



UZ  
LEUVEN



## Toxicologisch onderzoek Laboratoriumaspecten

apr. klin. biol. Nele Van den Eede  
07-07-2020

UZ  
Leuven

Herestraat 49  
B - 3000 Leuven

www.uzleuven.be  
tel. +32 16 33 22 11

UNIVERSITY HOSPITALS LEUVEN



## Overzicht

- Analysemethoden
  - Immunologisch
  - GC-MS
  - LC-MS
- Acute intoxicaties
  - Staalsoorten of matrices
  - Productklassen
- Chronisch misbruik en verslaving
  - DOA
  - staalconformiteit
  - Alcoholmisbruik

## Analysemethoden

- Immunologische assay
- Gaschromatografie-massaspectrometrie GC-MS
- Vloeistofchromatografie-massaspectrometrie LC-MS

## Immunologische assay

- 24/24 beschikbaar
- Toxicologische screening: fluorescentie immunoassay, KIMS, EMIT
  - 1 steps methode : binding van antilichaam met drug/geneesmiddel of metaboliet
    - Enzymatische reactie
    - Turbidimetrie
  - LFT

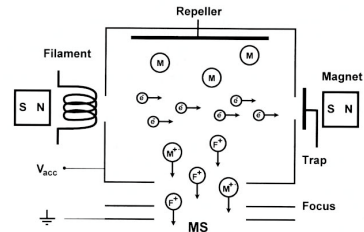
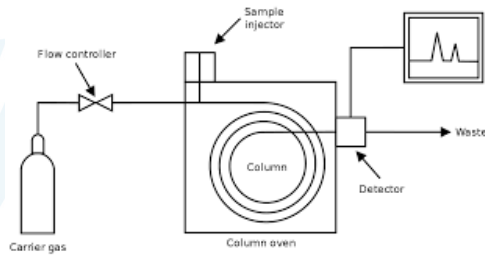
## Immunologische assay

- Targets UZL
  - Nordiazepam
  - Secobarbital
  - Morfine
  - Amfetamine
  - Benzoyllecgonine
  - THC
- Overige mogelijke targets
  - TCA
  - Methadon
  - Methamfetamine
  - Phencyclidine
- **Niet via screening**
  - LSD
  - Ketamine
  - GHB

## Immunologische assay

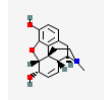
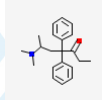
- Kruisreacties mogelijk → steeds **bevestiging** chromatografie (cfr. RIZIV nomenclatuur)
- sommige moleculen binnen zelfde farmacologische klasse hebben beperkte affiniteit : **lagere gevoeligheid**
  - Benzodiazepines: glucuronide metabolieten, clonazepam, lorazepam, prazepam
    - Zolpidem <1% kruisreactiviteit
  - Opioiden: hydromorfone,
    - oxycodone, **fentanyl** <1% kruisreactiviteit

## GC-MS

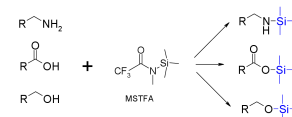


## Gaschromatografie- Massaspectrometrie GC-MS

- Moleculen in gasfase gescheiden over kolom
  - Dampspanning = bepalende factor
    - Molecuulgrootte, polaire functionele groepen
    - Vb: methadon >1000x vluchtiger dan morfine



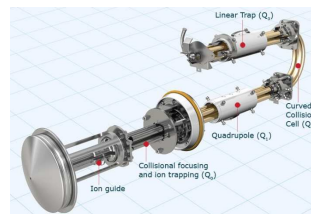
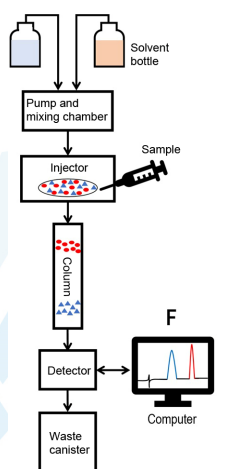
- Eventueel derivatisatie: silylering, acetylering
- Temperatuursgradiënt
- Vluchtigste moleculen elueren eerst
- Moederproduct elueert meestal vóór metabolieten



## GC-MS

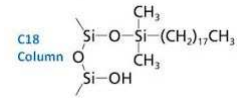
- Staalvoorbereiding
  - Alkalische extractie
  - Lagere gevoeligheid voor zure drugs en metabolieten
- Massaspectrometrie in scan modus
  - Brede analyse
  - Vergelijking met bibliotheken (Pfleger-Maurer-Weber)

## Vloeistofchromatografie- Massaspectrometrie LC-MS



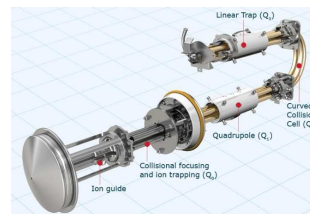
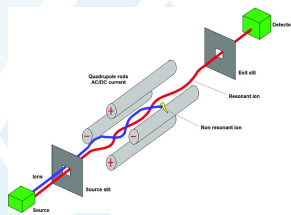
## Vloeistofchromatografie- Massaspectrometrie LC-MS

- Scheiding moleculen in vloeistof over kolom
  - C18 stationaire fase
  - Mobile fase: mengsel van bijv. acetonitrile-water
  - pH mierzuur
  - Polaire moleculen elueren voor apolaire moleculen
    - meestal metaboliet vóór moederproduct
  - Meting glucuronide-metaboliëten mogelijk



## LC-MS

- Massaspectrometrie in MRM modus
  - gerichte analyse : gekende fragmenten en retentietijd
  - Programmatie van transities per tijdstip
    - Gevoelig aan RT shift
  - Belang van correcte samenstelling mobiele fase en staalvoorbereiding



## Chromatografie

- Toevoeging inwendige standaard = Controle proces
  - Extractie
  - Derivatisatie
  - Chromatografie
  - Detectie
  - Interferentie staal
- Kwantitatieve meting
  - Compensatie voor variatie tijdens staalvoorbereiding, injectie, matrix effect

## Inwendige standaard

- Fysicochemisch gelijkaardig aan analyten
- Mogelijkheden:
  - 1) Zelfde farmacologische klasse of chemisch homolog
  - 2) isotoop gelabelde component
    - $^2\text{H}$  (D),  $^{13}\text{C}$ ,
    - Volledig fysicochemisch gelijkend → (bijna) identieke retentietijd
      - Goede compensatie matrixeffecten bij LC-MS

## Chromatografie

- Beperkingen
  - Technische expertise ++
  - Trage methodes (1-4 uur tot resultaat)
  - Chirale moleculen:  
geen onderscheid enantiomeren en diastereomeren op klassieke kolommen
    - Efedrine vs. Pseudoefedrine
    - cathine vs. Norpseudoefedrine



Drugscreening

**ACUTE INTOXICATIES**



## Acute intoxicaties

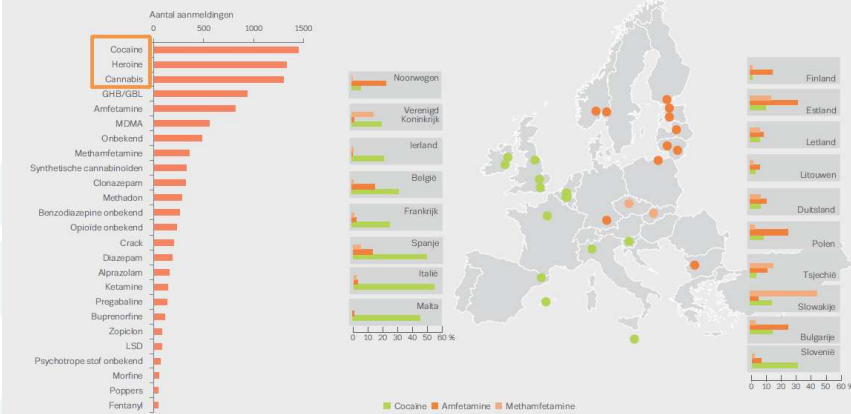
- Labotesten:
  - **Urine**
    - Automatische screeningstesten met immunologische methode
    - Confirmatie a.d.h.v. chromatografische analyse
  - Plasma
    - Klinische interpretatie mogelijk (uitz. Cannabis)
    - Chromatografische analyse (GC-MS, LC-MS) na staalopwerking
      - langere TAT dan urine
  - Maagvocht
    - Analyse niet-geresorbeerde drugs/...
    - Nu minder gebruikt

## Urinescreening: vuistregels

- Een positieve screening is geen bewijs voor klinische intoxicatie:
- Kruisreacties bij immunoassays
- Geen interpretatie mogelijk van:
  - Gebruikte dosis
  - Tijdstip van gebruik
  - Eénmalig, sporadisch of frequent gebruik

## Europa

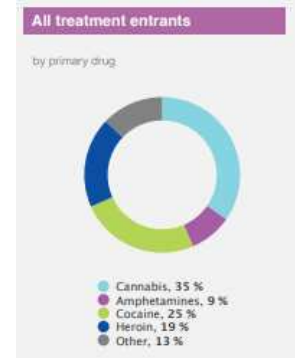
Top 25 van drugs die in 2017 zijn geregistreerd bij spoedgevallen in ziekenhuizen met een sentineelfunctie (links) en frequentie van aanmeldingen voor cocaïne en amfetamines (percentage aanmeldingen), gegroepeerd per land (rechts)



NB: Resultaten van 7 267 aanmeldingen in 26 Euro-Den Plus-ziekenhuizen (met sentineelfunctie) in 18 Europese landen.  
Bron: Europees Netwerk voor drugsgerelateerde spoedgevallen (Euro-DEN plus).

EMCDDA 2019, Euro-DEN (2018)

## Situatie België



## Cocaïne

- Alkaloïde afkomstig van *Erythroxylum coca*
- gebruik: insufflatie, inhalatie, intraveneus
- Symptomen:
  - hypertensie, tachycardie, tachypnoe, mydriase, hyperhidrosis



FIG. 20. — *Erythroxylum coca* (Coca). — *Erythroxylum coca* (Coca). — *Erythroxylum coca* (Coca). — *Erythroxylum coca* (Coca).

## Cocaïne

- pathofysiologie:
  - Ischemie en myocard infarct (frequente oorzaak <45 jaar)
  - Dysrhythmieën
  - Bronchospasme, astma bij roken
  - Perforatie nasaal septum (NKO consultatie)
  - Angio-oedeem

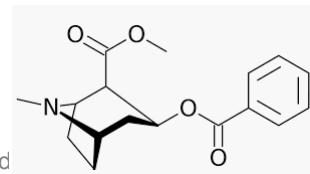
## cocaïne

Cocaïne is slechts 5 uur detecteerbaar in urine

→ Screening : target = [benzoylecgonine](#)

→ gevormd door hydrolyse

→ ca. 40% van gebruikte dosis onder deze vorm geëxcreteerd

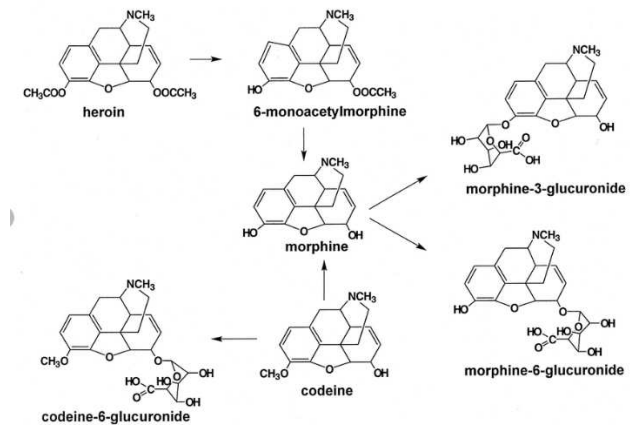


LC-MS:

- ook opsporing van [coca-ethyleen](#): positief bij gelijktijdige ethanolinname
- [Levamisol](#) (anti-helminticum), [fenacetine](#) : versnijdingsmiddelen

## Heroïne

- Semisynthetisch
- Morfine afkomstig uit *Papaver somniferum*
- + Acetylering
- Na inname: hydrolyse naar 6-MAM en morfine



## Heroïne

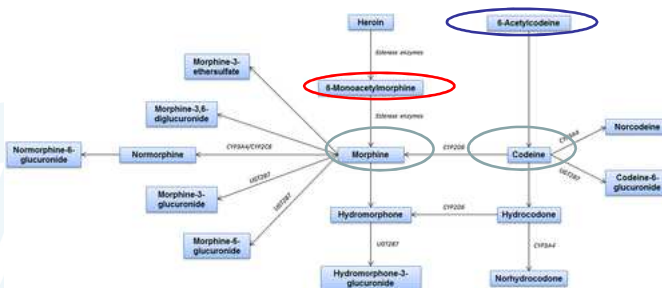
- Gebruik: intraveneus, inhalatie
- Symptomen:
  - Coma
  - Miose (pinpoint pupillen)
  - Ademhalingsdepressie
  - Chronisch: constipatie
  - Letsels IV gebruik

## Codeine

- In combinatie met paracetamol voor pijnstilling
- Wordt deels omgezet naar morfine in lever door CYP2D6
  - ! ultrarapid en extensive metabolizers kunnen hoge concentraties morfine vormen
  - (neonatale dood door morfine in borstvoeding)
 Koren et al. 2006
- Kan ook aanwezig zijn bij heroïnegebruik (metaboliet van 6-acetylcodeïne onzuiverheid)

## opioiden

- 6-acetylmorfine specifiek voor heroïnegebruik



T1/2 6-MAM: 8 uur

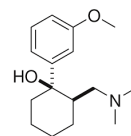
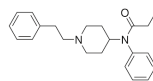
?Onderscheid heroïne en codeïne gebruik indien negatief?

## Onderscheid codeïne morfine heroïne

- Codeïnegebruik en medicinale morfine:
  - geen andere analogen (noscapine,...)
  - Geen papaverine aanwezig ⇔ opium, heroïne
- Maanzaad (poppy seeds) kunnen positieve screening geven...
  - Papaverine, morfine
  - mits inname van 45 g!

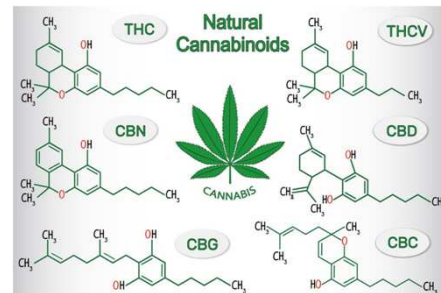
## Synthetische opioïden

- Medicinaal gebruik bij pijnbestrijding
- Synthetische en semisynthetische analogen reageren niet met immunologische methode
  - Oxycodon
  - **Fentanyl en analogen (zeer laag gedoseerd)**
  - Tramadol



## Cannabinoïden

- Natuurlijke afkomstig uit *Cannabis sativa* en *C. indica*
- delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) = actieve component
- Marijuana = gedroogde bloemtoppen van de Cannabis plant

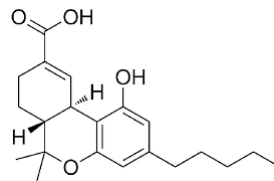


## Cannabinoïden

- Symptomen:
  - euforie
  - Afname cognitieve functies en motoriek
  - nausea, emesis, posturale hypotensie, agitatie, delirium
  - Chronisch gebruik: bronchitis, COPD
    - Nog geen eenduidig verband tussen psychiatrische aandoeningen en langdurig intens gebruik (Nederlandse Drugmonitor 2018)

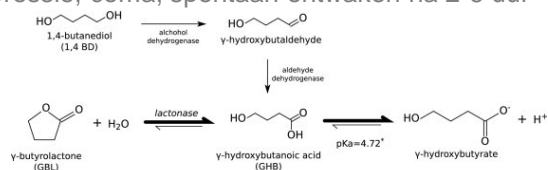
## Cannabinoïden

- Immunoassay
  - Target = 11-nor- $\Delta^9$  THC-9-carboxylic acid ( $\Delta^9$  COOH-THC)
  - kruisreactie met CBD?
  - Zwakke reactie met glucuronide



## Gamma-hydroxyboterzuur

- GHB/liquid XTC
- geen link met MDMA
- vloeistof met zoutsmaak, kleur- en geurloos: orale inname
  - Date rapedrug, maar niet frequent gevonden (kort detectievenster?)
- Effect:
  - Euforie, relaxatie
  - overdosis: ademhalingsdepressie, coma, spontaan ontwaken na 2-6 uur
- Prodrugs: GBL en BD



\* pKa is the acid dissociation constant. When the pH exceeds the pKa, dissociation of the acid is favoured as shown

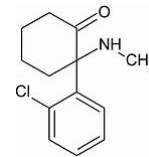


## GHB

- Geen IA screening
- Bepaling met LC-MS
- Zeer korte detectietijd in urine: 6-10 u
- Endogeen aanwezig (<5 mg/l urine)

## Ketamine

- Arylcyclohexanon derivaat
- Actieve metaboliet norketamine
- Medicinaal gebruik in anesthesie
- Oraal (first pass), nasaal of IV/IM gebruik
- Relatief lage mortaliteit bij overdosis
- Lage dosis:
  - lethargie, euforie, hallucinaties, delirium, agressie
- Hoge dosis:
  - hypertensie, tachycardie, hyperthermie, hyperreflexie, zweten en longoedeem

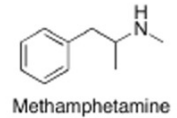
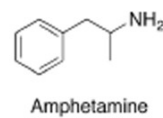
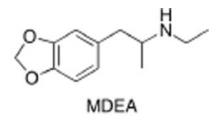
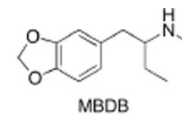
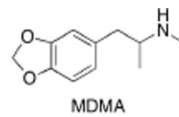


## Ketamine

- Bepaling via LC-MS
  - Ketamine, norketamine
  - Afhankelijk van dosis tot 14 dagen detecteerbaar

## Stimulantia: amfetamine-analogen

- Synthetische drugs
- Orale inname
- Amfetamine (speed)
- MDMA (XTC)
- Methamfetamine (crystal meth)



## Amfetamines

- Amfetamine, methamfetamine
- Noradrenerge dopaminerge neurotransmittersysteem
- Effect:
  - Stimulerend, Insomnia
  - Hypertensie, tachycardie, arrytmie
  - Levensbedreigende hyperthermie
- Complicaties
  - Uitputting, anorexie
  - Stemmingsstoornissen, psychotische stoornissen
  - Myocard infarct, CVA, leverfalen

## Amfetamines

- MDMA
- Ook effect op serotonerg neurotransmittersysteem
  - Stimulerend en entactogeen
- Effecten:
  - Tachycardie, hypertensie, arytmie,
  - Hyperthermie,
  - hyponatriëmie
  - Coma
  - Psychiatrische verschijnselen: psychose, hallucinaties, angst
  - Chronisch: aanhoudende visuele waarnemingsstoornissen
  - Epileptische insulten

## Kruisreactiviteit immunologische methode

Afhankelijk van producent

→ Probleem van vals-positieve reacties:

bijv. m-CPP metaboliet van trazodon, (pseudo)efedrine, metoprolol

→ Voordeel om verschillende analogen op te sporen:

Goede kruisreactiviteit met PMA, PMMA, MDMA, MDA

Beperkte kruisreactiviteit met cathinones en fluoroamfetamine

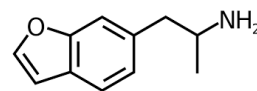
## New Psychoactive Substances

- Meest gedetecteerde NPS

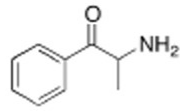
- 4-FA en 4-FMA (effect ~amfetamine en MDMA)

- 6-APB en 5-APB (“Benzofury”)

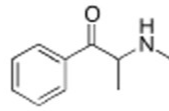
- 3-MMC of mephedrone (4-MMC)



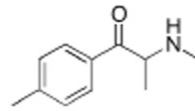
## Cathinones



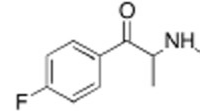
Cathinone



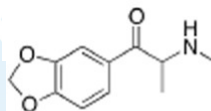
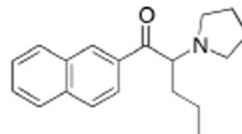
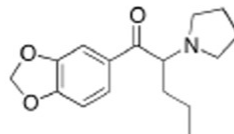
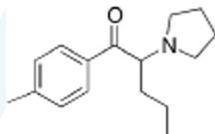
Methcathinone



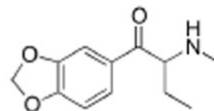
Mephedrone



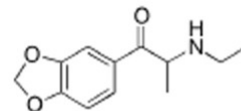
Flephedrone



Methylone



Butylone



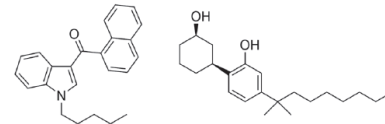
Ethylone

## Cathinones

- “bath salts”
- Orale inname, ook intraveneus
- Effecten:
  - Stimulerend
  - Paranoia, hallucinaties, paniekaanvallen, delirium

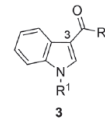
## NPS

Synthetische cannabinoïden:  
Gebruikt in lage concentratie  
Tot nu toe nog weinig gedetecteerd  
(Drug Monitor 2018)

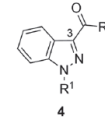


JWH-018 (1)

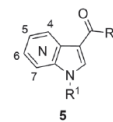
Cannabicyclohexanol (2)



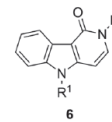
3



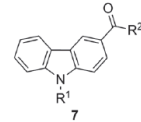
4



5



6



7

## CHRONISCHE INTOXICATIES EN VERSLAVING

## Drugs of abuse

- Testen idem acute intoxicatie
- Voorkeur voor urine als staaltype
  - Langer detectievenster dan plasma
  - Eenvoudige high throughput verwerking
  - Stabiliteit is >5 dagen bij 2-8°C voor meeste drugs
    - THC en metabolieten: container polypropyleen, PE, polycarbonaat
    - GHB: stabiel bij -20°C
  - ! Vervalsing mogelijk

SCDAT 2012

**TABLE 2**  
Length of Time Drugs of Abuse Can Be Detected in Urine

Drug	Time
Alcohol	7-12 h
Amphetamine	48 h
Methamphetamine	48 h
Barbiturate	
Short-acting (eg, pentobarbital)	24 h
Long-acting (eg, phenobarbital)	3 wk
Benzodiazepine	
Short-acting (eg, lorazepam)	3 d
Long-acting (eg, diazepam)	30 d
Cocaine metabolites	2-4 d
Marijuana	
Single use	3 d
Moderate use (4 times/wk)	5-7 d
Daily use	10-15 d
Long-term heavy smoker	>30 d
Opioids	
Codeine	48 h
Heroin (morphine)	48 h
Hydromorphone	2-4 d
Methadone	3 d
Morphine	48-72 h
Oxycodone	2-4 d
Propoxyphene	6-48 h
Phencyclidine	8 d

## Detectievenster in urine

- afhankelijk van gebruikte cutoff
- Afhankelijk van éénmalig of herhaald gebruik

Moeller et al. Mayo Clinics Proceedings 2008

## Cutoffs voor DOA in urine

- SAMHSA 2010

Initial test analyte	Initial test cutoff *	Confirmatory test analyte	Confirmatory test cutoff concentration
Marijuana metabolites (THCA) <sup>2</sup> ...	50 ng/mL <sup>3</sup> .....	THCA .....	15 ng/mL
Cocaine metabolite	150 ng/mL <sup>3</sup> .....	Benzoylcegonine .....	100 ng/mL
Codeine/Morphine .....	2,000 ng/mL .....	Codeine .....	2,000 ng/mL
Hydrocodone/Hydromorphone .....	300 ng/mL .....	Morphine .....	2,000 ng/mL
Oxycodone/Oxymorphone .....	100 ng/mL .....	Hydrocodone .....	100 ng/mL
6-Acetylmorphine .....	10 ng/mL .....	Hydromorphone .....	100 ng/mL
Phencyclidine .....	25 ng/mL .....	Oxycodone .....	100 ng/mL
Amphetamine/Methamphetamine ..	500 ng/mL .....	Oxymorphone .....	100 ng/mL
MDMA <sup>4</sup> /MDA <sup>5</sup> .....	500 ng/mL .....	6-Acetylmorphine .....	10 ng/mL
		Phencyclidine .....	25 ng/mL
		Amphetamine .....	250 ng/mL
		Methamphetamine .....	250 ng/mL
		MDMA .....	250 ng/mL
		MDA .....	250 ng/mL

<->Cutoff 300 ng/mL:  
Meer positieven door codeïne gebruik  
Kleiner risico om heroïnegebruik te missen  
Moore et al. JAT 2001

## Controle van staalconformiteit urine

- Temperatuur
  - zeer betrouwbare indicator voor vervalsing en verwisseling
  - 32-38°C gedurende eerste 4 min na **afname**
- Geur
- Kleur
- Troebelheid
- **Creatinine** : 5 mg/dL bij (jong)volwassenen = vervalst staal  
5-19 mg/dL bij (jong)volwassenen : verdund staal



## Controle van staalconformiteit urine

- Andere aspecten:
  - Soortelijk gewicht (<1.001 of >1.020)
  - pH <4 of >=11
  - Aanwezigheid
    - Glutaaraldehyde
    - Nitrieten >500 µg/ml
    - Hypochloriet
    - Chromaten (incl. PCC)
    - Oxidantia

SCDAT 2012

## Alcoholmisbruik

- Ethanol in urine
  - Detectievenster tot 10 u na inname
- Ethylglucuronide en ethylsulfaat
  - Mineure metabolieten
  - Directe merkers alcoholgebruik
  - Urine: tot 1-2 dagen na inname
    - abstinentiemonitoring

## Alcoholmisbruik

- CDT : Carbohydrate deficient transferrine
  - **Indirecte** parameter voor overmatig drankgebruik
  - Stijgt boven cutoff indien consumptie van >50-80 g/dag over minstens 2 weken
  - Niet geschikt voor abstinentiemonitoring
  - Slechts 70% specificiteit bij cirrose
  - mogelijke interferentie glycosylatiedefecten