

Optimalisatie van opsporen zolpidem en ketamine met LC-MS/MS

Gepresenteerd door: Apr. Bob Menten

Supervisor: Apr. Annelies Louwagie

09/09/2025





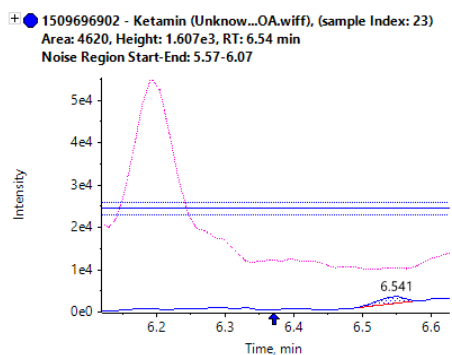
Inhoud

- Casus
- Inleiding
- Component optimalisatie
- Methode & resultaten
- Knelpunten & oplossingen
- Conclusie

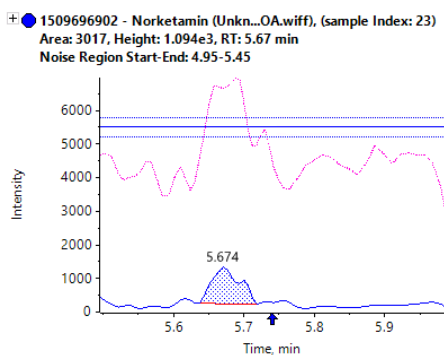
Casus 1

Acute urinaire problematiek

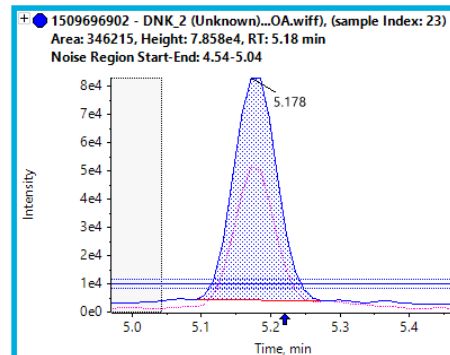
- Opname speed: vrouw van 33 jaar met psychiatrische problematiek opgenomen met ernstige urinaire klachten
 - Symptomen: pollakisurie, urge-incontinentie en dysurie sinds 2 weken
 - Voorgeschiedenis: chronisch druggebruik
 - Werkdiagnose: ketamine-induced cystitis
- Labo:
 - Sint-Trudo: **negatief** (ketamine/norketamine)
 - UZL: **positief** (Dehydronorketamine)



Ketamine



Norketamine

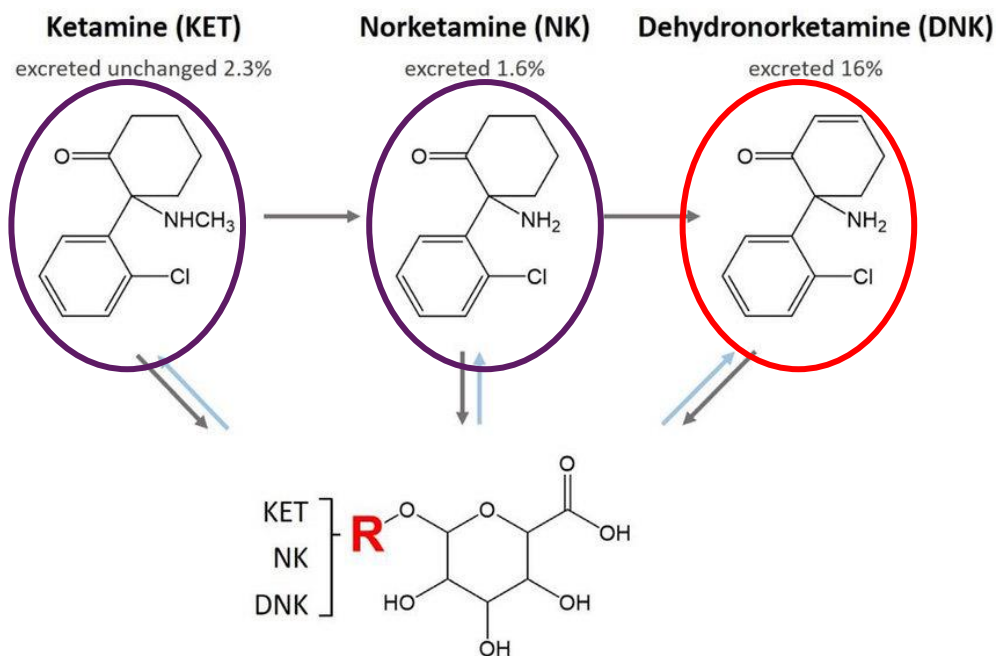


Dehydronorketamine

Inleiding

Ketamine

- Farmacokinetiek
 - Detectievenster urine: **±5d** (ketamine), **±6d** (norketamine), **±10d** (dehydronorketamine; DNK)

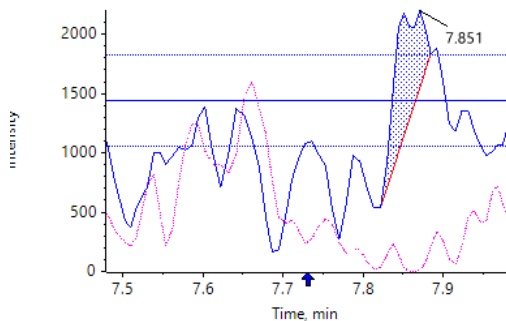


Casus 2

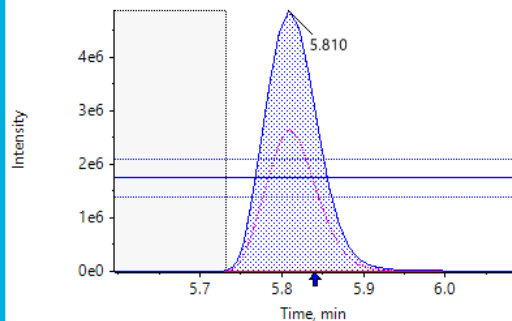
Opname na hervat: wat is er ingenomen?

- Opname: Man van 37 jaar, methadonpatiënt, opgenomen in verslavingskliniek wegens hervat
- Therapie bij opname:
 - Methadon 100mg/d
 - Zolpidem 1x 's avonds
- Labo:
 - Sint-trudo: **negatief** (zolpidem)
 - UZL: **Zolpidem ++** (zolpidem phenyl-4-carboxylzuur)

● 1509750702 - Zolpidem (Unkno...OA.wiff), (sample Index: 51)
Area: 2203, Height: 1.051e3, RT: 7.85 min
Noise Region Start-End: 6.92-7.42



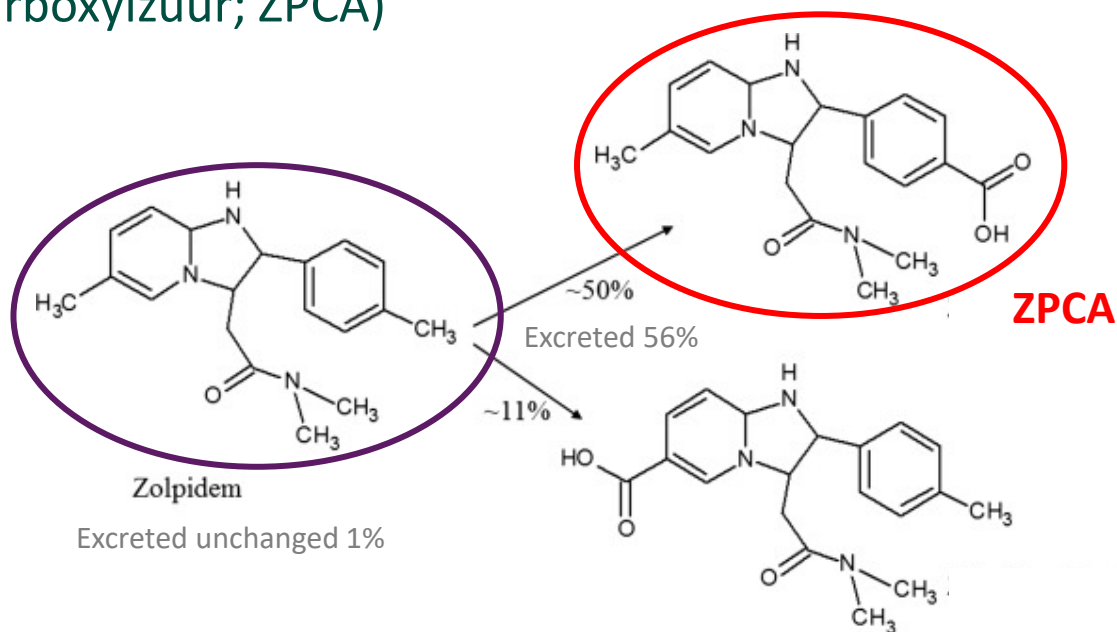
● 1509750702 - ZPCA_2 (Unkno...OA.wiff), (sample Index: 51)
Area: 22290549, Height: 4.868e6, RT: 5.81 min
Noise Region Start-End: 5.23-5.73



Inleiding

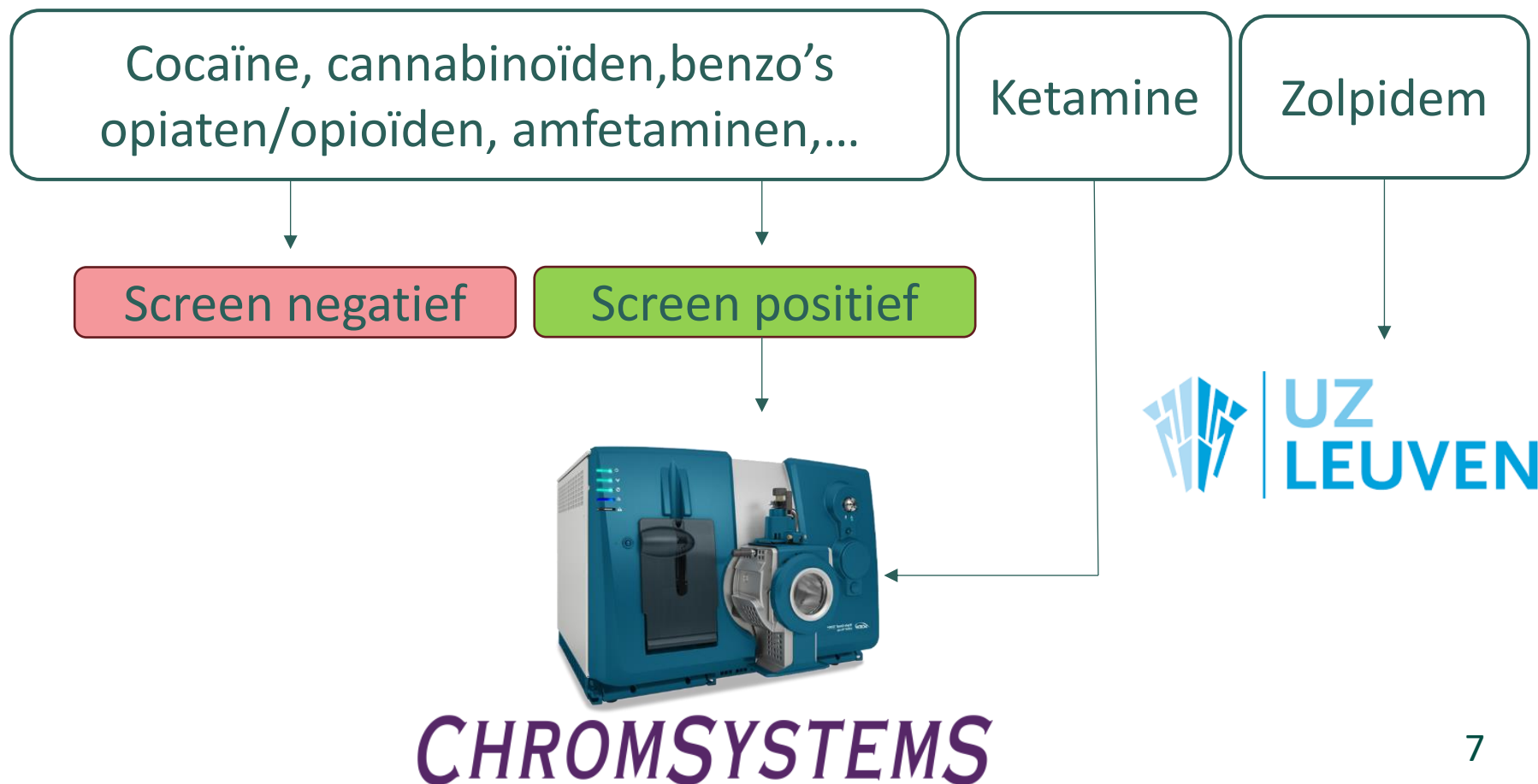
Zolpidem

- Farmacokinetiek
 - Detectievenster urine: $\pm 1d$ (zolpidem), $\pm 3d$ (zolpidem phenyl-4-carboxylzuur; ZPCA)



Inleiding

- Diagnostisch algoritme



Inleiding

CHROMSYSTEMS

- Chromsystems MassTox[®] kit
 - IVD LC-MS/MS methode
 - Kwantitatieve confirmatie van 108 DoA's
 - Amfetamines, barbituraten, benzodiazepines, cannabinoïden, cocaïne, opiaten, Z-drugs,...
 - Run-tijd van 12 minuten
 - Interne standaarden voor 98 analyten
- Beperkingen
 - LLOQ ingesteld op laagste kalibrator
 - Enkele belangrijke metabolieten ontbreken

Doelstellingen

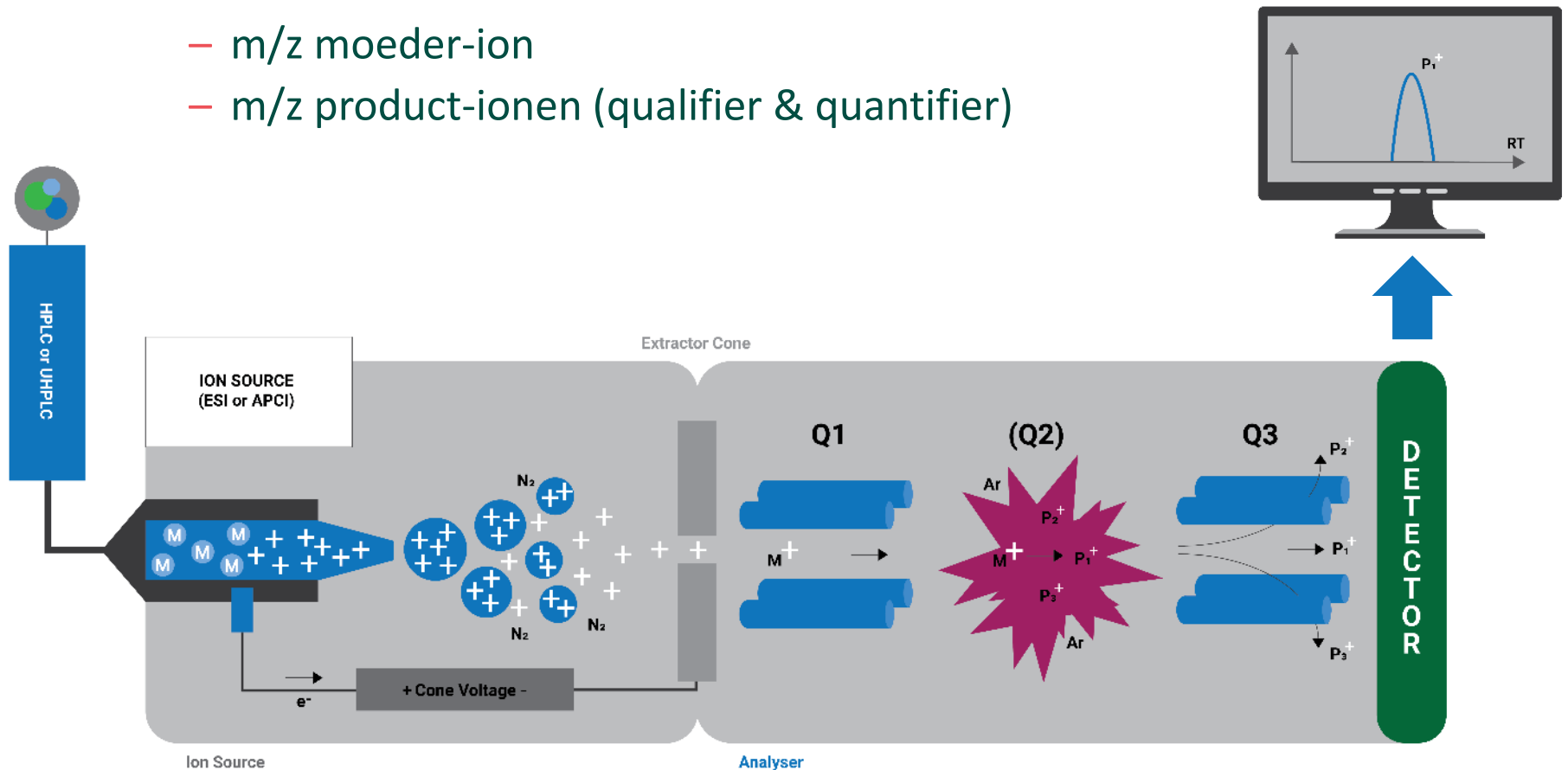


1. Verlagen LLOQ van ketamine, norketamine en zolpidem
2. Toevoegen belangrijkste metabolieten (DNK/ZPCA)

Sensitiviteit↑
Detectievenster↑

Werking LC-MS/MS

- Selectiviteit wordt bekomen door
 - RT
 - m/z moeder-ion
 - m/z product-ionen (qualifier & quantifier)



Component optimalisatie

Stap 1

Een **Q3-scan** dient voor het bepalen van:

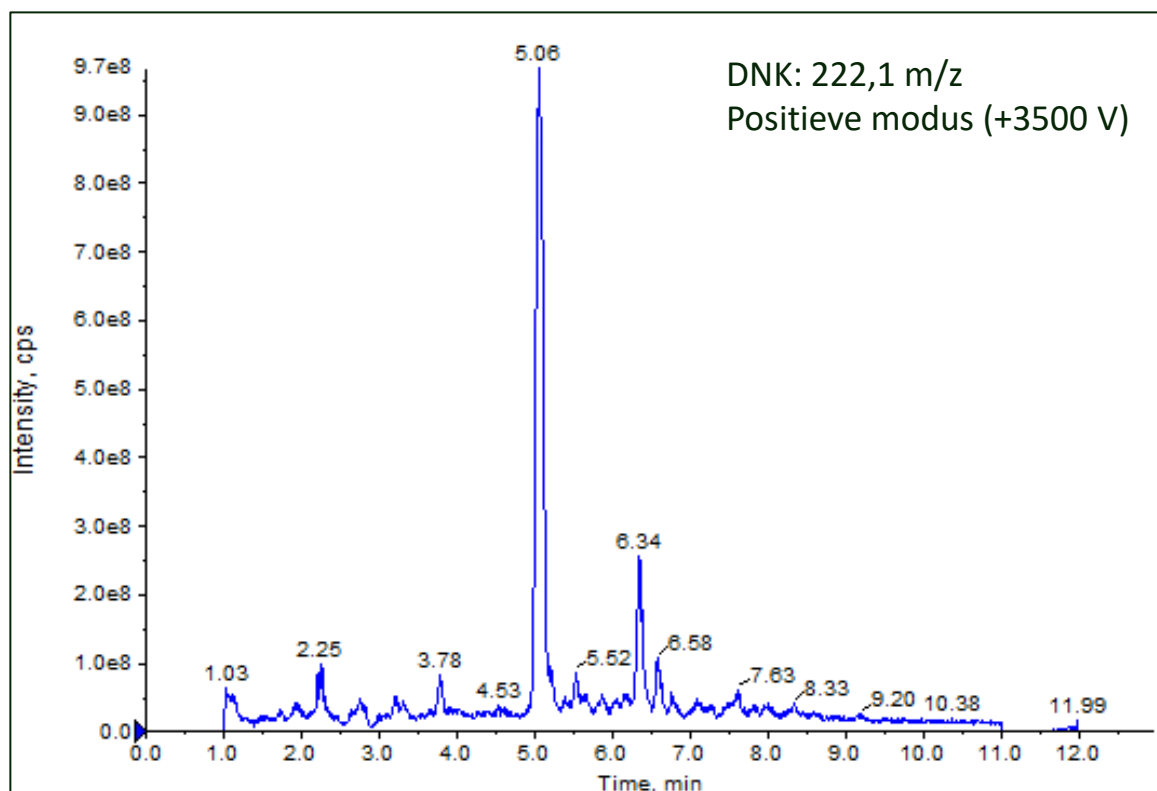
- RT
- Ion-mode
 - Positief of negatieve modus
- Adduct type
 - $[M+H]^+$ $[M+Na \text{ of } K]^+$ $[MNH_4]^+$





Component optimalisatie

Stap 1

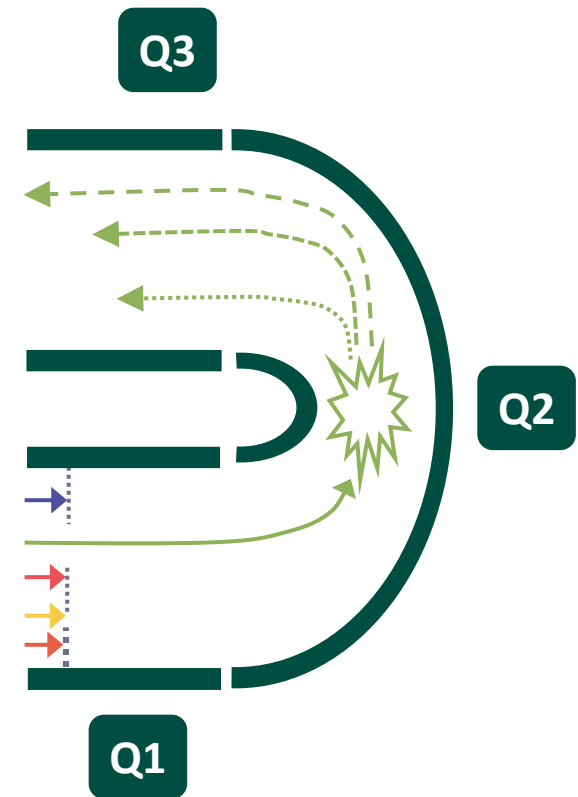


Component optimalisatie

Stap 2

Een **EPI-scan** dient voor het bepalen van:

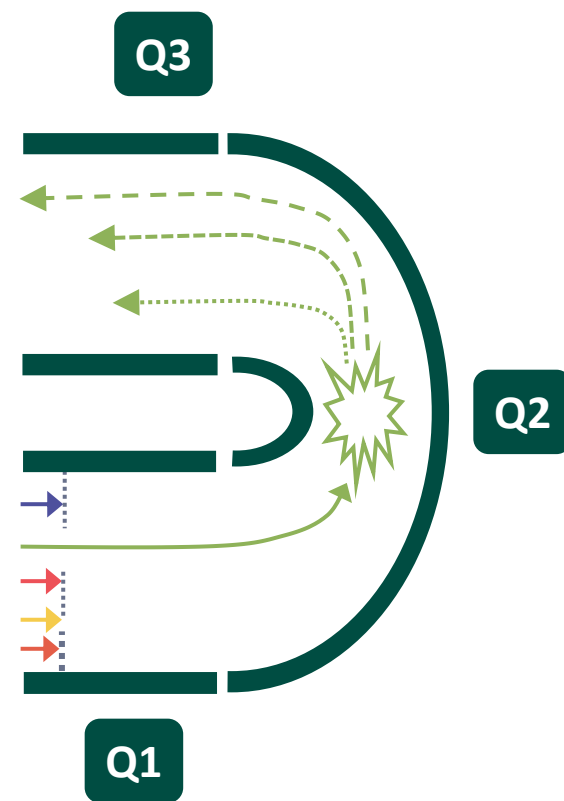
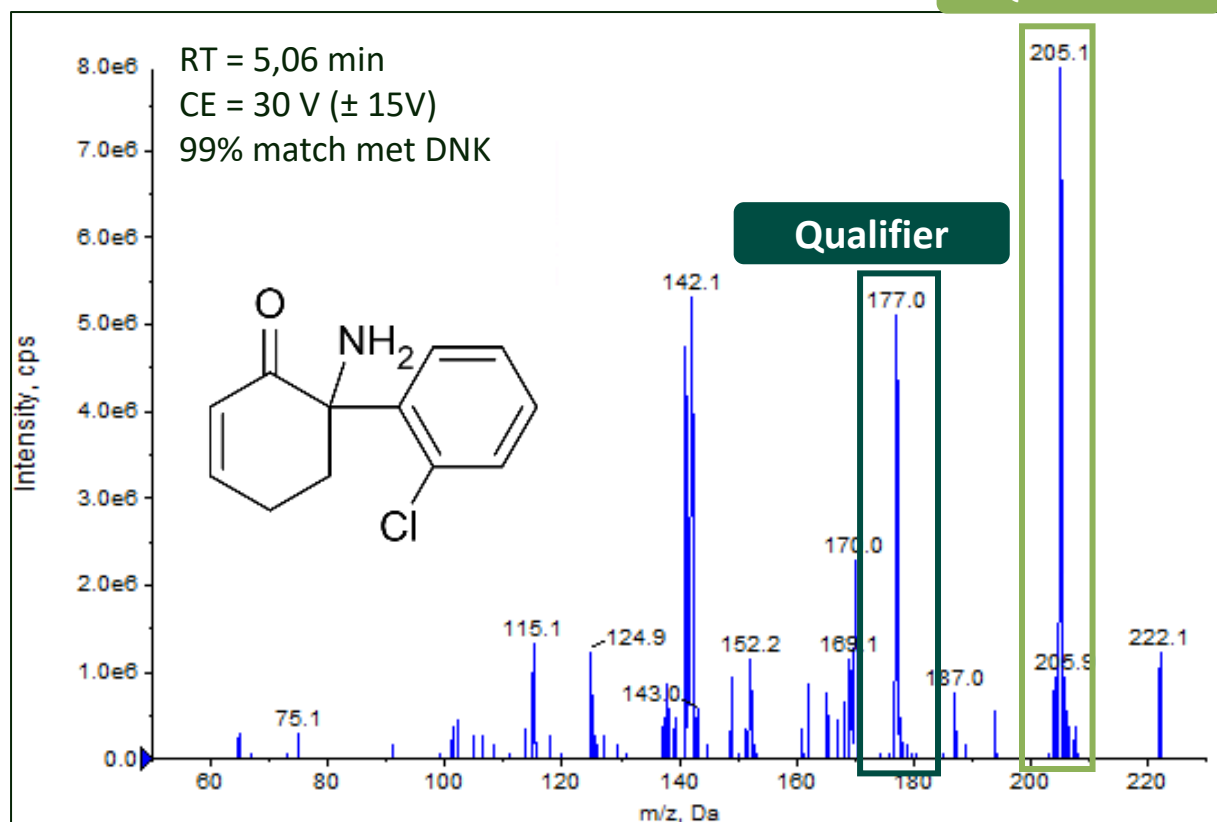
- Fragment-ionen
 - EPI-sepctrum
 - Quantifier en qualifier kiezen
- Library matching





Component optimalisatie

Stap 2

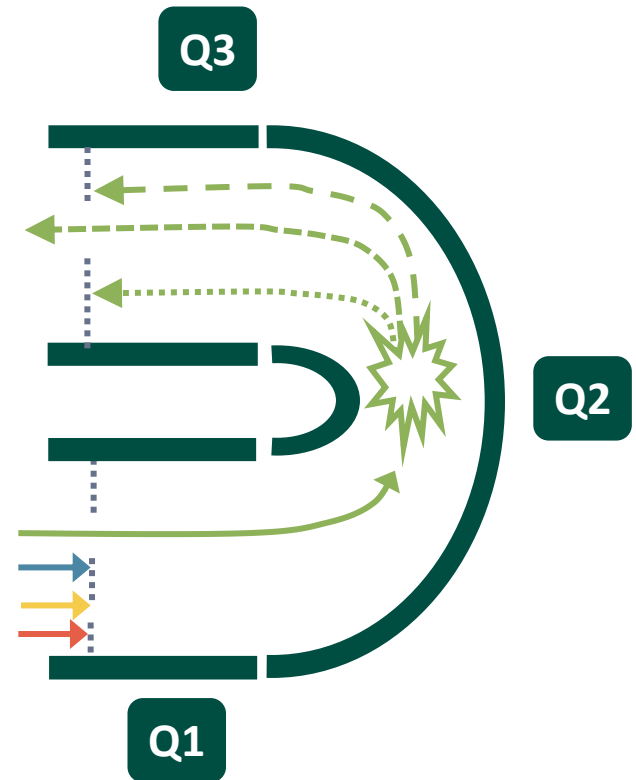


Component optimalisatie

Stap 3

Een **MRM** dient voor het bepalen van:

- Optimale DP
- Optimale CE



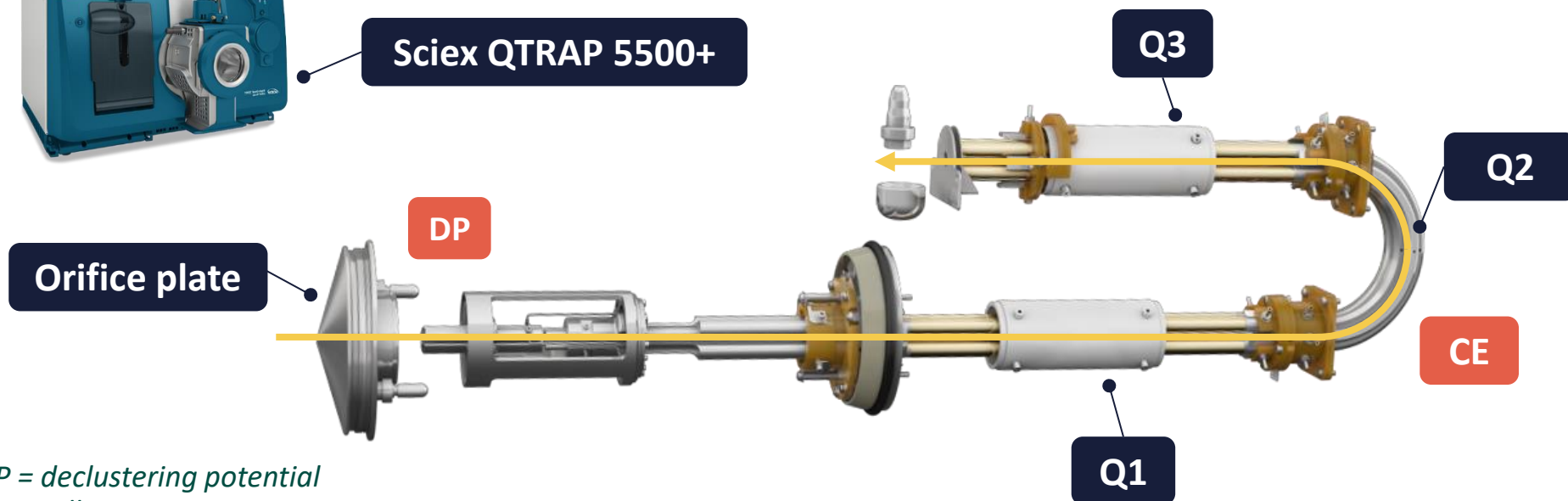


Component optimalisatie

Voltage	Functie	Waarom belangrijk?
DP	Declustering van ionen	Te laag: solventmoleculen plakken aan analyt (intensiteit↓) Te hoog: ongewenste fragmentatie (intensiteit↓)
CE	Fragmenteren van ionen	Te laag: te weinig fragment-ionen (intensiteit↓) Te hoog: enkel ionen met lage m/z blijven over (specificiteit↓)



Sciex QTRAP 5500+

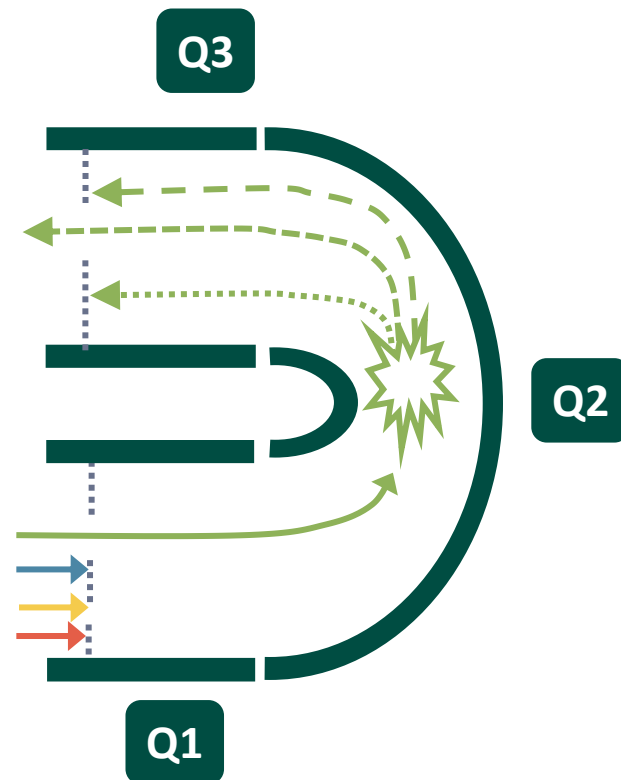
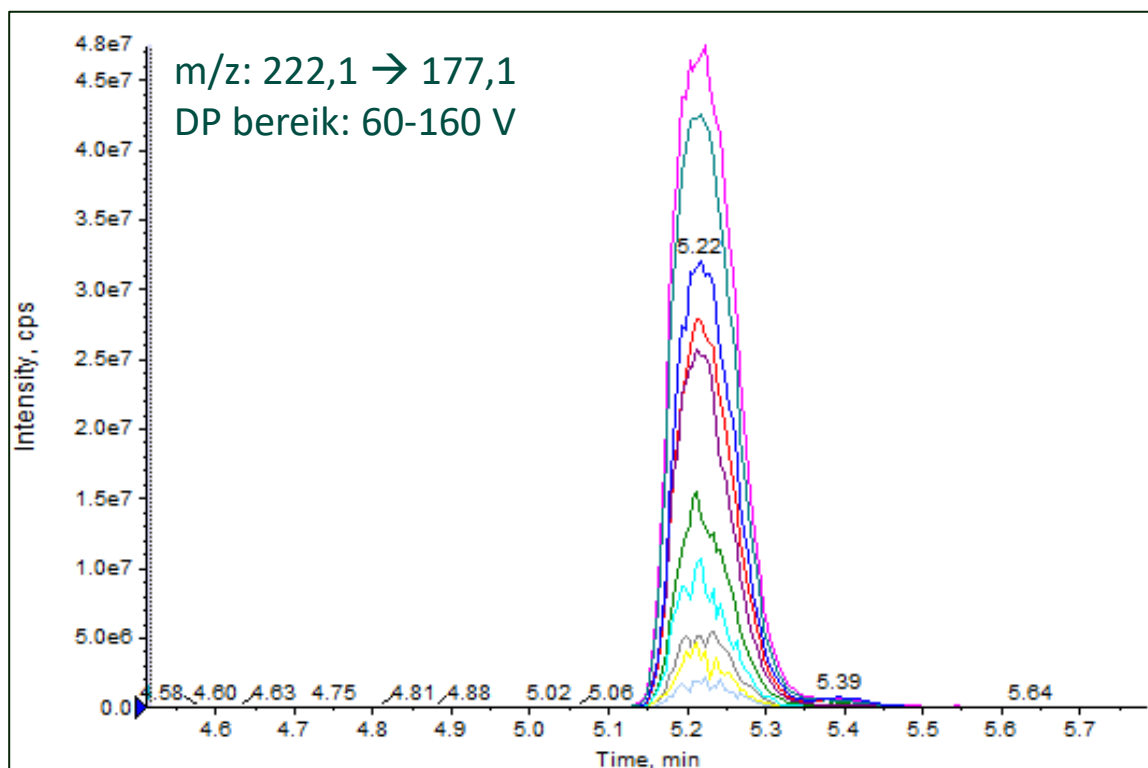


DP = declustering potential
CE = collision energy



Component optimalisatie

Stap 3





Component optimalisatie

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

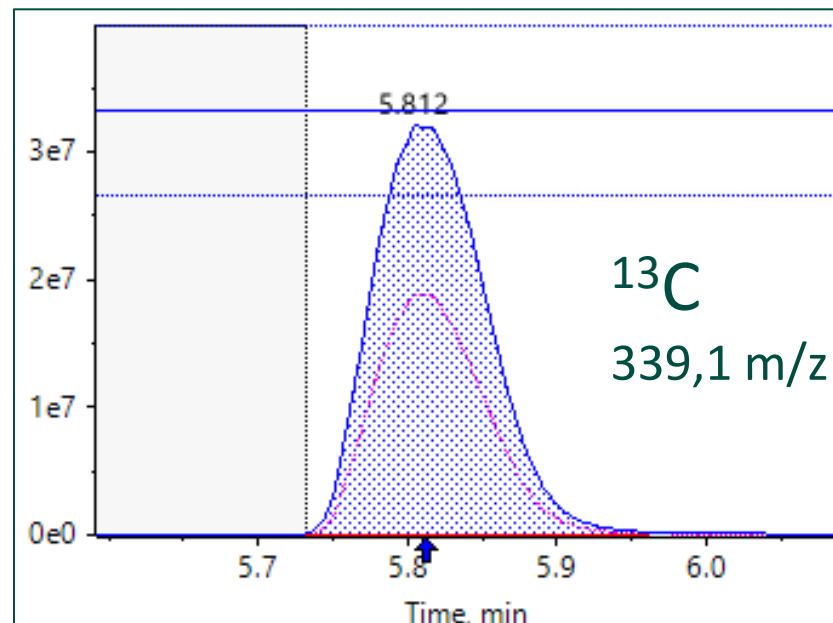
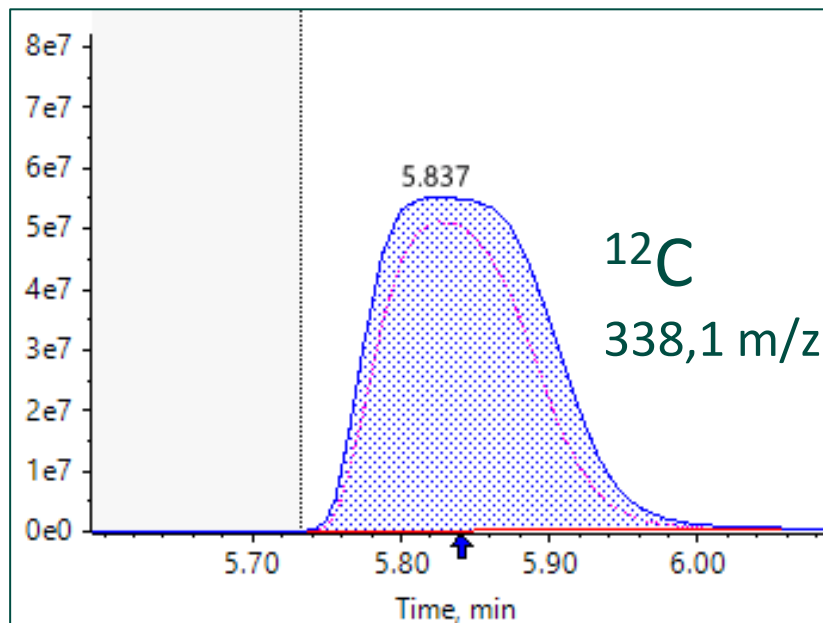


CHROMSYSTEMS



Component optimalisatie

- Hoogste kalibrator (UZL: 3+)





Component optimalisatie

- ^{13}C -isotoop
 - $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3 \rightarrow$ daling signaal met $\pm 82\%$
- Geïndiceerd wanneer saturatie optreedt binnen het gewenste meetgebied

Element	Isotope	Abundance [%]
Hydrogen	^1H	99.985
	^2H	0.015
Oxygen	^{16}O	99.76
	^{17}O	0.04
	^{18}O	0.2
Carbon	^{12}C	98.9
	^{13}C	1.1

Methoden & resultaten

Specificiteit



- 18 negatieve urinestalen (extern getest)
- 25 (ZPCA) & 29 (DNK) positieve stalen (gedeeltelijk extern getest)
- ➔ Geen interfererende componenten gevonden

Lineariteit



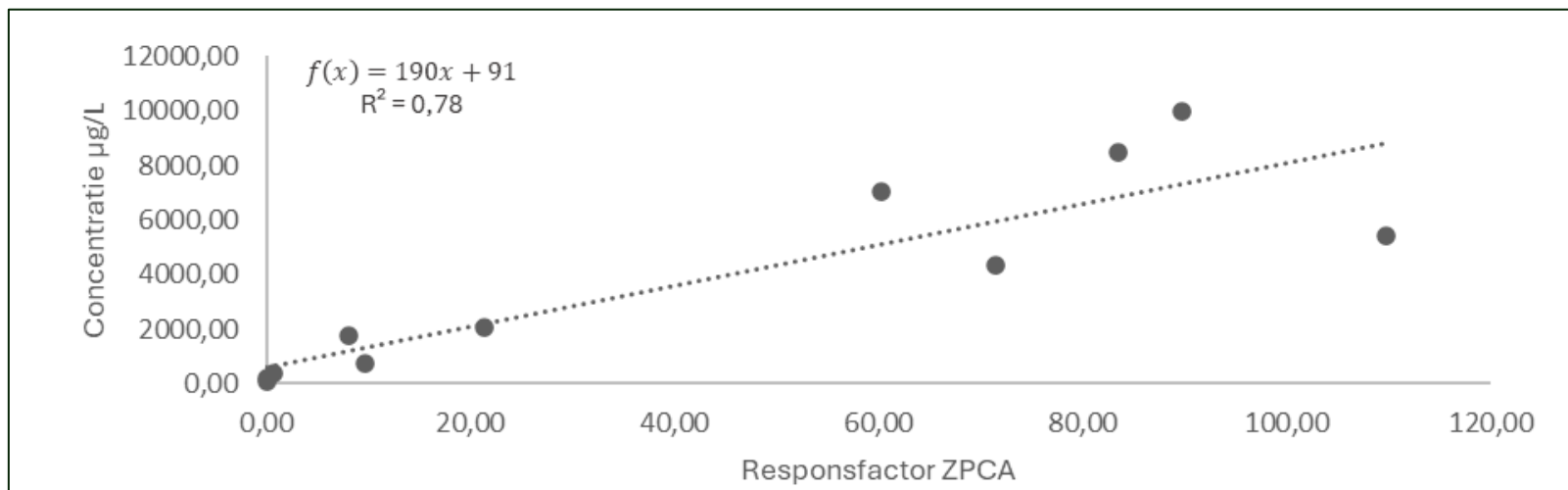
- ZPCA/DNK
 - Geen referentiestandaard met gekende concentratie beschikbaar
 - seriële 1 op 2 verdunningsreeks van hoog staal
- Nauwkeurigheid: $\leq 15\%$ afwijking van nominale waarde ($\leq 20\%$ op LLOQ)
- $R^2 \geq 0.99$

Methoden & resultaten

Methode vergelijking ZPCA

- Extern gemeten concentratie vs. RF
- Geschat bereik kalibratiecurve: $\pm 157 - 4797 \mu\text{g/L}$

$$\frac{AUC (ZPCA)}{AUC (IS)}$$



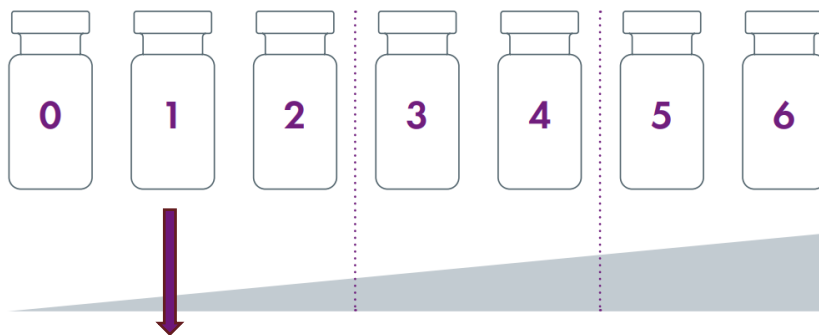
Methoden & resultaten

LLOQ



– Acceptatie criteria

- Accuraatheid: $\leq 20\%$ afwijking van de nominale waarde
- $CV \leq 20\%$



Verdunningen kal 1

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

Methoden & resultaten

Precisie



- ZPCA/DNK: within-run (n = 10) + between-run (n = 5)
- Acceptatie criteria: $CV \leq 15\%$

Carry-over

- Hoogste kalibrator (3x) → blanco (3x)
- Acceptatie criteria: AUC carry-over < 20% van LLOQ
- DNK: geen carry-over
- ZPCA: 0,02% carry-over in eerste blanco injectie

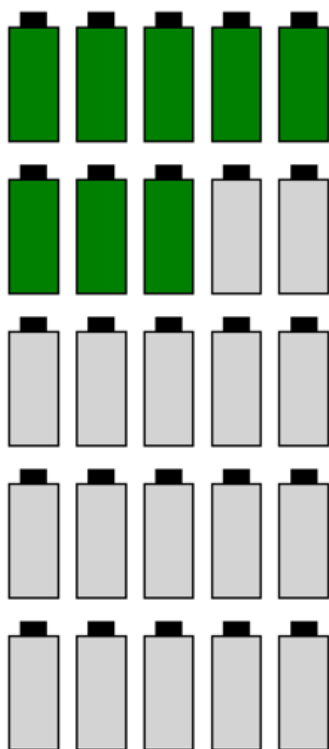


Methoden & resultaten

Sensitiviteit ZPCA

Zopidem

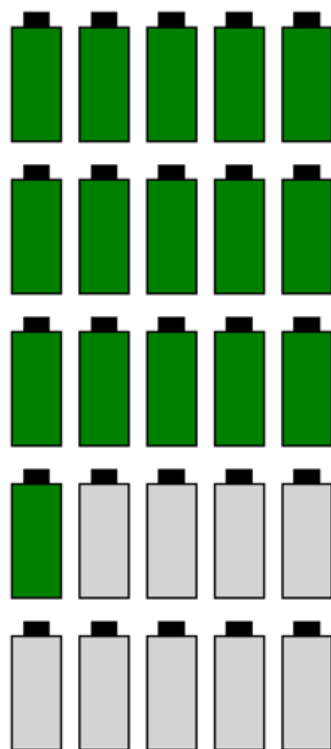
LLOQ = 28,8 µg/ml



Positief: 8/25 (32%)

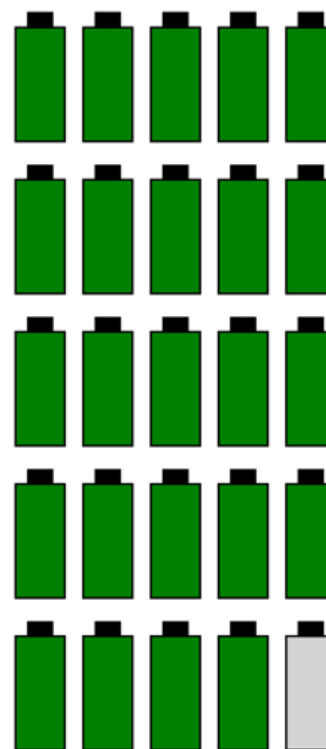
Zolpidem

LLOQ = 8,3 µg/ml



Positief: 16/25 (64%)

ZPCA (RF > 0,072)



Positief: 24/25 (96%)

■ Positief
■ Negatief

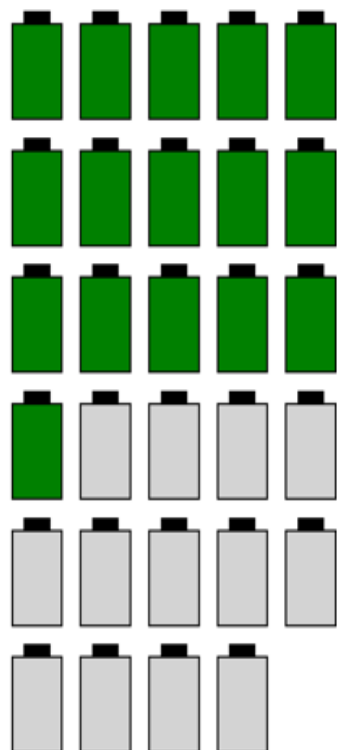


Methode & resultaten

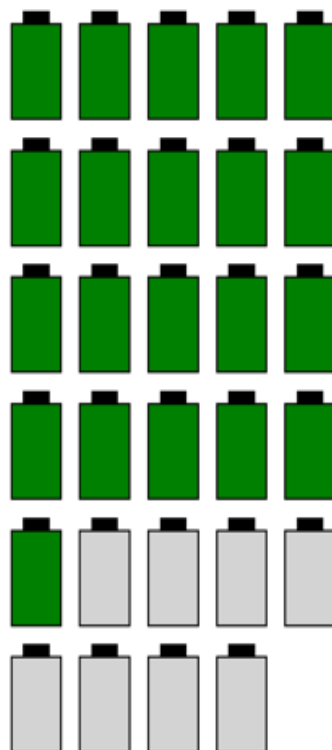
Sensitiviteit DNK

LLOQ (K) = 25,9 µg/ml LLOQ (K) = 5,3 µg/ml
LLOQ (NK) = 27,3 µg/ml LLOQ (NK) = 12,5 µg/ml

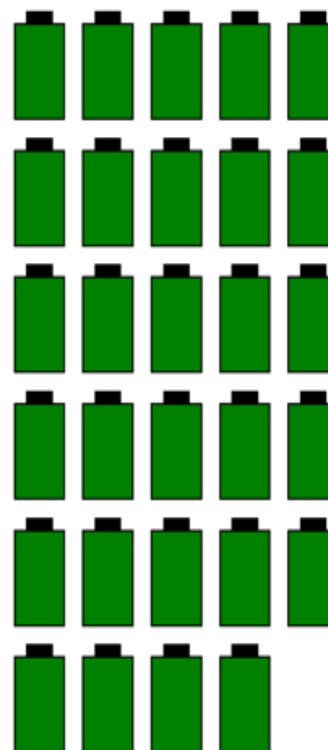
DNK (RF > 0,12)



Positief: 16/29 (55%)



Positief: 21/29 (72%)



Positief: 29/29 (100%)

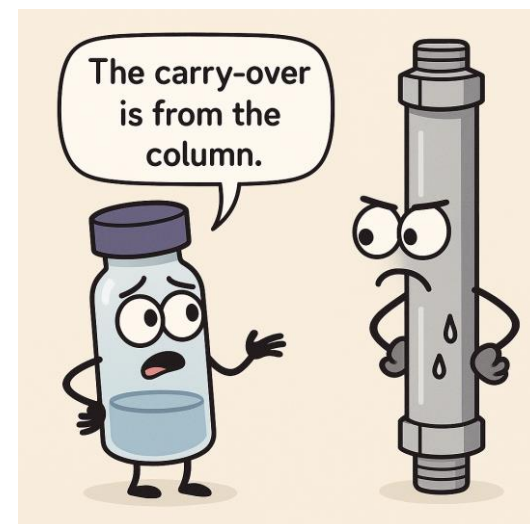
■ Positief
■ Negatief



Knelpunten & oplossingen

- Geen standaarden met gekende concentraties
- Geen deuterium-gelabelde IS voor DNK en ZPCA
- Carry-over ZPCA
 - Geen overdracht tussen vials → vanaf 2^e blanco geen piek meer
 - Extra naaldspoeling geen effect → op kolom?
 - Sterker eluens gebruiken?
 - Praktijkoplossing: blanco injectie → staal controleren

To Do!



Conclusie

- Extra componenten toegevoegd aan Chromsystems kit
 - Q3-scan, EPI-scan en MRM
- Detectievenster ↑ m.b.v. ZPCA en DNK
 - Sensitiviteit zolpidem stalen: 32% → 96%
 - Sensitiviteit ketamine stalen: 55% → 100%
- ZPCA:
 - ^{13}C -isotoop
 - 0,02% carry-over → herinjectie