf. [Accessed: 13- Mar- 2020].
- [13]"Wat zijn bijwerkingen van geneesmiddelen? | Apotheek.be", *Apotheek.be*, 2017. [Online]. Available: <https://www.apotheek.be/geneesmiddelen/voordelen-risicos/wat-zijn-bijwerkingen-van-geneesmiddelen>. [Accessed: 19- Mar- 2020].
- [14]F. Musshoff, U. M. Stamer and M. Burkhard, "Pharmacogenetics and forensic toxicology", *Www-sciencedirect-com.kuleuven.ezproxy.kuleuven.be*, 2010. [Online]. Available: <https://www-sciencedirect-com.kuleuven.ezproxy.kuleuven.be/science/article/pii/S037907381000349X>. [Accessed: 13- Mar- 2020].
- [15]E. Ruysinckx, *Toxicologie*. Brussel: NICC, 2019.
- [16]"Toxicologie", *nicc.fgov.be*, 2013. [Online]. Available: <https://nicc.fgov.be/toxicologie>. [Accessed: 19- Mar- 2020].
- [17]*Belgisch staatsblad*, 2nd ed. Brussel: Belgisch staatsblad.
- [18] K. Geens, *Ministerieel besluit houdende uitvoering van de artikelen 12 en 13 van het KB van 27 november 2015 tot uitvoering van de wet betreffende de politie over het wegverkeer, gecoördineerd op 16 maart 1968, wat betreft de speekselanalyse en de bloedproef bij het sturen onder invloed van bepaalde psychotrope stoffen en de erkenning van de laboratoria*. Brussel: Federale Overheidsdienst Justitie, 2018.
- [19]S. Wille and V. Di Fazio, "SPEEKSELANALYSES BIJ RIJDEN ONDER INVLOED VAN DRUGS", *Nicc.fgov.be*, 2019. [Online]. Available: https://nicc.fgov.be/upload/images/OverhetNICC/2019_05_speekselanalyse_bij_rijden_onder_invloed_van_drugs.pdf. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [20]"Drugs algemeen", *Drugsinfo.nl*, 2018. [Online]. Available: <https://www.drugsinfo.nl/publiek/drugs-abc/middel/?id=1>. [Accessed: 03- Apr- 2020].
- [21]"Wat zijn drugs? | Druglijn.be", *Druglijn.be*, 2015. [Online]. Available: <https://www.druglijn.be/drugs-abc/wat-zijn-drugs>. [Accessed: 03- Apr- 2020].
- [22]L. Thomassen, *Methodiek van Organische synthese*. Hasselt: U Hasselt/K.U.Leuven, 2019.
- [23]R. Verpoorte, "ALKALOIDS | Liquid Chromatography", *Sciencedirect*, 2000. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/alkaloid>. [Accessed: 10- Apr- 2020].
- [24]"Opium Poppy (Papaver Somniferum)", *Flickr*, 2010. [Online]. Available: <https://www.flickr.com/photos/farmerdodds/4781859785>. [Accessed: 19- Mar- 2020].
- [25]"Human Metabolome Database: Showing metabocard for 6-Acetylmorphine (HMDB0041812)", *Hmdb.ca*, 2012. [Online]. Available: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0041812>. [Accessed: 26- Mar- 2020].
- [26]"DrugBank", *Drugbank.ca*. [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/>. [Accessed: 26- Mar- 2020].
- [27]H. Claeys, "Speed, amfetamine, hoe wordt het gebruikt", *Drughulp.be*. [Online]. Available: <https://www.drughulp.be/speed-wat-en-hoe>. [Accessed: 02- Mar- 2020].

- [28]"Het Drugsinfoteam geeft persoonlijk advies aan gebruikers van partydrugs zoals xtc, speed en cannabis.", *Drugsinfoteam*, 2017. [Online]. Available: <https://www.drugsinfoteam.nl/drugsinfo/speed/speed-feiten>. [Accessed: 12- Mar- 2020].
- [29]"Metamfetamine - Encyclopedie - Azarius", *Azarius.nl*, 2010. [Online]. Available: <https://azarius.nl/encyclopedia/41/Methamphetamine/>. [Accessed: 19- Mar- 2020].
- [30]"The Difference Between Methamphetamine and Amphetamine - The Cabin", *The Cabin Chiang Mai*, 2012. [Online]. Available: <https://www.thecabinchiangmai.com/blog/the-difference-between-methamphetamine-and-amphetamine/>. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [31]"Amfetamine - Encyclopedie - Azarius", *Azarius.nl*, 2017. [Online]. Available: <https://azarius.nl/encyclopedia/112/amphetamine/>. [Accessed: 19- Mar- 2020].
- [32]"Methamfetamine - Drugs & Meer", *Doktermolly.nl*, 2018. [Online]. Available: <http://www.doktermolly.nl/index.php/informatie/methamfetamine.html>. [Accessed: 19- Mar- 2020].
- [33]"Informatie over xtc | Druglijn.be", *Druglijn.be*, 2015. [Online]. Available: <https://www.druglijn.be/drugs-abc/xtc>. [Accessed: 03- Apr- 2020].
- [34]"Bas Blij - MDMA", *Basblij.nl*. [Online]. Available: <http://www.basblij.nl/mdma.html>. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [35]"Coca plant (Erythroxylum) | Wapwinkel", *Wapwinkel.com*, 2019. [Online]. Available: <https://www.wapwinkel.com/coca-plant-erythroxylum.html>. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [36]"Informatie over cocaïne | Druglijn.be", *Druglijn.be*. [Online]. Available: <https://www.druglijn.be/drugs-abc/cocaine>. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [37]A. Lebedev, "De chemische structuurformules van sommige drugs heroïne, morfine, cocaïne, amfetamine, methamfetamine, ecstasy, dob, lsd, modafinil, tetrahydrocannabinol, nicotine, cafeïne, 2d illustratie, vector, geïsoleerd op wit", *123RF*.
- [38]F. Smit, S. Koopmans and J. Yska, "Gecombineerde analysemethoden voor de routinematige bepaling van cocaïne en benzoylecgonine in cocaïne oplossingen.", *Nvkfaz.nl*. [Online]. Available: <http://nvkfaz.nl/assets/files/extract/203.pdf>. [Accessed: 13- Mar- 2020].
- [39]E. T. Shimomura and P. B. Dev, "Benzoylecgonine - an overview | ScienceDirect Topics", *Sciencedirect.com*, 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/benzoylecgonine>. [Accessed: 13- Mar- 2020].
- [40]"UDT_Morphine", *Alcala Pharmaceutical Inc.* [Online]. Available: https://ourpharmacompanytestsite.weebly.com/udt_morphine.html. [Accessed: 12- Mar- 2020].
- [41]"Heroïne - Encyclopedie - Azarius", *Azarius.nl*. [Online]. Available: <https://azarius.nl/encyclopedia/105/hero-ne/>. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [42]"Twaalf jaar cel voor minstens 211 kilo heroïne", *Focus en WTV*, 2018. [Online]. Available: <https://www.focus-wtv.be/nieuws/twaalf-jaar-cel-voor-minstens-211-kilo-hero%C3%AFne>. [Accessed: 20- Mar- 2020].

- [43]H. Kinable and G. Verstuyf, "Dossier-Heroïne", *Vad.be*, 2010. [Online]. Available: <https://www.vad.be/assets/dossier-heroine>. [Accessed: 11- Mar- 2020].
- [44]G. Williams, "Science Source - Morphine, molecular model", *Sciencesource.com*, 2018. [Online]. Available: <https://www.sciencesource.com/archive/Morphine--molecular-model-SS21030468.html>. [Accessed: 16- Mar- 2020].
- [45]"6-Monoacetylmorphine - an overview | ScienceDirect Topics", *Sciencedirect.com*. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/6-monoacetylmorphine>. [Accessed: 06- Apr- 2020].
- [46]"6-Monoacetylmorphine", *En.wikipedia.org*, 2019. [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/6-Monoacetylmorphine>. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [47]"dreamstime", *Dreamstime*. [Online]. Available: <https://nl.dreamstime.com/stock-afbeelding-structurele-formule-van-methadon-image22477311>. [Accessed: 20- Mar- 2020].
- [48]V. Di Fazio, S. Wille, S. Toennes, J. van Wel, J. Ramaekers and N. Samyn, "Driving under the influence of cocaine: Quantitative determination of basic drugs in oral fluid obtained during roadside controls and a controlled study with cocaine users", *deepdyve*, 2018. [Online]. Available: <https://www.deepdyve.com/lp/wiley/driving-under-the-influence-of-cocaine-quantitative-determination-of-v1AB33PD83>. [Accessed: 30- Mar- 2020].
- [49]*Belgisch staatsblad*, 2nd ed. Brussel: Belgisch staatsblad.
- [50]U. Meesmann and S. Boets, "Rijden onder invloed van alcohol en drugs. Resultaten van de driejaarlijkse attitudemeting over verkeersveiligheid van het BIVV.", *Ibsr.be*, 2014. [Online]. Available: <http://www.ibsr.be/publications/Rijden%20onder%20invloed%20van%20alcohol%20en%20drugs/Rijden%20onder%20invloed%20van%20alcohol%20en%20drugs%20-%20Attitudemeting%20over%20verkeersveiligheid.pdf>. [Accessed: 02- Apr- 2020].
- [51]K. Geens, *Ministerieel besluit houdende uitvoering van de artikelen 12 en 13 van het KB van 27 november 2015 tot uitvoering van de wet betreffende de politie over het wegverkeer, gecoördineerd op 16 maart 1968, wat betreft de speekselanalyse en de bloedproef bij het sturen onder invloed van bepaalde psychotrope stoffen en de erkenning van de laboratoria*. Brussel: Federale Overheidsdienst Justitie, 2018.
- [52]W. Lambert, "forensische toxicologie", *Toxicologie.ugent.be*, 2008. [Online]. Available: <http://www.toxicologie.ugent.be/forensische%20toxicologie.htm>. [Accessed: 07- Apr- 2020].
- [53]"Isotope data for deuterium in the Periodic Table", *Periodictable.com*. [Online]. Available: <https://periodictable.com/Isotopes/001.2/index2.full.dm.html>. [Accessed: 07- Apr- 2020].
- [54]"Internal Standards", *Web.archive.org*, 2008. [Online]. Available: <https://web.archive.org/web/20080620143152/http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/int-std.htm>. [Accessed: 08- Apr- 2020].
- [55]"Deuterium a precious gift from the big bang", *Iter.org*, 2011. [Online]. Available: <https://www.iter.org/newsline/singleprint/-/631>. [Accessed: 07- Apr- 2020].
- [56]"3. EXTRACTIES 3.1. VLOEISTOF-VLOEISTOF EXTRACTIE - PDF Free Download", *Docplayer.nl*. [Online]. Available: <https://docplayer.nl/12286470-3-extracties-3-1-vloeistof-vloeistof-extractie.html>. [Accessed: 15- Apr- 2020].

- [57]F. Degel, "Comparison of new solid-phase extraction methods for chromatographic identification of drugs in clinical toxicological analysis", *sciencedirect.com*, 1996. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912096000963>. [Accessed: 15- Apr- 2020].
- [58]"TOXI-LAB Product catalog: The changing colors of drug identification", *bio-asia.com*, 2003. [Online]. Available: http://www.bio-asia.com/drupal/sites/default/files/toxi-lab_product_catalog_email-new2009.pdf. [Accessed: 16- Apr- 2020].
- [59]M. Van Rumst, *Scheidingsmethoden*. Geel: Thomas More, 2015.
- [60]M. Hennion, "Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, vol. 856, no. 1-2, pp. 3-54, 1999. Available: <https://www-sciencedirect-com.kuleuven.ezproxy.kuleuven.be/science/article/pii/S0021967399008328>. [Accessed 6 March 2020].
- [61]"Oasis MCX 96-well Plate, 30 mg Sorbent per Well, 30 μ m, 1/pk", *Waters.com*. [Online]. Available: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000248-oasis-mcx-96-well-plate-30-mg-sorbent-per-well-30--m-1-pk.html>. [Accessed: 09- Mar- 2020].
- [62]"mlochemie", *Mlochemie.nl*, 2020. [Online]. Available: <https://www.mlochemie.nl/index.php/component/content/article?id=102&Itemid=283>. [Accessed: 16- Apr- 2020].
- [63]"Theorie: gaschromatograaf", *Technologie Carolus*. [Online]. Available: <https://technologiecarolus.weebly.com/theorie-gaschromatograaf.html>. [Accessed: 16- Apr- 2020].
- [64]M. Sithersingh and N. Snow, "Headspace-Gas Chromatography", *Sciencedirect.com*, 2012. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/headspace-gas-chromatography>. [Accessed: 16- Apr- 2020].
- [65]"What is the Difference Between UHPLC and UPLC?", *Chromatography Today*, 2020. [Online]. Available: <https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/what-is-the-difference-between-uhplc-and-uplc/30754>. [Accessed: 09- Mar- 2020].
- [66]"UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography Beginner's Guide : Waters", *Waters.com*. [Online]. Available: https://www.waters.com/waters/en_BE/UPLC--Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=en_BE. [Accessed: 09- Mar- 2020].
- [67]D. Bhanot, "Introduction to HPLC understanding and its parts", *Lab-Training.com*, 2012. [Online]. Available: <https://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-5/>. [Accessed: 15- Apr- 2020].
- [68]D. Bhanot, "What are the Benefits of UHPLC over normal Analytical HPLC?", *Lab-Training.com*, 2014. [Online]. Available: <http://lab-training.com/2014/04/17/what-are-the-benefits-of-uhplc-over-normal-analytical-hplc/>. [Accessed: 15- Apr- 2020].
- [69]"Original UPLC/UHPLC system with sub 2 micron particle technology for separations : Waters", *Waters.com*. [Online]. Available: https://www.waters.com/waters/en_BE/Original-UPLC-UHPLC-system-with-sub-2-

micron-particle-technology-for-separations/nav.htm?cid=514207&locale=en_BE.
[Accessed: 20- Mar- 2020].

[70]"13 Massaspectrometrie", *Mlochemie.nl*, 2020. [Online]. Available:
<https://www.mlochemie.nl/index.php/13-massaspectrometrie>. [Accessed: 16- Apr- 2020].

[71]"Hoe werkt massaspectrometrie?", *Aljevragen.nl*. [Online]. Available:
<https://www.aljevragen.nl/sk/analyse/ANA160.html>. [Accessed: 16- Apr- 2020].

[72]"Dextroamphetamine", *Webbook.nist.gov*. [Online]. Available:
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C51649&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>.
[Accessed: 16- Apr- 2020].

[73]J. Loo, "Proteome Characterization and Proteomics, Volume 65 - 1st Edition", *Elsevier.com*, 2003. [Online]. Available:
<https://www.elsevier.com/books/proteome-characterization-and-proteomics/veenstra/978-0-12-034265-5>. [Accessed: 16- Apr- 2020].

[74]G. Santoiemma, "Fig. 3. Quadrupole mass spectrometer. Diagram of instrument operation.", *ResearchGate*, 2017. [Online]. Available:
https://www.researchgate.net/figure/Quadrupole-mass-spectrometer-Diagram-of-instrument-operation_fig1_325825244. [Accessed: 16- Apr- 2020].

[75]"Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) - MagLab", *Nationalmaglab.org*, 2015. [Online]. Available:
<https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms>.
[Accessed: 10- Mar- 2020].

[76]E. Wouter, "Metaboliëten afkomstig van organofosforpesticiden in urine bepalen met GC-MS-MS", *Depot.lias.be*, 2014. [Online]. Available:
http://depot.lias.be/delivery/DeliveryManagerServlet?dps_pid=IE2943173. [Accessed: 10- Mar- 2020].

[77]"Targeted Mass Spectrometry (MRM/SRM) - Proteomics International", *Proteomics.com*. [Online]. Available:
<https://www.proteomics.com.au/analytical-services/srms-mrm/>. [Accessed: 16- Apr- 2020].

[78]T. Wood, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte", *hindawi*, 2012. [Online]. Available:
<https://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/>. [Accessed: 15- Apr- 2020].

[79]P. Chitranshi, "Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer by Waters", *Selectscience.net*. [Online]. Available:
<https://www.selectscience.net/products/xevo-tq-s/?prodID=86008>. [Accessed: 20- Mar- 2020].

[80]NICC, "Bepaling van basische drugs in speeksel met UPLC-MS/MS", NS, Brussel, 2019.

[81]NICC, "Validatie van een chromatografische methode", NS, Brussel, 2017.

[82]"Oasis MCX 96-well Plate, 30 mg Sorbent per Well, 30 µm, 1/pk", *Waters.com*. [Online]. Available:
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000248-oasis-mcx-96-well-plate-30-mg-sorbent-per-well-30--m-1-pk.html>.
[Accessed: 09- Mar- 2020].

[83]"Waters Oasis Sample Extraction SPE Products : Waters", *Waters.com*. [Online]. Available: https://www.waters.com/waters/en_BE/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=en_BE. [Accessed: 09- Mar- 2020].

[84]W. Joubert, "Solid Phase Extraction –Sorbent Selection and Method Development(A Simple Path to Matrix Removal and Robust Solid Phase Extraction Methods)", *Microsep.co.za*, 2017. [Online]. Available: <https://www.microsep.co.za/wp-content/uploads/2017/08/Day-2-Candle-Wood-Talk-2-Willem-Joubert-Solid-Phase-Extraction-Sorbent-Selection-and-Method-development.pdf>. [Accessed: 27- Mar- 2020].

[85]"BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology : Waters", *Waters.com*. [Online]. Available: https://www.waters.com/waters/fr_FR/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=fr_FR. [Accessed: 10- Apr- 2020].

[86]L. New and E. Chan, *Evaluation of BEH C18, BEH HILIC, and HSS T3 (C18) Column Chemistries for the UPLC–MS–MS Analysis of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Ophthalmic Acid in Mouse Liver and Human Plasma*. Singapore: Journal of Chromatographic Science, 2008.

[87]"<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715002108rA.pdf>", *Waters.com*, 2009. [Online]. Available: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715002108rA.pdf>. [Accessed: 15- Apr- 2020].

[88]"Xevo TQ-S", *Waters.com*, 2017. [Online]. Available: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003447en.pdf>. [Accessed: 10- Apr- 2020]

[89]NICC, "Kwaliteitscontrole/Contrôle de Qualité: QC Saliva", NICC, Brussel, 2019.

[90]*Certificate of analysis*. North Charleston: LGC, 2020.

BIJLAGEN

Bijlage A: Lijst van reagentia

- Methanol, for chromatography (met dispenser/avec distributeur)
- Methanol, ULC/MS
- Water, HPLC
- Hydrochloric acid, 0.1 N HCl
- Ammonia solution 32%, extra pure
- 0.1% Formic Acid (UPLC-MS grade)
- Intercept Buffer
- Blanco speeksel
- Hydrogen chloride 1.25M in 2-propanol
- 2-propanol, for chromatography
- Dichloromethane, for chromatography
- Formic acid for mass spectroscopy, 98%
- Acetonitrile, ULC/MS

Bijlage B: Lijst van materiaal en apparatuur

- TQS (MS Waters)
- Waters Recovery vial 186000384c
- Waters LC vials 6000000751c
- Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 mmx100mm (Waters)
- Plastiek buizen vb. Buizen van 12 mL in TPP (ref. 91019)
- Tubes type chromacol 5mL
- Extractiekolommen Waters Oasis[®] MCX 96-well platen 30 μ m (30mg)
- Vortex
- Vacuumcentrifuge
- Gilson microman pipetten M1000, M250, M100, M50 + capillairen en pistons
- Finnpijetten 200-1000 μ L
- Medische handschoenen (nitrile)

Bijlage C: Resultaten optimalisatie via extractie-efficiëntie

Tabel 31: Eerste resultaten EE

Basische drugs	EE (%)			
	High		Low	
	Mean	%RSD	Mean	%RSD
Amfetamine	57,8	47,1	38,8	60,8
MDMA	51,8	48,0	32,7	61,9
Benzoylecgonine	45,6	48,6	30,1	59,3
Cocaïne	51,9	45,0	40,2	53,7
MAM	50,1	49,9	35,4	63,6
Morfine	52,5	44,6	41,8	55,9

Tabel 32: Resultaten EE na finale optimalisatie

Basische drugs	EE (%)			
	Low		High	
	Mean	%RSD	Mean	%RSD
Amfetamine	87,6	20,3	81,6	4,52
MDMA	95,1	20,9	82,0	4,75
Benzoylecgonine	88,8	14,2	85,5	2,58
Cocaïne	89,8	15,6	81,0	5,60
MAM	82,1	16,8	80,6	7,68
Morfine	84,5	14,4	84,7	3,57

Bijlage D: Resultaten Lineariteit

Tabel 33: Resultaat calibratiecurven amfetamine

Amfetamine: Kwadratisch 1/X				
Dag	r ²	a	b	c
1	0,9995	-1,06E-07	0,00211	0,00518
2	0,9989	-1,16E-07	0,00217	0,00828
3	0,9968	-1,52E-07	0,00243	-0,00661
4	0,9978	-8,36E-08	0,00205	0,00632
5	0,9998	-1,18E-07	0,00211	-0,000566
6	0,9981	-1,18E-07	0,00204	0,0179
7	0,9981	-1,03E-07	0,00203	0,0216
8	0,9991	-1,01E-07	0,00206	0,0251
gem	0,9985	-1,12E-07	0,00212	0,00966
stdev	0,0010	1,98E-08	0,000132	0,0110
%RSD	0,1004	-17,6	6,2350	

Tabel 34: Resultaat calibratiecurven MDMA

MDMA: Kwadratisch 1/X				
datum	r2	a	b	c
18/05/2020	0,9993	-1,30E-08	0,000952	-0,00214
20/05/2020	0,9994	-2,08E-08	0,00109	-
20/05/2020(2)	0,9977	-4,47E-08	0,00120	-0,00559
25/05/2020	0,9991	-2,66E-08	0,00105	-0,00152
25/05/2020(2)	0,9996	-1,11E-08	0,00105	-0,000963
27/05/2020	0,9981	-8,56E-09	0,00101	0,000674
27/05/2020(2)	0,9980	-1,44E-08	0,000980	0,00180
27/05/2020(3)	0,9980	-7,38E-09	0,00100	0,00099
gem	0,9986	-1,83E-08	0,00104	-0,000852
stdev	0,000782	1,24E-08	0,0000777	0,00233
%RSD	0,0783	-67,8	7,45	

Tabel 35: Resultaat calibratiecurven benzoylecgonine

Benzoylecgonine: Kwadratisch 1/X				
datum	r2	a	b	c
18/05/2020	0,9990	-4,24E-07	0,00385	0,00431
20/05/2020	0,9995	-5,31E-07	0,00398	0,00512
20/05/2020(2)	0,9988	-3,10E-07	0,00402	-0,000243
25/05/2020	0,9988	-4,53E-07	0,00381	-0,00100
25/05/2020(2)	0,9993	-3,36E-07	0,00374	-0,00072
27/05/2020	0,9973	-1,92E-06	0,0112	0,00550
27/05/2020(2)	0,9986	-1,49E-06	0,00976	0,0129
27/05/2020(3)	0,9988	-1,37E-06	0,00974	0,00991
gem	0,9988	-8,54E-07	0,00627	0,00447
stdev	0,000675	6,34E-07	0,00333	0,00510
%RSD	0,0676	-74,3	53,1	

Tabel 36: Resultaat calibratiecurven cocaïne

Cocaïne: Lineair 1/X			
datum	r2	slope (a)	y-intercept (b)
18/05/2020	0,9998	0,00248	0,00231
20/05/2020	0,9991	0,00255	0,00108
20/05/2020(2)	0,9965	0,00249	-0,000117
25/05/2020	0,9990	0,00243	0,00548
25/05/2020(2)	0,9988	0,00250	0,000897
27/05/2020	0,9993	0,00258	0,00767
27/05/2020(2)	0,9994	0,00259	0,00758
27/05/2020(3)	0,9992	0,00261	0,00663
gem	0,9989	0,00253	0,00394
stdev	0,00100	0,0000648	0,00324
%RSD	0,100	2,56	

Tabel 37: Resultaat calibratiecurven MAM

MAM: Kwadratisch 1/X				
datum	r2	a	b	c
18/05/2020	0,9989	-7,23E-06	0,0333	-0,00862
20/05/2020	0,9994	1,48E-06	0,0270	0,0164
20/05/2020(2)	0,9986	2,89E-06	0,0282	-0,00490
25/05/2020	0,9931	-9,47E-06	0,0360	-0,0445
25/05/2020(2)	0,9982	2,57E-06	0,0271	0,00844
27/05/2020	0,9970	-2,21E-06	0,0341	0,0151
27/05/2020(2)	0,9985	-3,30E-06	0,0358	0,00702
27/05/2020(3)	0,9982	-6,37E-06	0,0370	-0,00594
gem	0,9977	-2,71E-06	0,0323	-0,00213
stdev	0,00198	4,73E-06	0,00421	0,0196
%RSD	0,199	-175	13,0	

Tabel 38: Resultaat calibratiecurven morfine

Morfine: Kwadratisch 1/X				
datum	r2	a	b	c
18/05/2020	0,9994	-5,27E-07	0,0124	0,000415
20/05/2020	0,9984	-3,35E-07	0,0115	0,00405
20/05/2020(2)	0,9974	-1,50E-06	0,0131	-0,00724
25/05/2020	0,9992	-2,02E-07	0,0121	-0,000670
25/05/2020(2)	0,9994	8,98E-07	0,0115	0,00598
27/05/2020	0,9995	5,68E-07	0,0116	0,00284
27/05/2020(2)	0,9992	2,85E-07	0,0116	0,00514
27/05/2020(3)	0,9991	-5,04E-08	0,0116	0,00517
gem	0,9989	-1,08E-07	0,0119	0,00196
stdev	0,000731	7,37E-07	0,000582	0,00440
%RSD	0,0732	-682	4,88	

Bijlage E: Resultaten matrixeffect

Tabel 39: Resultaten ME

Basische drugs	ME (%)			
	High		Low	
	Mean	%RSD	Mean	%RSD
Amfetamine	90,4	4,36	103	6,00
MDMA	92,7	4,44	109	5,11
Benzoylecgonine	94,0	4,37	113	3,59
Cocaïne	94,4	4,15	112	3,22
MAM	94,1	5,43	108	5,30
Morfine	98,5	4,28	106	5,58

Bijlage F: Resultaten meetonzekerheid

Tabel 40: Resultaten meetonzekerheid

Basische drugs	U (%)		
	QC_Low	QC_Med	QC_High
Amfetamine	17,0	14,5	14,5
MDMA	21,0	11,7	17,6
Benzoylecgonine	18,0	13,8	9,03
Cocaïne	16,6	15,5	16,8
MAM	19,0	20,5	28,1
Morfine	11,1	18,6	18,0