

CAT
Critically Appraised Topic**Opsporen van zolpidem, ketamine- en metabolieten in urine met behulp van LC-MS/MS**

Author: Bob Menten

Supervisor: Apr. A. Louwagie

Date: 9/09/2025

Clinical bottom line

Voor het opsporen van zolpidem en ketamine in urine is een gevoelige en specifieke detectiemethode onmisbaar, zowel bij acute intoxicaties als bij monitoring van chronisch middelengebruik. De LC-MS/MS methode van Chromsystems (*MassTox*® Drugs of Abuse Testing) detecteert deze componenten, maar kent beperkingen. Klinisch belangrijke metabolieten zoals zolpidem phenyl-4-carboxylzuur (ZPCA) en dehydronorketamine (DNK) worden niet opgespoord, ondanks hun hogere concentraties en langdurigere aanwezigheid in urine. Daarnaast wordt de laagste kwantificatielimiet (LLOQ) om praktische redenen bepaald door de laagste kalibrator, wat de gevoeligheid beperkt.

In dit onderzoek werd de LLOQ van ketamine, norketamine en zolpidem geoptimaliseerd. Daarnaast werden de metabolieten ZPCA en DNK geïntegreerd in de bestaande methode. Via een Q3-scan van gekend positieve stalen werden de optimale ionisatiemodus, retentietijd en eventuele adducten van beide metabolieten bepaald. Vervolgens werden *Enhanced product ion* (EPI) -spectra gegenereerd en gematcht met een bibliotheek ter bevestiging van de aanwezigheid en voor de selectie van fragment-ionen. De gekozen transitieën werden verder geoptimaliseerd via *multiple reaction monitoring* (MRM), met optimalisatie van *collision energy* (CE) en *declustering potential* (DP). De geoptimaliseerde transitieën werden nadien geïntegreerd in de Chromsystems-methode.

De LLOQ van ketamine kon verlaagd worden van 25,9 µg/L naar 5,3 µg/L, van norketamine van 27,3 µg/L naar 12,5 µg/L, en van zolpidem van 28,8 µg/L naar 8,3 µg/L. In een reeks patiëntstalen werd een duidelijke toename in het aantal positief gerapporteerde stalen vastgesteld. Door de verlaagde LLOQ en toevoeging van metabolieten steeg dit van 32% naar 96% voor zolpidem (n=25), en van 55% naar 100% voor ketamine (n=29). Door deze gerichte aanpassingen werd zowel de gevoeligheid als het detectievenster van deze componenten significant verbeterd.

Clinical/Diagnostic scenario

Zolpidem en ketamine zijn psychoactieve substanties met elk een specifiek klinisch toepassingsgebied. Zolpidem is een hypnoticum dat behoort tot de Z-drugs, deze middelen zijn chemisch verschillend van de benzodiazepinen, maar hun werkingsmechanisme is analoog. Zolpidem is een allosterische modulator van de GABA_A-receptor en versterkt zo de GABA-effecten met depressie van het centraal zenuwstelsel (CZS) als gevolg. De voornaamste indicatie van zolpidem is de korte termijn behandeling van insomnia (1). Daarnaast is misbruik beschreven, onder meer ter versterking van opioïdeneffecten en ter compensatie van agitatie, slapeloosheid en hyperactiviteit veroorzaakt door cocaïne of amfetaminen (2,3). Het gebruik van zolpidem kan leiden tot de ontwikkeling van tolerantie, fysieke en psychische afhankelijkheid. Het risico op afhankelijkheid stijgt naargelang de gebruikte dosis en behandelingsduur en treedt doorgaans op na twee tot vier weken. Enkele veel voorkomende nevenwerkingen zijn: duizeligheid, somnolentie, cognitieve stoornissen, verergerde slapeloosheid en anterograde amnesie (1). Zolpidem heeft een eliminatiehalfwaardetijd van 2,4 uur en een korte werkingsduur van ongeveer zes uur. Het wordt in de lever

gemetaboliseerd door cytochroom P450-enzymen (CYP-enzymen) tot verschillende hydroxy- en carboxymetabolieten, die hoofdzakelijk (56%) via de urine worden uitgescheiden in de vorm van glucuronzuurconjugaten (1). Minder dan 1% van de ingenomen dosis wordt onveranderd in de urine geëxcreteerd (4,5).

Ketamine is een dissociatief anestheticum dat behoort tot de arylcyclohexylamines en fungeert onder andere als niet-competitieve antagonist van de NMDA-receptor. Het induceert een dissociatieve anesthesie waarbij de patiënt ogenschijnlijk wakker blijft, met open ogen en eventueel nystagmus, maar volledig losgekoppeld is van de omgeving en het eigen lichaam; “the lights are on, but no one’s home” (6,7). Deze dissociatieve toestand wordt gekenmerkt door volledige analgesie en amnesie, terwijl vitale reflexen zoals respiratoire en cardiovasculaire stabiliteit behouden blijven. Dankzij deze eigenschappen wordt ketamine frequent gebruikt als anestheticum bij kortdurende heelkundige ingrepen. Ketamine wordt ook recreatief gebruikt als partydrug vanwege zijn euforische, dissociatieve en milde hallucinogene eigenschappen. Ketamine heeft, in tegenstelling tot klassieke hallucinogenen zoals lysergeenzuurdiethylamide (LSD), een hoger risico op het ontwikkelen van psychische afhankelijkheid en tolerantie (7). Chronisch gebruik wordt bovendien in verband gebracht met urologische en biliaire klachten waaronder (chole)cystitis, incontinentie en hematurie (6,7). Ketamine heeft een halfwaardetijd van twee tot vier uur en de effecten duren ongeveer 20-60 minuten na intraveneuze toediening. Het wordt extensief gemetaboliseerd in de lever door CYP-enzymen tot o.a. norketamine en dehydronorketamine en uitgescheiden via de urine: ongeveer 2.3% in onveranderde vorm, 1.6% norketamine, 16.2% dehydronorketamine en 80% als geconjugeerde vormen van gehydroxyleerde metabolieten met glucuronzuur.

Het aantonen van zolpidem- en/of ketaminegebruik kent verschillende relevante toepassingen, onder andere in het kader van *drug-facilitated sexual assault* (DFSA), bij intoxicaties, in de opvolging van patiënten binnen rehabilitatiecentra en in het kader van verkeersveiligheid.

In het Sint-Trudo Ziekenhuis wordt een urinaire drugscreening uitgevoerd via competitieve enzyme-immunoassay's voor opiaten, methadon, benzodiazepinen, amfetamines, cannabinoïden en cocaïne. Voor ketamine en Z-drugs zijn er slechts een beperkt aantal commerciële immunoassay's beschikbaar, maar vanwege lage performantie worden deze niet gebruikt in het Sint-Trudo ziekenhuis (8,9). Bij een positieve screening of een gerichte aanvraag voor ketamine volgt een confirmatie met de MassTox® DoA-kit van Chromsystems. Deze LC-MS/MS methode detecteert 108 componenten, waaronder zolpidem (in onveranderde vorm), ketamine en het primaire metaboliet norketamine. Een belangrijke beperking van deze commerciële kit is het ontbreken van de meest relevante metabolieten van zowel zolpidem als ketamine. Zolpidem wordt slechts in beperkte mate (1%) onveranderd uitgescheiden in urine en is doorgaans niet meer detecteerbaar na 36 tot 40 uur (10,11). Daarentegen is ZPCA, het belangrijkste metaboliet van zolpidem, in honderdvoudige concentraties aanwezig in urine en blijft tot minstens 72 uur na eenmalige inname aantoonbaar (10–12). Daarom worden zolpidem stalen doorgestuurd voor externe analyse in UZ Leuven (UZL) aangezien het hoofdmetaboliet (ZPCA) daar wel wordt opgespoord. Omdat de Chromsystems-kit enkel zolpidem detecteert, worden voornamelijk acute intoxicaties geïdentificeerd, terwijl therapeutische of minder recente innames vaak onopgemerkt blijven. Voor ketamine bedraagt het detectievenster van het moedermolecule drie tot vijf dagen, voor norketamine vier tot zes dagen (13). Het metaboliet dehydronorketamine (DNK) is in urine aantoonbaar tot zeven à tien dagen na eenmalige inname van ketamine (13).

Deze CAT heeft dus als doel het detectievenster voor zolpidem en ketamine te verlengen door geselecteerde metabolieten toe te voegen aan de bestaande LC-MS/MS-methode en de LLOQ te verlagen. Concreet gaat het om de toevoeging van ZPCA voor zolpidem en DNK voor ketamine. Deze aanpassingen kunnen potentieel de sensitiviteit en betrouwbaarheid van de toxicologische analyse verbeteren.

Question(s)

- 1) Wat is het belang van het correct opsporen van ketamine en zolpidem?
- 2) Hoe kan het detectievenster van zolpidem en ketamine worden verlengd en welke metabolieten zijn hiertoe het meest geschikt?

- 3) *Wat zijn de technische en analytische moeilijkheden bij de integratie van deze metabolieten in de huidige methode?*

Search terms

- 1) *MeSH Database (PubMed): ("Zolpidem"[Mesh] OR "zolpidem" [tiab]) AND ("Metabolite*" [tiab]) AND ("liquid chromatography-mass spectrometry"[MeSH Terms] OR "LC-MS"[tiab] OR "LC-MSMS"[tiab] OR "LC/MSMS" [tiab] OR "tandem mass spectrometry"[MeSH Terms] OR "tandem mass spectrometry"[tiab]) AND ("Urine"[Mesh] OR "Urine"[tiab])*
- 2) *MeSH Database (PubMed): (("Ketamine"[Mesh] OR "ketamine" [tiab]) AND "norketamine" [tiab] AND "dehydronorketamine" [tiab]) AND ("Metabolite*" [tiab]) AND ("liquid chromatography-mass spectrometry"[MeSH Terms] OR "LC-MS"[tiab] OR "LC-MSMS"[tiab] OR "LC/MSMS" [tiab] OR "tandem mass spectrometry"[MeSH Terms] OR "tandem mass spectrometry"[tiab]) AND ("Urine"[Mesh] OR "Urine"[tiab])*

Appraisal

1. Introductie

1.1. Basisbegrippen UHPLC-MS/MS

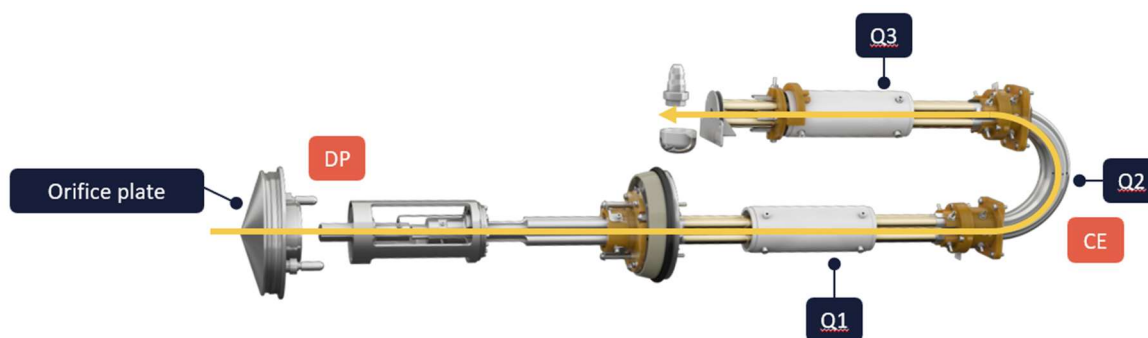
In Sint-Trudo wordt voor de confirmatie van drugs of abuse (DoA) in urine gebruik gemaakt van *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) gekoppeld aan tandem massaspectrometrie (UHPLC-MS/MS). Deze techniek combineert de scheidingskracht van vloeistofchromatografie met de gevoeligheid en specificiteit van massaspectrometrie. Na UHPLC-scheiding bereiken de analyten de ionenbron van de massaspectrometer, waar ze via elektro spray-ionisatie (ESI) worden omgezet in gasfase-ionen. Hierbij passeert de vloeistofstroom doorheen een fijne naald waarop een hoge spanning staat. De geladen vloeistofstroom die zo ontstaat wordt verneveld en verdampt met vorming van gasfase-ionen.

De ionisatiegraad wordt bepaald door de aangelegde naaldspanning (*ionspray voltage*). In positieve modus worden protonen toegevoegd aan het moedermolecule ($[M+H]^+$), in negatieve modus worden ze onttrokken ($[M-H]^-$). Positieve modus is doorgaans het meest geschikt voor basische componenten, negatieve modus voor zure.

Voordat de gevormde ionen de massaspectrometer binnentreden, passeren ze een kleine opening genaamd de orifice. Over de orifice is een spanning aangebracht, de *declustering potential* (DP). Deze spanning helpt om clusters van ionen en oplosmiddel uit elkaar te trekken, zodat zuivere individuele ionen de massaspectrometer bereiken. De optimale DP is componentafhankelijk. Een te lage DP resulteert in verminderde iontransmissie en dus lagere gevoeligheid, terwijl een te hoge DP kan leiden tot ongewenste fragmentatie. De schematische opstelling van een triple quadrupole massaspectrometer is weergegeven in Figuur 1.

Een triple quadrupole massaspectrometer, zoals de SCIEX Q-TRAP® 5500+, bestaat uit drie in serie geschakelde quadrupoles: Q1, Q2 en Q3. Afhankelijk van de gebruikte instellingen kunnen Q1 en Q3 functioneren als massafilters, die ionen met een specifieke massa-ladingverhouding (m/z) kunnen selecteren. In Q1 worden de gewenste moederionen geselecteerd op basis van hun m/z -waarde. Deze worden vervolgens doorgestuurd naar Q2, de *collision cell*, die gevuld is met een inert gas zoals stikstof. Hier ondergaan de ionen botsingen met gasmoleculen, waardoor ze gecontroleerd fragmenteren in dochterionen. Dit proces staat bekend als *collision associated dissociation* (CAD). De overgang van moeder-ion naar fragment-ion wordt aangeduid als een transitie.

De fragmentatie in Q2 wordt bepaald door de CE, een potentiaalverschil dat de ionen versnelt voor ze botsen met het inert gas. Hoe hoger de CE, hoe meer kinetische energie de ionen bezitten en hoe intensiever de fragmentatie. De optimale CE is, net zoals de DP, afhankelijk van de chemische structuur en verschilt dus per component (14).



Figuur 1: Schematische weergave van een Sciex QTRAP® triple quadrupole massaspectrometer (15)

Q3 kan, net als Q1, als massafilter fungeren door enkel fragment-ionen met een specifieke m/z -verhouding door te laten naar de detector, terwijl alle andere fragment-ionen worden tegengehouden. Deze werkwijze wordt ook wel MRM genoemd. Afhankelijk van de instellingen kan Q3 echter ook functioneren als linear ion trap (LIT). In deze modus worden alle fragment-ionen uit Q2 tijdelijk vastgehouden in Q3 en vervolgens sequentieel uitgescand op basis van hun m/z -verhouding, wat resulteert in een volledig MS/MS-spectrum.

Dit type scan staat bekend als EPI-scan. Het gevormde spectrum is een soort handtekening van het analyt en kan gebruikt worden voor structurele identificatie. In Figuur 2 zijn de verschillende scan-types schematisch weergegeven.

1.2. Chromsystems LC-MS/MS methode

De UHPLC-MS/MS-methode van Chromsystems®, zoals momenteel toegepast in het Sint-Trudo Ziekenhuis, maakt gebruik van MRM voor de kwantificatie van analyten.

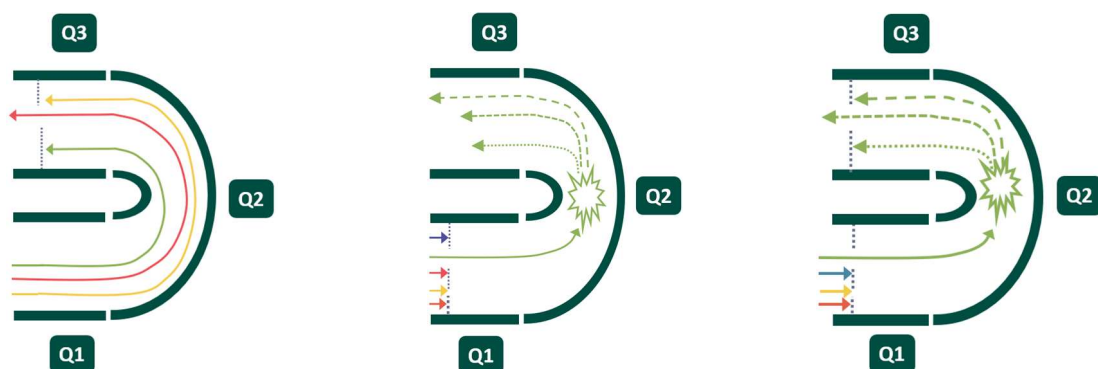
In MRM-modus selecteert Q1 een specifiek moederion op basis van zijn m/z -waarde. Dit ion wordt vervolgens in Q2 gefragmenteerd. Q3 laat enkel fragment-ionen met een vooraf gedefinieerde m/z -waarde door naar de detector. Omdat het systeem snel kan schakelen tussen verschillende transitie, spreekt men van multiple reaction monitoring. In de Chromsystems-methode worden voor elk van de 108 componenten twee transitie gemonitord: een quantifier en een qualifier. Het fragment-ion (transitie) met de hoogste intensiteit wordt aangeduid als quantifier en dient voor het opstellen van de kalibratiecurve en concentratiebepaling. De qualifier is een karakteristiek fragment-ion dat de aanwezigheid van het doelanalyt verder ondersteunt. De combinatie van retentietijd, m/z van het moederion, m/z van de quantifier en m/z van de qualifier maakt dat de detectie uiterst selectief en robuust is.

2. Materiaal & methoden

2.1. Toevoegen van nieuwe componenten aan de LC-MS/MS-methode

Om DNK en ZPCA toe te voegen aan de bestaande Chromsystems-methode werden meerdere stappen doorlopen. Een eerste stap bestond uit het uitvoeren van een Q3-scan op een staal waarvan bekend is dat DNK of ZPCA aanwezig is. Bij dit type scan worden alle ionen doorgelaten via Q1 en Q2, waarna Q3 als massafilter optreedt om ionen binnen een gedefinieerd m/z -bereik rond het molecuulgewicht van de target te detecteren (Figuur 2). Op basis van deze scan wordt de retentietijd bepaald, welke ionisatiemodus (positief of negatief) het meest geschikt is, en of het analyt voorkomt als vrij ion of in de vorm van eventuele adduct(en).

In een tweede stap werd een EPI scan uitgevoerd (Figuur 2). Het gegenereerde EPI-spectrum wordt gebruikt voor twee doeleinden: om het analyt te vergelijken met een bibliotheek (library matching), en om geschikte fragment-ionen te selecteren voor de uiteindelijke MRM-analyse. Na bevestiging van de identiteit werden in een derde stap twee fragment-ionen geselecteerd: één als quantifier en één als qualifier. Om de gevoeligheid van deze transitie te maximaliseren, werd de optimale CE- en DP-waarden bepaald. De combinatie die de hoogste piekintensiteit opleverde werd gekozen. Dit gebeurde door opeenvolgende MRM-metingen uit te voeren met oplopende CE- en DP-waarden (Figuur 2). Zodra de transitie en bijbehorende instellingen vastgelegd waren, werden ze geïntegreerd in de Chromsystems® MRM-methode voor verdere validatie.



Figuur 2: Schematische voorstelling van een Q3-scan (links), EPI-scan (midden) en MRM (rechts). Een ingestelde massafilter wordt voorgesteld d.m.v. verticale stippellijnen

2.2. Apparatuur

De LC-MS/MS-analyses werden uitgevoerd op een Shimadzu LC-40 UHPLC-systeem, gekoppeld aan een SCIEX Triple Quad™ 5500+ QTRAP® Ready massaspectrometer. De analytische kolom werd in de kolomoven

op een constante temperatuur van 30°C gehouden. De autosampler werd op een temperatuur van +8 °C gehouden. De injectievolumes bedroegen 15 µL. Na elke injectie werd het injectie systeem gespoeld.

2.3. *Chromatografische condities*

De gradiëtscheiding gebeurde aan een constante flow van 0,4 mL/min met een binaire mobiele fase: mobiele fase A en B. De gradiënt startte bij 100% A (0–0,20 min), werd lineair afgebouwd naar 0% A over 10 minuten (tot 10,20 min) en vervolgens constant gehouden tot 12,00 min. Daarna werd A in 1 seconde terug verhoogd tot 100% en behouden tot het einde van de run (12,50 min).

2.4. *Conditie massaspectrometer*

De massaspectrometrische analyse werd uitgevoerd met ESI in positieve modus. De ionenbron werd ingesteld met een *Curtain Gas* (CUR) van 35 psi, een *IonSpray-voltage* (IS) van +3500 V, een *nebulizergas* (GS1) van 60 psi, *heatergas* (GS2) van 70 psi en een bron-temperatuur (TEM) van 600 °C. Stikstof fungeerde als botsingsgas in de *collision cell*, waarbij de CAD op niveau 9 ('medium') werd ingesteld. Zowel de entrance potential (EP) als de collision cell exit potential (CXP) werden ingesteld op 10 V. De EPI-spectra werden opgenomen met een startmassa van 50 Da en een stopmassa die 20 Da hoger lag dan de massa van het moederion. Hierbij werd de CE ingesteld op 35 V met een CE-spreiding (CES) van 15 V. De scansnelheid van de EPI scan bedroeg 10.000 Da/s. De spectra werden vergeleken met referentiespectra uit de Forensic HR-MS/MS Spectral Library 2.2 en de MMHW-library. Voor de Q3-scan werd een massabereik van ±100 Da boven en onder de precursor-ionmassa afgescand, met een scansnelheid van 1.000 Da/s en een declustering potential (DP) van 55 V.

2.5. *Kalibratoren en kwaliteitscontroles*

Voor de kwantificatie van zolpidem, ketamine en norketamine werd een 6-punts kalibratie uitgevoerd samen met drie kwaliteitscontroles op laag, midden en hoog niveau. Voor de bepaling van ZPCA werd uit een hoog geconcentreerd staal een seriële 1-op-2-verdunningsreeks opgesteld aangevuld met twee kwaliteitscontroles bereid uit stalen met lage en hoge concentraties. Zowel de verdunningsreeks als de kwaliteitscontroles werden bij elke run opnieuw geanalyseerd. Hetzelfde werd gedaan voor DNK.

2.6. *Staalvoorbereiding*

Voor de analyse werden patiëntstalen, kalibratoren en controles manueel voorbereid. Hiervoor werd 50 µL staal in een 1,5 mL Eppendorf-tube gebracht, gevolgd door 10 µL van de gereconstitueerde interne standaardmix en 40 µL van het enzymreagens om de analyten te deglucuronideren. Na vortexen gedurende 2 s werd het mengsel gedurende twee uur geïncubeerd bij 45 °C, gevolgd door een afkoeling van twee minuten op kamertemperatuur. Vervolgens werd 100 µL precipitatiereagens toegevoegd en kort gemengd. Na centrifugatie (5 min op 15.000 G) werd 100 µL supernatans overgebracht in een autosamplervial die reeds 150 µL verdunningsbuffer bevatte, waarna het finale mengsel werd gevortexed.

2.7. *Kwantificatie*

De kwantificatie gebeurde op basis van de responsfactor (RF), gedefinieerd als de verhouding tussen de piekoppervlakte van de quantifier en die van de deuterium-gelabelde interne standaard (IS). Voor zolpidem, ketamine en norketamine werd een kalibratiecurve opgesteld met RF op de y-as en concentratie op de x-as. Voor ZPCA en DNK waren geen oplossingen met gekende concentraties beschikbaar. Daarom werd een alternatieve kalibratiecurve opgesteld met RF op de y-as en verdunningsfactor op de x-as. Hierdoor kon geen exacte concentratie worden berekend.

Als interne standaard voor ZPCA werd norfentanyl-IS gebruikt vanwege de bijna identieke retentietijd. Voor DNK werd gekozen voor norketamine-IS, omwille van de vergelijkbare retentietijd en fysicochemische eigenschappen.

2.8. *Methode validatie*

Specificiteit, lineariteit, sensitiviteit, precisie en carry-over werden geëvalueerd volgens de gangbare richtlijnen (16,17). De specificiteit van ZPCA en DNK werden onderzocht door analyse van 18 blanco urinestalen, die voorafgaand negatief getest waren door UZL. Daarnaast werden 25 en 29 patiëntstalen geanalyseerd die positief testten op respectievelijk ZPCA en DNK.

Voor een deel van deze stalen waren ook semi-kwantitatieve resultaten beschikbaar van UZL, wat vergelijking mogelijk maakte. Voor de subset met externe resultaten konden de gerapporteerde concentraties worden uitgezet tegen de overeenkomstige RF's. Zo werd een indicatie verkregen van de concentraties waarmee werd gewerkt. Stalen werden als positief beschouwd wanneer het moedermolecule of een metabool daarvan boven de LLOQ werd aangetoond.

De kalibratiecurven van ZPCA en DNK werden opgesteld door uit de verdunningsreeks zes verdunningen te kiezen gespreid over het lineaire gebied. Voor alle analyten werd een $1/x^2$ gewogen lineair regressiemodel toegepast. Conform de FDA- en EMA-richtlijnen moest de nauwkeurigheid per kalibrator of verdunning binnen 15% van de nominale waarde liggen, met uitzondering van de LLOQ, waarvoor een afwijking tot 20% was toegestaan (16,17). De determinatiecoëfficiënt (r^2) diende minimaal 0,99 te bedragen.

De sensitiviteit werd gedefinieerd op basis van de LLOQ, overeenkomend met het laagste kalibratiepunt boven de nul-kalibrator. De nauwkeurigheid op LLOQ-niveau moest binnen 20% van de nominale waarde liggen, met een maximaal toegestane variatiecoëfficiënt (CV) van 20% en een signaal-ruis verhouding (S/N) ≥ 5 . De LLOQ van zolpidem, ketamine en norketamine werd bepaald door een 1:2, 1:4 en 1:8 verdunning te maken van de laagste kalibrator.

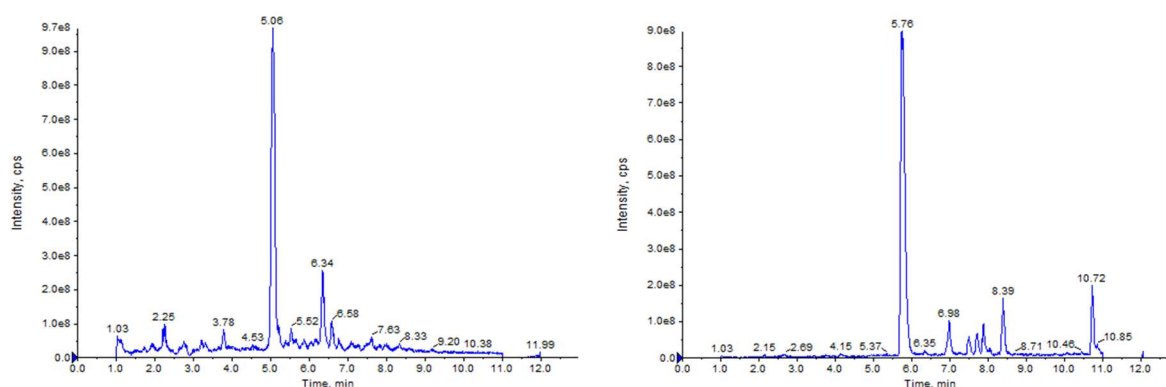
Voor DNK en ZPCA werd zowel de within ($n = 10$)- als between ($n = 5$)-run precisie berekend. De nauwkeurigheid tussen runs moest binnen 15% van de nominale waarde liggen, met een maximaal toegestane variatiecoëfficiënt (CV) van 15% voor zowel within-run als between-run precisie.

Carry-over werd geëvalueerd door de hoogste kalibrator van DNK en ZPCA driemaal opeenvolgend te injecteren (S_{61} , S_{62} , S_{63}), gevolgd door drie injecties van blanco urine (S_{01} , S_{02} , S_{03}). Voor de berekening van de carry-over werden de piekoppervlaktes van S_{63} , S_{01} en S_{03} gebruikt: $\text{Carry-over (\%)} = \frac{S_{01}-S}{S_{63}-S_{03}} \times 100$. De carry-over in het blanco staal direct na de hoogst geconcentreerde kalibrator mag maximaal 20% van de concentratie bedragen van de LLOQ.

3. Resultaten

3.1. Q3-scan

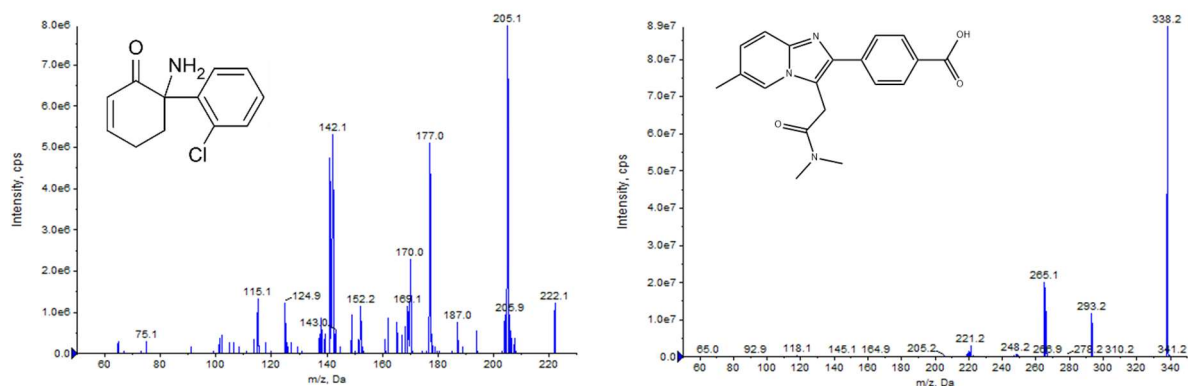
De Q3-scans leverden voor zowel DNK als ZPCA de beste resultaten op in positieve modus. Beide componenten vertoonden meerdere pieken, zoals geïllustreerd in Figuur 3, met de retentietijd (in minuten) op de x-as en de signaalintensiteit op de y-as. Om o.a. de correcte piek en de daarbij horende retentietijd te bepalen werd voor beide componenten een EPI-scan uitgevoerd.



Figuur 3: Q3 scan in positieve modus voor DNK (links) gefilterd op 222,1 m/z en ZPCA (rechts) gefilterd op 338,1 m/z

3.2. EPI- scan en MRM optimalisatie

Voor DNK vertoonde de piek met RT = 5,06 min een >99% overeenkomst met het bibliotheekspectrum. Ook voor ZPCA kwam de meest intense piek (RT = 5,76 min) overeen met een >99% match. Deze spectra zijn weergegeven in Figuur 4 met m/z op de x-as en de signaalintensiteit op de y-as. De andere pieken die zichtbaar zijn in de Q3-scans leverden geen match op met de gebruikte bibliotheken.



Figuur 4: EPI massa spectra voor DNK (links) en ZPCA (rechts)

De geselecteerde transities voor de verdere MRM-experimenten die werden geoptimaliseerd voor DP en CE, zijn weergegeven in Tabel 1. Voor ZPCA werd het ^{13}C -isotoop (m/z = 339,1) gevolgd om vroegtijdige detectorsaturatie te vermijden.

Component	RT (min)	MRM transitie ^a (m/z)	DP (V)	CE (V)	Dwell tijd (msec)
DNK	5,06	222,1 → 205,1	60	23	13,7
		222,1 → 177,1	60	18	13,7
ZPCA	5,76	339,1 → 266,1	60	51	16,5
		339,1 → 294,2	100	39	16,5

Tabel 1: Retentietijd, gekozen transities en MS condities voor ZPCA en DNK. ^aQuantifiers werden vetgedrukt.

3.3. Methode validatie voor zolpidem, ketamine- en metabolieten

De LLOQ waarbij de accuraatheid binnen 20% van de nominale waarde lag en de CV maximaal 20% bedroeg is weergegeven in Tabel 2. Om praktische redenen werd de LLOQ ingesteld op de laagste kalibrator uit de kalibratiecurve. Deze keuze werd gemaakt omdat de door Chromsystems voorgestelde LLOQ's enkel gevalideerd zijn voor de SCIEX 6500+ massaspectrometer. Bovendien ligt deze laagste kalibrator lager dan de maximale confirmatie cut-offs van de EWDTS (18). Na verdere optimalisatie van de LLOQ kon deze voor ketamine verlaagd worden van 25,9 µg/L naar 5,3 µg/L, voor norketamine van 27,3 µg/L naar 12,5 µg/L en voor zolpidem van 28,8 µg/L naar 8,3 µg/L.

Component	Verdunning ^a	LLOQ (µg/L)	S/N ratio	CV%	Accuraatheid (%)	Laagste kalibrator (µg/L)	Chromsystems (Sciex 6500+) LLOQ (µg/L)
Ketamine	1:4	5,3	20	11,2	81	25,9	0,203
Norketamine	1:2	12,5	79	12,4	91,6	27,3	3,50
Zolpidem	1:4	8,3	17	13,7	115,8	28,8	0,216

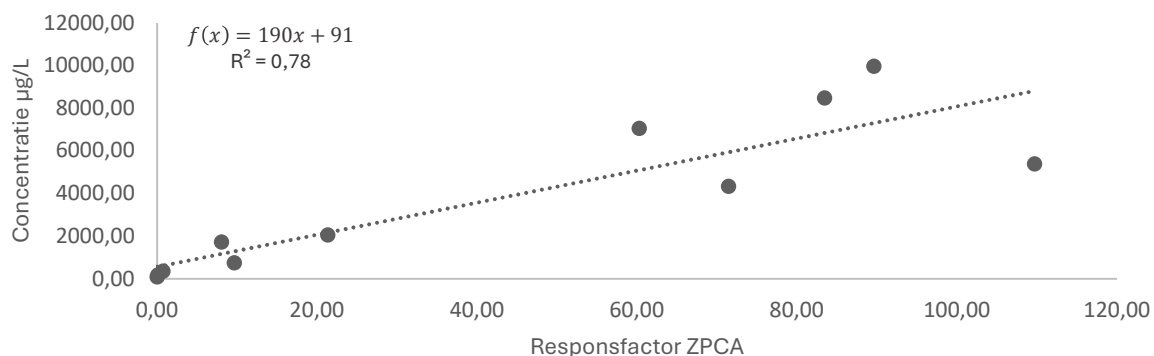
Tabel 2: Verdunning, verlaagde LLOQ, S/N ratio, CV, accuraatheid, laagste kalibrator, en Chromsystems LLOQ gevalideerd op Sciex 6500+ van ketamine, norketamine en zolpidem. ^aVerdunning van de laagste kalibrator.

De maximale CV-waarden voor de within-run en between-run precisie bedroegen respectievelijk 10,6% en 11,3%, en voldeden daarmee aan de vooropgestelde grens van ≤ 15%.

Voor ZPCA werd in de eerste blanco-injectie een carry-over van 0,024% (RF = 0,014) vastgesteld. In de daaropvolgende blanco's was geen residueel signaal meer zichtbaar. De LLOQ werd ingesteld op een responsfactor (RF) van 0,072 zodat de carry-over onder de grens van 20% van de LLOQ bleef. Deze RF komt overeen met een S/N ratio van 42 en 16 voor respectievelijk de quantifier en de qualifier. Voor DNK werd geen carry-over waargenomen en werd de LLOQ gelijkgesteld aan de RF van de laagste kalibrator (RF = 0,12) met een S/N ratio van 41 en 29 voor respectievelijk de quantifier en de qualifier.

Slechts 32% (n = 8/25) van de positieve patiëntenstalen had een zolpidem-concentratie boven de laagste kalibrator. Na verlaging van de LLOQ tot 8,3 µg/L kon 64% (n = 16/25) als positief gerapporteerd worden. Wanneer ook ZPCA werd gedetecteerd met een RF ≥ 0,072 kon met de nieuwe methode 96% (n = 24/25) van de stalen als positief worden beschouwd. Slechts één staal vertoonde een ZPCA-respons onder de LLOQ (RF = 0,02; S/N = 4). Dit betrof een laaggeconcentreerd staal van meer dan drie jaar oud, waarbij mogelijke afbraak van het analyt niet uitgesloten kan worden. Geen interferentiepieken boven de ruisdrempel werden waargenomen in de 18 blanco urinestalen, wat wijst op een goede specificiteit voor ZPCA en DNK.

Voor 13 ZPCA-stalen waarvoor ook een externe concentratie beschikbaar was, werd na exclusie van twee outliers een lineaire regressie uitgevoerd. De oorzaak van de afwijking bij deze outliers is onduidelijk, heranalyse van deze stalen moet dit verder uitwijzen. De bekomen regressielijn (Figuur 5) toont de relatie tussen de concentratie gemeten door UZL en de overeenkomstige RF, bepaald met de eigen methode.



Figuur 5: Lineaire regressie tussen de externe gemeten ZPCA-concentraties en de overeenkomstige responsfactoren (RF), bepaald met de eigen methode (n=11, na outlieranalyse).

Op basis van Figuur 5 werd het concentratiebereik van de ZPCA kalibratiecurve ($r^2 \geq 0,992$) geschat op een bereik van 157 tot 4797 µg/L. Voor de DNK-kalibratiecurve ($r^2 \geq 0,999$) waren onvoldoende externe resultaten beschikbaar waardoor het overeenkomstige concentratiebereik niet kon worden ingeschat.

Voor (nor-)ketamine vertoonde 55% (n = 16/29) van de positieve patiëntenstalen een (nor-)ketamine concentratie boven de laagste kalibrator. Met de nieuwe LLOQ van 5,3µg/L (ketamine) en 12,5 µg/L (norketamine) steeg dit aandeel naar 72% (n = 21/29). Wanneer ook DNK in rekening werd gebracht, kon 100% (n = 29/29) van de stalen als positief worden gerapporteerd.

4. Discussie

In deze CAT werden ZPCA en DNK toegevoegd aan de bestaande Chromsystems LC-MS/MS-methode, met als doel het aantonen van respectievelijk zolpidem- en ketaminegebruik. Deze metabolieten werden gekozen omdat ze in urine in hogere concentraties en gedurende langere tijd aanwezig zijn dan de overeenkomstige moedermoleculen.

Het fragment-ion met de hoogste intensiteit uit het EPI-spectrum (Figuur 4) werd geselecteerd als quantifier. Als qualifier werd een tweede, karakteristiek fragment-ion gekozen met voldoende intensiteit. Lage massanionen en fragmenten die ontstaan door verlies van water of ammoniak werden vermeden wegens hun beperkte specificiteit. De uitbreiding met ZPCA en DNK resulteerde in een analytische methode met verhoogde gevoeligheid en specificiteit. Voor een reeks zolpidem stalen steeg het aantal dat als positief kon worden gerapporteerd van 32% naar 96%. Voor de ketamine stalen steeg dit van 55% naar 100%.

Naast het toevoegen van ZPCA en DNK kon de LLOQ voor ketamine, norketamine en zolpidem worden verlaagd zonder verlies aan nauwkeurigheid of precisie.

Voor de nieuwe componenten ZPCA en DNK kon de accuraatheid van de kalibratiepunten niet worden berekend, aangezien geen referentiestandaarden met gekende concentraties beschikbaar waren. Daarom kon er, ondanks de hoge r^2 -waarden, niet voldaan worden aan de EMA- en FDA-richtlijnen voor lineariteit. Ook het vastleggen van de LLOQ werd hierdoor bemoeilijkt.

Als alternatief werden de kalibratiecurves opgesteld op basis van relatieve responsfactoren (RF) in plaats van concentraties. Het concentratiebereik van deze kalibratiecurves is daardoor niet gekend, wat de interpretatie bemoeilijkt. Dit kon deels worden opgevangen door ZPCA-concentraties te berekenen op basis van de regressielijn zoals weergegeven in Figuur 5.

Het gebruik van commercieel verkrijgbare standaarden met gekende concentraties blijft echter de voorkeur genieten. Toekomstige analyses met dergelijke standaarden kunnen deze beperkingen opvangen en toelaten om ZPCA en DNK op een betrouwbare manier semi-kwantitatief te rapporteren.

Een bijkomende beperking voor ZPCA is de beperkte carry-over die optreedt na injectie van een staal met hoge concentratie. In de praktijk kan dit eenvoudig worden verholpen door, bij vermoeden van carry-over, het eerstvolgende staal na een hoog staal te herinjecteren. Vanaf de tweede injectie wordt immers geen carry-over meer waargenomen.

Om het carry-over signaal te reduceren en detectorverzadiging, die reeds bij relatief lage ZPCA-waarden optrad te voorkomen, werd in deze methode het ^{13}C -isotoop van ZPCA (339,1 m/z) gemonitord. De hiermee gepaard gaande signaalreductie van circa 80% resulteerde in een meer lineair kalibratieverloop, minder snel optredende detectorverzadiging en lagere carry-over pieken. De gevoeligheid van de methode bleef echter ruim voldoende, aangezien ZPCA in alle stalen aantoonbaar was, zelfs in stalen waarbij het extern laboratorium slechts een spoor rapporteerde.

Relevant evidence/References

1. Eurogenerics NV. Zolpidem EG 10 mg, filmomhulde tabletten. Samenvatting van de productkenmerken [internet]. Brussel: BCFI; 2022 [geraadpleegd op 21/04/2025]. Beschikbaar via: https://www.bcfi.be/nl/chapters/11?frag=7732&trade_family=30320.
2. The misuse of benzodiazepines among high-risk opioid users in Europe [Internet]. Beschikbaar op: www.emcdda.europa.eu/publications/manuals/tdi-
3. Hockenhull J, Black JC, Haynes CM, Rockhill K, Dargan PI, Dart RC, e.a. Nonmedical use of benzodiazepines and Z-drugs in the UK. *Br J Clin Pharmacol*. 1 april 2021;87(4):1676–83.
4. Salvà P, Costa J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem. Therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet*. 1995 Sep;29(3):142-53.
5. Schwoppe DM, DePriest A, Black DL, Caplan YH, Cone EJ, Heltsley R. Determining zolpidem compliance: Urinary metabolite detection and prevalence in chronic pain patients. *J Anal Toxicol*. 1 oktober 2014;38(8):513–8.
6. Schep LJ, Slaughter RJ, Watts M, Mackenzie E, Gee P. The clinical toxicology of ketamine. Vol. 61, *Clinical Toxicology*. Taylor and Francis Ltd.; 2023. p. 415–28.
7. Dinis-Oliveira RJ. Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. Vol. 2, *Forensic Sciences Research*. Taylor and Francis Ltd.; 2017. p. 2–10.
8. nal von minden GmbH. Drug-Screen Ketamine 1000 ng test cassette (individually packed) [Internet]. 2025 [geraadpleegd op 21 aug 2025]. Beschikbaar via: <https://nal-vonminden.com/eng/drug-screen-ket-testkassette-cu1000.html>.
9. Randox Toxicology. ToxPlex MultiSTAT [Internet]. 2025 [geraadpleegd op 21 aug 2025]. Beschikbaar via: <https://randoxtoxicology.com/toxplex/>.
10. Strano Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Frison G, Zancanaro F, Chiarotti M. UHPLC-MS/MS and UHPLC-HRMS identification of zolpidem and zopiclone main urinary metabolites and method development for their toxicological determination. *Drug Test Anal*. 2014;6(3):226–33.
11. Shi Y, Xiang P, Shen B, Shen M. A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of zolpidem and its main metabolites in biological fluids and its application in a forensic context. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 december 2012;911:140–6.
12. Shang E, Choucair I, El-Khoury JM. Unexpected Negative Zolpidem Urine Drug Test in a Compliant Patient. *Clin Chem*. 1 december 2023;69(12):1435–6.
13. Parkin MC, Turfus SC, Smith NW, Halket JM, Braithwaite RA, Elliott SP, e.a. Detection of ketamine and its metabolites in urine by ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 december 2008;876(1):137–42.
14. SCIEX. Compound optimization. [PowerPoint presentatie]: 2025 [geraadpleegd 25 juli 2025]. Interne bron.
15. SCIEX. Compound optimization [PowerPoint presentatie]. Framingham (MA): DH Tech. Dev. Pte. Ltd.; 2025. MKT-34323-B.
16. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on bioanalytical method validation [Internet]. 2009 [geciteerd 20 juli 2025]. Beschikbaar op: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
17. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [Internet]. 2018. Beschikbaar op: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm>
18. European Workplace Drug Testing Society [Internet]. Beschikbaar op: www.ewdts.org.

To do/Actions

- 1) Het aankopen van referentiestandaarden met gekende concentraties om de methodevalidatie te vervolledigen. Dit laat toe de lineariteit formeel te evalueren conform de EMA- en FDA-richtlijnen, en biedt bijkomend inzicht in de werkelijke concentratieniveaus waarmee gewerkt werd.