

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

Michiel Struyfs

Master IW biochemie

Introductie

Rijden onder invloed van drugs is een wereldwijd probleem en verhoogt het risico op ongevallen aanzienlijk. Naar aanleiding van nieuwe wetgeving mag de politie speekselstalen afnemen in het verkeer. In figuur 1 wordt de intercept I2 speekselcollector weergegeven die hiervoor gebruikt wordt. Hierdoor neemt het aantal stalen die dagelijks geanalyseerd worden toe. In 2019 zag het labo toxicologie van het NICC een verdubbeling van het aantal stalen t.o.v. 2015 en bijna een verdrievoudiging t.o.v. 2013. De huidige analysemethode voor basische drugs 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. 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? Op welke manier voldoet deze methode aan de basisvoorwaarden volgens de methodevalidatie?"



Figuur 1: INTERCEPT I2 speekselcollector

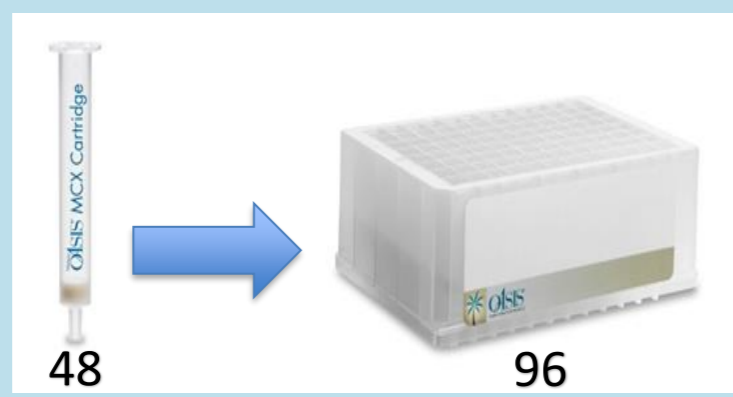


Figuur 2: Cocainepoeder (boven) en MDMA pillen (onder)

Doel

Bij dit project is het de bedoeling dat de huidige extractiekolommen, Oasis[®] MCX 3cc 30 µm (60 mg), vervangen worden door de Oasis[®] MCX 96-well platen 30 µm (30 mg). Hierdoor zou het mogelijk zijn om het aantal stalen die dagelijks verwerkt kunnen worden te verdubbelen van 48 naar 96 stalen per dag (inclusief calibratoren blanco en QC's). Dit wordt weergegeven in figuur 3. Deze extractiekolommen verschillen in de hoeveelheid vaste fase en het volume dat kan worden toegevoegd. Eerst wordt de methode geoptimaliseerd met behulp van de extractie-efficiëntie. Het is belangrijk dat de methode, met deze aanpassing, voldoet aan de basisvoorwaarden die opgelegd worden door de methodevalidatie. De volgende validatiekarakteristieken worden hierbij vastgelegd:

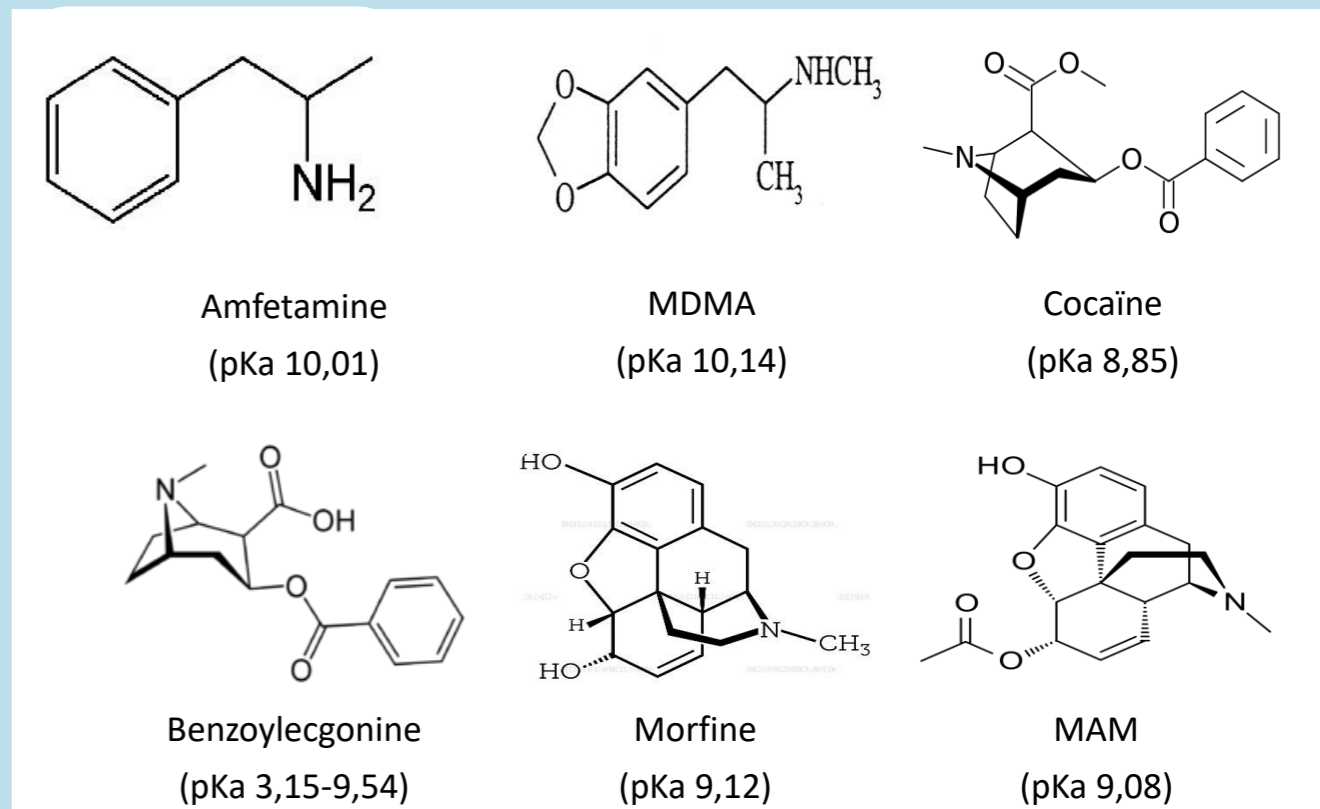
- Selectiviteit
- Lineariteit van de kalibratiecurve
- Accuraatheid
- Analytische grenzen (LOQ)
- Carry-over
- Matrixeffect (ME)
- Meetonzekerheid



Figuur 3: Oasis[®] MCX 3cc 30 µm (60 mg) (links) t.o.v. Oasis[®] MCX 96-well platen 30 µm (30 mg) (rechts)

Methode

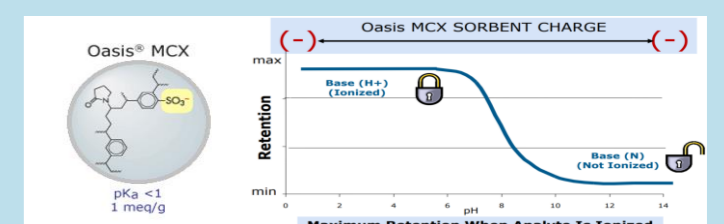
De basische drugs die bepaald worden, worden in figuur 4 weergegeven met hun pKa-waarden. Benzoyllecgonine is het voornaamste metaboliet van cocaïne. Morfine en monoacetylmorfine (MAM) zijn metabolieten van heroïne.



Figuur 4: Basische drugs die behandeld worden in dit project met pKa-waarden

De analysemethode kan worden opgedeeld in drie delen namelijk:

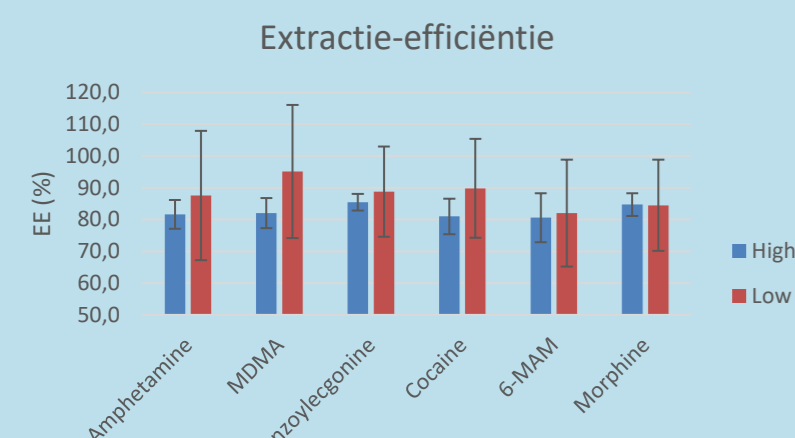
- Monstervoorbereiding
- Solid phase extraction (SPE) (Sorptiemoleculen en retentie weergegeven in figuur 5)
- Analyse met UPLC-MS/MS



Figuur 5: MCX-moleculen (links); retentie i.f.v. pH (Rechts)

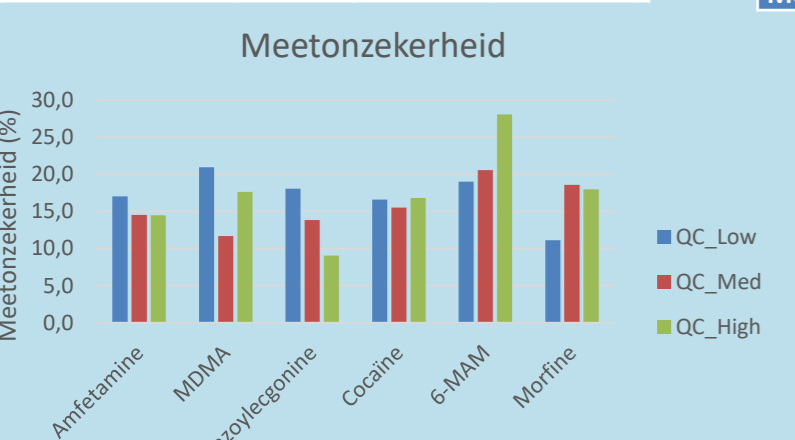
Resultaten

De resultaten die hieronder worden weergegeven zijn enkel de resultaten die volledig voldoen aan de acceptatiecriteria. Deze zijn: de extractie-efficiëntie (figuur 6), matrixeffect (figuur 7) en accuraatheid (tabel 2-4). Daarnaast werd de meetonzekerheid bepaald aan de hand van de validatie (figuur 8).



Figuur 6: Resultaat extractie-efficiëntie

Accuraatheid	QC Low		
Basische drugs	Bias (%)	RSD _d (%)	RSD ₀ (%)
Amfetamine	6,82	2,51	7,99
MDMA	8,39	7,42	9,84
Benzoyllecgonine	10,3	5,04	8,47
Cocaine	9,65	6,27	7,79
6-MAM	1,88	7,80	8,93
Morfine	10,52	5,21	5,21



Figuur 8: Resultaat meetonzekerheid

Accuraatheid	QC Med		
Basische drugs	Bias (%)	RSD _d (%)	RSD ₀ (%)
Amfetamine	11,4	6,80	6,81
MDMA	4,69	5,47	5,47
Benzoyllecgonine	6,55	6,27	6,48
Cocaine	8,9	7,27	7,27
6-MAM	-0,275	9,65	9,65
Morfine	6,95	5,77	8,71

Accuraatheid	QC High		
Basische drugs	Bias (%)	RSD _d (%)	RSD ₀ (%)
Amfetamine	6,97	5,16	6,79
MDMA	3,89	5,62	8,28
Benzoyllecgonine	3,00	2,32	4,24
Cocaine	5,61	5,06	7,90
6-MAM	-3,23	5,25	13,17
Morfine	-0,15	5,84	8,43

Naast deze resultaten zijn er ook resultaten voor de andere validatiekarakteristieken. Deze voldeden echter niet of slechts deels aan de acceptatiecriteria. Mogelijke oorzaken zijn: problemen met het meettoestel of contaminatie die ergens in de methode optreedt (vermoedelijk ter hoogte van de vacuümcentrifuge). Uit de meetonzekerheid valt af te leiden dat de grootste onzekerheid bekomen wordt voor 6-MAM op QC_High. De laagste meetonzekerheid is voor benzoyllecgonine ook op QC_High.

Conclusie

Optimalisatie

- SPE: extra droogstap
- Elutievolume: 750µL

Validatie

- Enkel accuraatheid en matrixeffect voldoen aan acceptatiecriteria
- Andere karakteristieken voldoen niet of slechts gedeeltelijk

Toekomst

- Verdere validatie
- Verdere optimalisatie

De optimalisatie en validatie maken eveneens gebruik van deze methoden. Het is belangrijk dat de nieuwe methode voldoet aan de validatiekarakteristieken. De acceptatiecriteria worden weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Acceptatiecriteria van de validatiekarakteristieken

Fase	Karakteristiek	Acceptatiecriteria
Optimalisatie	Extractie-efficiëntie (EE)	EE ≥ 50%
	Selectiviteit	RSD ≤ 20%
Validatie	Lineariteit	5*(Bovengrens CI blanco) < Ondergrens CI LOQ R ² > 0,995 Geen twee uitschieters volgens zelfde concentratieniveau volgens Grubbstest %RE < 15% (< 20% voor LOQ) 'bias' binnen een interval van ± 15%
	Accuraatheid	RSD _r ≤ 15 % RSD _t ≤ 15 %
	Analytische grenzen (LOQ)	'bias' binnen een interval van ± 20% RSD _r ≤ 20 % RSD _t ≤ 20 %
	Carry-over	5*(Bovengrens CI blanco) < Ondergrens CI LOQ Concentratie blanco < 20% van LOQ
	Matrixeffect (ME)	ME < 15%

Referenties

[1]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.

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

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

[4]"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].

Promotoren / Copromotoren: ing. Evi Ruysinckx
dr. ir. Kristel Sniegowski