

## MASTER

### Karakterisering van uremisch ultrafiltraat met gaschromatografie, massaspectrometrie, en isotachoforese

Schoots, A.C.

*Award date:*  
1978

[Link to publication](#)

#### **Disclaimer**

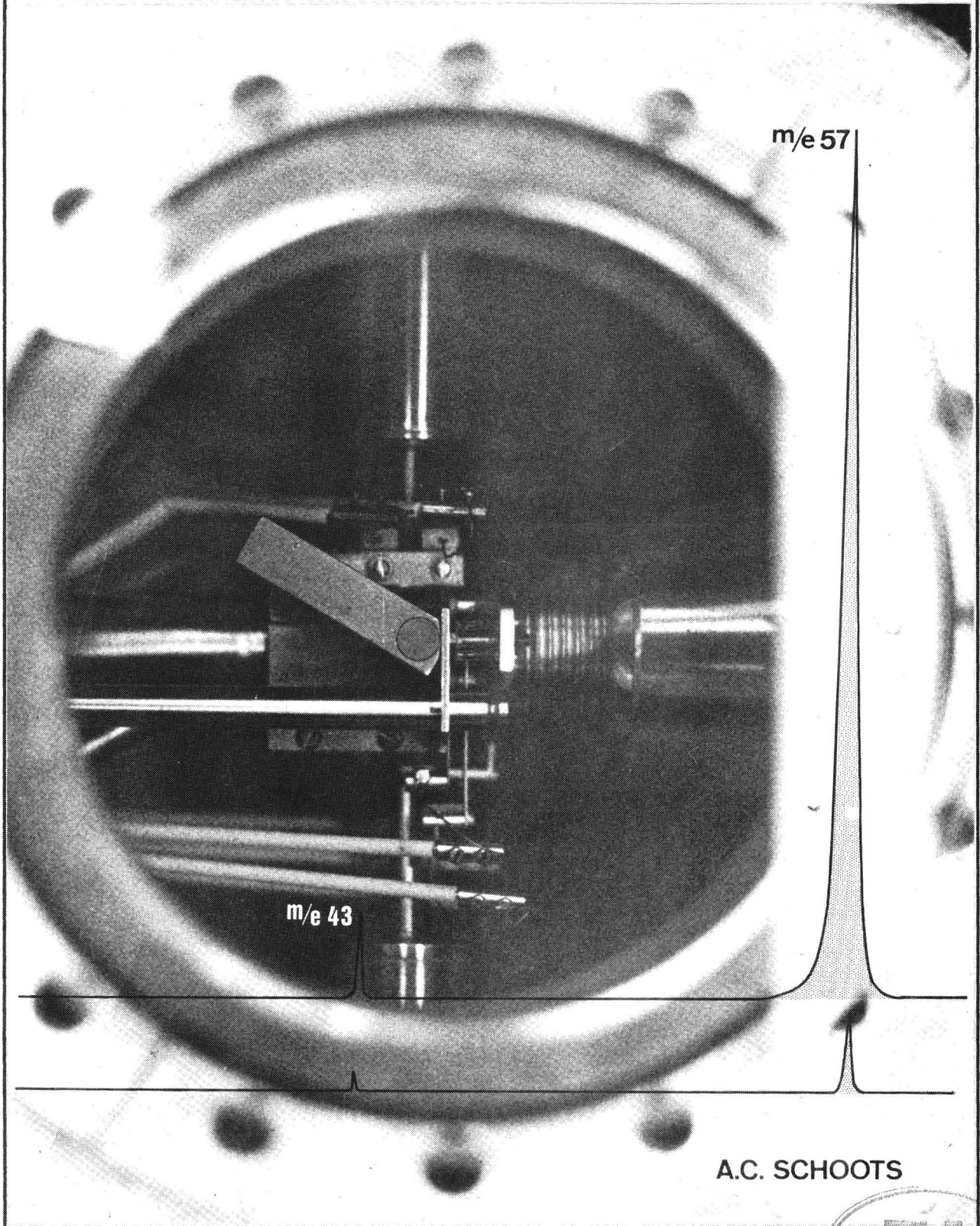
This document contains a student thesis (bachelor's or master's), as authored by a student at Eindhoven University of Technology. Student theses are made available in the TU/e repository upon obtaining the required degree. The grade received is not published on the document as presented in the repository. The required complexity or quality of research of student theses may vary by program, and the required minimum study period may vary in duration.

#### **General rights**

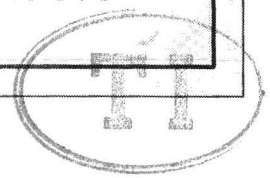
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain

# KARAKTERISERING VAN ULTRAFILTRAAT VAN UREMISCHE PATIENTEN met gaschromatografie massaspectrometrie en isotachoforese



A.C. SCHOOTS



TECHNISCHE HOGESCHOOL EINDHOVEN  
AFDELING DER SCHEIKUNDIGE TECHNOLOGIE  
LABORATORIUM VOOR INSTRUMENTELE ANALYSE

KARAKTERISERING VAN UREMISCH ULTRAFILTRAAT MET GASCHROMATOGRAPHIE  
MASSASPECTROMETRIE, EN ISOTACHOFORSE.

- Massaspectrometrische profilering van ultrafiltraat met chemische ionisatie massaspectrometrie.
- Indirekte koppeling van isotachoforese en massaspectrometrie toegepast op uremisch ultrafiltraat.
- Gaschromatografie-Massaspectrometrie van ultrafiltraatmonsters.

afstudeerdocent:

Dr. Ir. C.A.M.G. Cramers

afstudeercoach:

Dr. Ir. P.A. Leclercq

Ad Schoots

30 augustus 1978.

\*\*\*  
( Bij de voorpagina: Finnigan EI/CI-ionenbron en belangrijkste ionen uit isobutaanionenplasma).

Onderwerp : Karakterisering van uremisch ultrafiltraat met gaschromatografie, massaspectrometrie en isotachoforese.

Docent : Dr. Ir. C.A.M.G. Cramers

Laboratorium : Instrumentele Analyse Datum : 30 augustus 1978

Samenvatting : Bij chronische nierpatienten, die onder regelmatige dialyse-behandeling staan, kan een combinatie van symptomen worden waargenomen, die men de "uremie", of de "uremische toestand" noemt. Deze symptomen worden op direkte of indirecte wijze veroorzaakt door afbraakprodukten uit het lichaam, die tengevolge van de verminderde nierfunctie worden opgehoopt in het bloed. Over de aard van de verantwoordelijke componenten en de mechanismen volgens welke deze de symptomen veroorzaken, bestaat nog onvoldoende inzicht. Naast de laagmoleculaire componenten die vooral in het verleden verantwoordelijk werden geacht voor de uremische toestand, staan op dit moment de zogenaamde "middle molecules", stoffen met een molekulgewicht tussen 300 en 1500, in het centrum van de belangstelling. Experimenten met verschillende dialysestrategieën, en onderzoek naar de enzyminhibitie en cytotoxiciteit van verschillende stoffen konden tot op heden niet leiden tot een beoordeling dat de éne of andere groep stoffen verantwoordelijk is .

Om het inzicht in de aard der opgehoopte componenten te verdiepen, werden een aantal technieken toegepast op de analyse van serum-ultrafiltraat van uremische patienten. Het serum-ultrafiltraat is het geheel van componenten uit het bloed die een filter met een molekulgewichtsgrens van 5 à 6000 passeren ("alles behalve de eiwitten").

Voor de massaspectrometrische profilering van serum-ultrafiltraat werden monsters hiervan zodanig mild geïoniseerd door middel van chemische ionisatie (CI), dat de verkregen spectra in molekulgewichtprofielen resulteerden. Een standaard profileringsmethode werd ontwikkeld met het reaktiegas isobutaan. Kwalitatieve en semi-kwantitatieve verschillen konden worden waargenomen in de profielen van serum-ultrafiltraat vóór dialyse, na dialyse, en van gezonde personen.

Om uitspraken te kunnen doen over de aard van de opgehoopte componenten is het in de toekomst noodzakelijk om met behulp van de "multiple ion detection"-techniek, en één of meerdere interne standaarden, kwantitatieve analyses te doen. Verder lijkt het zinvol het ammoniak als CI-reaktiegas verder te testen, zodra het mogelijk wordt een verdund mengsel hiervan in methaan of isobutaan aan de MS-bron toe te voeren.

Verder werd een poging gedaan zones, en gebiedjes met verschillende zones uit isotachoforetische scheidingen te isoleren, en massaspectrometrisch te analyseren. Daarvoor werd een geschikt elektroliet-systeem gekozen, zodat MS-analyses konden plaatsvinden zonder storing van componenten uit het elektrolietsysteem. Ondanks het feit dat in de isotachoforese géén verdunning van componenten optreedt, zoals in de chromatografische technieken, waren de intensiteiten van de MS-pieken vrij laag. Daarom lijkt het nuttig om enerzijds de isolatiemethode te verfijnen en anderzijds onderzoek te doen naar MS-detecteerbaarheid van componenten in welgedefinieerde mengsels na isotachoforetische scheiding.

Tot slot werd een gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS)-methode beproefd die heeft geleid tot de identifikatie van een 14-tal componenten in één specifiek ultrafiltraatmonster. Deze componenten zijn: ureum, glycerol, fosforzuur, appelzuur, erythritol (en/of threitol), erythronzuur, 2-deoxyerythropentonzuur, arabinitol, wijnsteenzuur,  $\alpha$ -D-glucose,  $\beta$ -D-glucose, glucitol(of mannitol), en inositol. In andere uremische ultrafiltraatmonsters bleek een groot deel van deze componenten ook aanwezig. Voor de GC-MS analyse werden verschillende aspecten van de monstervoorbewerking onderzocht en geoptimaliseerd, zoals de aard van het derivatiseringsreagens en een "solvent"-extraktiemethode. Voor toekomstige experimenten lijkt het aan te bevelen de zure componenten uit het ultrafiltraat te isoleren met anionwisselingschromatografie. Alhoewel een aantal componenten werden geïdentificeerd zijn we niet toegekomen aan het identificeren van verschilgebieden tussen serumultrafiltraat van patienten vóór en ná dialyse en van gezonde personen. Daarvoor moet eerst een serie GC-experimenten worden uitgevoerd om deze verschilgebieden aan te wijzen.

## INHOUDSOPGAVE.

HOOFDSTUK I, Fysiologische en klinische aspecten van het nierfalen.	
I.1. Inleiding .....	1
I.2. Fysiologie en bouw van de nier .....	3
I.3. Verschillende nierziekten .....	8
I.4. Uremie en haar behandeling .....	12
I.5. Bekende en onbekende uremische toxinen .....	18
HOOFDSTUK II, Analytisch onderzoek naar aanleiding van het nierfalen.	
II.1. Analytisch onderzoek aan lichaamsvloeistoffen van uremische patienten .....	23
II.2. Profilering van uremisch ultrafiltraat met chemische ionisatie massaspectrometrie .....	25
II.2.1. Chemisch ionisatie massaspectrometrie .....	25
II.2.2. Profilering met directe CI-MS .....	32
II.2.3. Experimenteel, de keuze van operationele parameters .....	34
II.2.3.1. Keuze van het reaktiegas .....	34
II.2.3.2. Keuze van de brontemperatuur .....	37
II.2.3.3. De elektronenenergie .....	39
II.2.3.4. De druk van het reaktiegas .....	40
II.2.3.5. De quadrupole offsetspanning .....	42
II.2.4. Apparatuur en materialen .....	44
II.2.5. Methoden .....	44
II.2.6. Resultaten en interpretatie .....	46
II.2.6.1. Isobutaan als reaktiegas .....	46
II.2.6.2. Ammoniak als reaktiegas .....	51
II.2.7. Verdere mogelijkheden van de methode .....	53
II.3. Indirekte koppeling van isotachoforese en massa- spectrometrie toegepast op uremisch ultrafiltraat ..	54
II.3.1. Isotachoforese .....	54
II.3.2. Profilering met behulp van isotachoforese .....	55
II.3.3. Operationele parameters .....	56
II.3.3.1. Keuze van het elektrolietsysteem .....	56
II.3.3.2. Het testen van kleurstoffen .....	59

II.3.4. Apparatuur en methode .....	60
II.3.5. Experimenten .....	61
II.4. Gaschromatografie-Massaspectrometrie (GC-MS) van uremisch ultrafiltraat .....	65
II.4.1. Inleiding .....	65
II.4.2. Gaschromatografie .....	67
II.4.2.1. Monstervoorbewerking en derivatisering .....	67
II.4.2.2. Silylering .....	68
II.4.2.3. Methoximering .....	70
II.4.2.4. Solvent-extractie .....	71
II.4.2.5. Het GC-temperatuurprogramma .....	73
II.4.3. Massaspectrometrie .....	73
II.4.4. Methode en apparatuur .....	74
II.4.5. Resultaten en interpretatie .....	74
II.4.6. Massaspectrometrie van TMS-derivaten .....	77
II.5. Mogelijkheden van de koppeling van vloeistof chroma- tografie en massaspectrometrie in het kader van het nieronderzoek .....	81
LITERATUUR .....	83
BIJLAGEN .....	91

HOOFDSTUK I.

FYSIOLOGISCHE EN KLINISCHE ASPEKTEN VAN  
HET NIERFALEN.



## I.1. Inleiding.

Onze nieren hebben de functie afbraakprodukten en afvalstoffen uit ons bloed te verwijderen. Ook de water- en elektroliethuishouding worden door de nieren geregeld. Wanneer door optreden van een of andere nierziekte deze functies niet meer voldoende zijn, is het noodzakelijk medische maatregelen te nemen. Er bestaan in dat geval verschillende mogelijkheden:

Transplantatie van de nier(en) van een donor naar de patient. De mogelijkheid van transplantatie wordt vaak bepaald door het beschikbaar zijn van donornieren. Op dit punt bestaat er een Europese samenwerking (Eurotransplant) waardoor het mogelijk is snel weefseltyperingen van een ergens voorhanden zijnde donornier te vergelijken met de typeringen van patienten die reeds zijn geselecteerd op een wachtlijst voor transplantatie. Door het invullen en meedragen van een zogenaamd codicil kan men te kennen geven er geen bezwaar tegen te hebben dat zijn of haar organen voor transplantatiedoeleinden worden gebruikt na een eventueel overlijden.

Bij een geslaagde transplantatie kan de (ex-) patient zijn of haar normale bezigheden weer opnemen, en is het niet noodzakelijk een streng dieet te houden.

Een tweede mogelijkheid is de nierfunctie bij te staan, of te vervangen door middel van een kunstnier. Op de werking van deze zogeheten dialyse komen we later terug. In dit geval moet de patient enkele malen per week een 5-tal uren doorbrengen in het ziekenhuis om aan de kunstnier te worden "gespoeld". Bovendien hebben deze patienten bijna altijd een stringent dieet. Ondanks het feit dat de dialyse redelijk succesvol is, blijven er vaak toch een aantal klachten die tezamen de uremische toestand worden genoemd.

Met het geregeld behandelen van ca. 1300 patienten is een bedrag gemoeid van ongeveer f 150.000.000 per jaar.

Hierna volgen een aantal cijfers over de huidige situatie in Nederland.

	1971	1974	1977
aantal dialyserenden in ziekenhuizen	470	800	1100
aantal thuisdialyserenden en patienten in opleiding	30	90	140
aantal verrichte transplantaties in nederlandse ziekenhuizen.	59	150	201

( uit: Jaarverslag 1977,  
Nierstichting Nederland)

Het aantal tranplantaties van 201 in 1977 is nog niet voldoende om de jaarlijkse toename van het aantal nierpatienten te kunnen opvangen. Daarvoor zouden ongeveer 400 transplantaties per jaar verricht moeten worden. Mede gezien dit feit zal in de komende jaren de dialysekapaciteit worden uitgebreid. Ook zal nog veel wetenschappelijk onderzoek moeten worden gedaan naar de vele mogelijke oorzaken van het nierfalen, en naar bijvoorbeeld de oorzaak van afstoting van getransplanteerd weefsel.

Op de Technische Hogeschool Eindhoven wordt onder coördinatie van de Beleidscommissie Biomedische en Gezondheidstechniek (BMGT) in verschillende richtingen onderzoek gedaan op het gebied van de nier en kunstnier.

In de vakgroep Instrumentele Analyse van de afdeling der Scheikundige Technologie, wordt analytisch onderzoek gedaan op dit gebied. De doelstellingen daarbij zijn:

Het scheiden en identificeren van stoffen in plasma van uremische patienten en gezonde mensen, en onderzoek naar de samenstelling van serum ultrafiltraat. Hierbij worden verschillende analytische technieken ingezet, zoals: gelpermeatiechromatografie, isotachoforese, gaschromatografie, massaspectrometrie, en vloeistofchromatografie. Er bestaat hierin een samenwerkingsverband met het academisch ziekenhuis van de universiteit van Gent, België ( Ringoir), en met het St. Jozefziekenhuis te Eindhoven ( Vink).

I.2. Fysiologie en bouw van de nier.

De nieren zijn twee boonvormige organen die liggen tussen de buikorganen en de rugspieren.

Ze maken deel uit van het URINAIRE SYSTEEM, een van de orgaan-systemen die moeten zorgen voor een konstante samenstelling van de extracellulaire vloeistof die de cellen in het lichaam omgeven. Deze zogenaamde HOMEOSTASE van het MILIEU INTERIEUR wordt naast het urinaire systeem nog geregeld door drie andere systemen: het CIRCULATORISCHE SYSTEEM ( hart, en bloedvaten e.d.) het DIGESTIEVE SYSTEEM ( spijsverteringskanaal, gal, enz.) het RESPIRATOIRE SYSTEEM ( longen).

Voor een mens met een gewicht van 70 kg geldt dat ongeveer 25 kg wordt uitgemaakt door het INTRAcellulaire water. Het totale volume van het extracellulaire water is ca. 12 liter, met andere woorden de helft van het intracellulaire water. Door stofwisselingsprocessen in de cellen dreigt een vervuiling van de extracellulaire vloeistof, doordat bruikbare stoffen opraken en afvalstoffen zich gaan ophopen. Het zijn de bovengenoemde regulerende orgaan-systemen die deze situatie het hoofd bieden. Hieronder geven we de concentraties van enkele ionen in- en extracellulair.

stof	extra (mmol/l)	intra (mmol/l)
Na <sup>+</sup>	140	10
K <sup>+</sup>	5	140
Ca <sup>++</sup>	2,5	minder dan 10 <sup>-3</sup>
Mg <sup>++</sup>	1,5	20
Cl <sup>-</sup>	103	4
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27	10
fosfaat	2	37,5
sulfaat	0,5	1
glucose	1	0-0,2
aminozuren	0,3 g/l	2 g/l.

tabel 1

Het urinaire systeem en met name de nier zorgt voor de constantheid van het "milieu intérieur" door:

- regeling van de WATERHUISHOUDING
- regeling van de ELEKTROLIETHUISHOUDING
- regeling van het ZUUR-BASE evenwicht
- uitscheiding van AFVALSTOFFEN.

Dit zijn de zogenaamde uitscheidingsfuncties van de nier (lit.1).

Daarnaast heeft de nier nog een aantal hormonale functies:

- vorming van RENINE, een enzym dat zorgt voor de vorming van Angiotensine dat een bloeddrukregelende functie heeft.

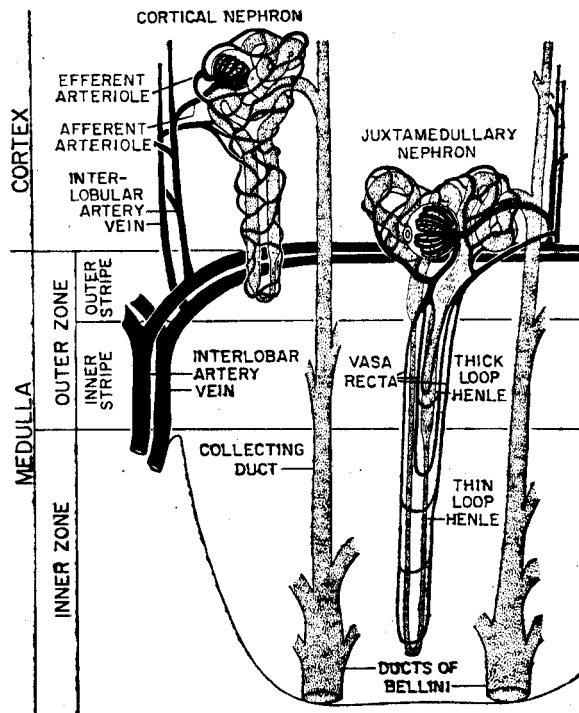
Angiotensine stimuleert ook de aanmaak van het hormoon ALDOSTERON in de bijnierschors, dat de nier aanzet tot reabsorptie van water en zout.

- vorming van ERYTHROPOËTINE, een hormoon dat de produktie van rode bloedlichaampjes (erythrocyten) stimuleert.
- vorming van het 1,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL, uit 25-hydroxycalciferol. Het 1,25 DHCC is belangrijk voor het calcium-metabolisme, met name voor de resorptie van  $Ca^{++}$ -ionen in de darm, en voor de aanwending van calcium bij de botvorming.

Bouw van de nieren.

De nieren liggen achter bovenin de buik, aan weerszijden van de wervelkolom, ter hoogte van de bovenste lendewervel, achter het buikvlies. De rechter nier ligt wat lager dan de linker. Om de nieren ligt een beschermende vetmassa. Op de nieren liggen de bijnieren met een eigen doorbloeding en een aparte functie. De nieren van een volwassene wegen samen ongeveer 300 gram en zijn 10-12 cm lang. Per minuut stroomt er zo'n 1250 ml bloed door de nieren, wat betekent dat ze bij een hartminuutvolume van 5 liter maar liefst 25% van de hart output voor hun rekening nemen, Voor de bloedaanvoer zorgt de nierslagader ( A. Renalis), voor de afvoer de Vena Renalis.( zie figuur 1). Via de urether wordt de urine van de nier afgevoerd naar de blaas. In doorsnede heeft de nier een gelaagde structuur met een buitenste laag, de schors of cortex, en een binnenste laag, het merg of medulla.

De nier bestaat eigenlijk uit een groot aantal ( ca. 1 miljoen) uiterst kleine "urinefabriekjes", de zogenaamde nefronen(fig.1). Figuur 1 geeft de opbouw der nefronen en hun doorbloeding.



figuur 1

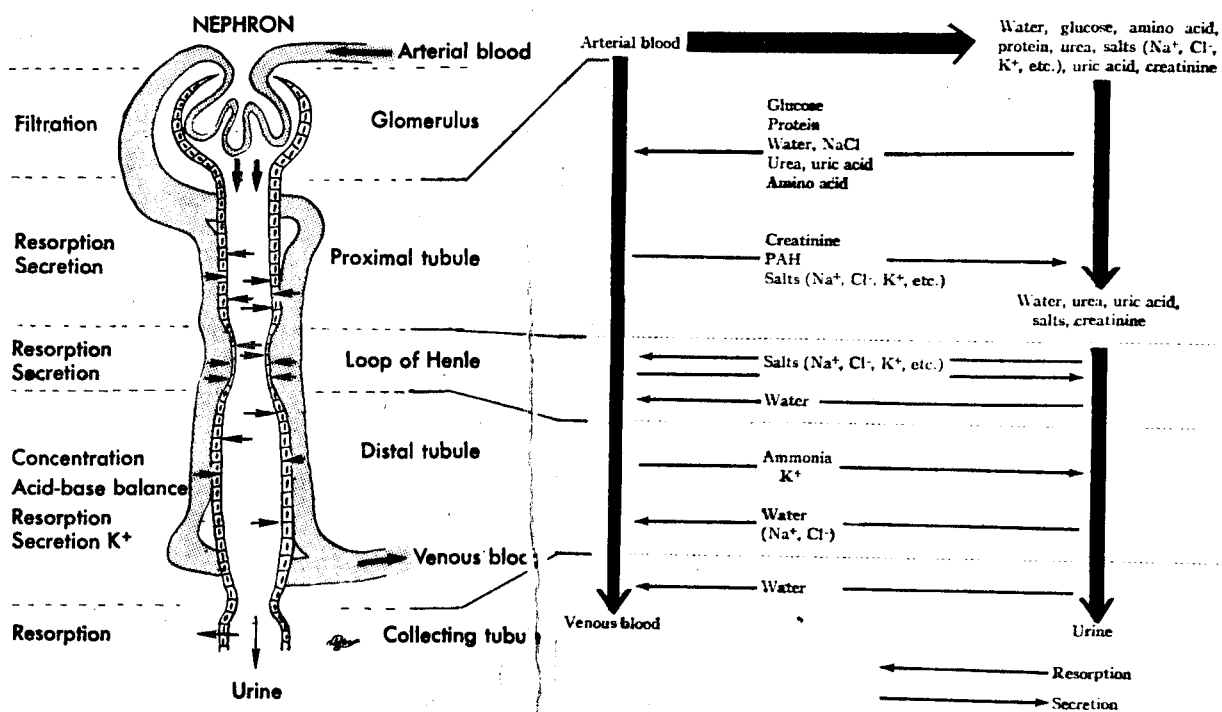
Een meer schematische weergave van een nefron wordt gegeven in figuur 2. Globaal bestaat een nefron uit de zogenaamde GLOMERULUS en het TUBULAIR APPARAAT. De glomerulus is een nauw dooreengeweven netwerk van bloedcapillairen die liggen binnen een bolvormige structuur, dat het kapsel van Bowman heet. Vanuit het kapsel van Bowman ontspringt een gekronkelde buis, de proximale tubulus. In het verlengde hiervan ligt een dunnere buis, de lis van Henle die bestaat uit een neergaand en opgaand been. Deze lis v. Henle sluit weer aan op een bredere kronkelbuis, de distale tubulus, die uitkomt in de zogenaamde verzamelbuis, of ductus colligens. Vele verzamelbuizen monden uit in de renale pelvis, het nierbekken. Er bestaan twee soorten nefronen. Nefronen die voor het grootste deel in de nierschors zijn gelegen ( corticale nefronen), en de nefronen die grotendeels in de mergzone liggen ( juxtamedullaire nefronen).

De twee soorten nefronen hebben een verschillende ombloeding. In de juxtamedullaire nefronen lopen een aantal bloedvaten evenwijdig aan het dalende en opstijgende been van de lis v. Henle.

Het afferente arteriool ( fig.1) is erg kort, waardoor de bloeddruk in de glomeruluscapillairen relatief erg hoog is ten opzichte van normale capillairen. Deze druk zorgt ervoor dat een filtering plaatsvindt in de glomerulus, de zogeheten ultrafiltratie. Het gevormde filtraat, de voorurine, blijkt na onderzoek bijna dezelfde samenstelling te hebben als het bloedplasma met dien verstande dat de gehele eiwitfractie ontbreekt. Ongeveer 20% van het in de glomerulus passerende bloedplasma wordt uitgefiltreerd. Dit is 125 ml/min , zodat dit per dag 180 liter bedraagt! Van deze 180 liter keert het grootste gedeelte door reabsorptie in het tubulair apparaat weer terug in de bloedbaan. Ongeveer 1,5 liter wordt als urine uitgescheiden.

In het tubulair apparaat vinden de volgende processen plaats:

In de proximale tubulus vindt reabsorptie van glucose en aminozuren plaats, reabsorptie van urinezuur, reabsorptie van 70-80% van het gefiltreerde water met  $\text{Na}^+$  en  $\text{Cl}^-$  (door diffusie), actieve reabsorptie van alle kalium, reabsorptie van 50% van het ureum, en van  $\text{NaHCO}_3$  en secretie van  $\text{H}^+$ -ionen. Bij het begin van de lis v. Henle is nog 20-30% van het filtraat over.



figuur 2

In de lis van Henle vindt secretie van ureum en reabsorptie van water plaats. Door de tegenstroom van opstijgende en dalende been, door actieve  $\text{Na}^+$ -reabsorptie in het dalende en uitscheiding in het opstijgende been ontstaat onder in de lis van Henle een hoge  $\text{Na}^+$ -concentratie.

In de distale tubulus gebeurt nog het volgende:  $\text{H}^+$ -secretie,  $\text{NH}_3$ -vorming, waarbij  $\text{H}^+$  ook als  $\text{NH}_4^+$  uitgescheiden kan worden,  $\text{K}^+$ -secretie (in concurrentie met die van  $\text{H}^+$ ), en  $\text{Na}^+$ -reabsorptie onder invloed van aldosteron. Naast de passieve aanpassing van de urineconcentraties aan de plasmakoncentraties van verschillende stoffen is er ook nog een actief beïnvloedingssysteem voor de hoeveelheid en de concentratie van de urine:

a) Bij dehydratatie scheidt de hypofyse onder invloed van osmosensoren het hormoon ADH af. Het is een afkorting van anti-diuretisch hormoon, een octapeptide ook wel eens vasopressine genoemd. Dit hormoon stimuleert de cellen van de distale tubulus om meer water dan normaal te reabsorberen.

b) Het hormoon Aldosteron wordt afgescheiden door de bijnier wanneer de  $\text{Na}^+$ -concentratie in het bloed laag is. Aldosteron stimuleert de cellen van de tubuli om veel natrium te reabsorberen uit de voorurine.

c) Het parathormoon uit de bijnierschilddrievelen bevordert de reabsorptie van  $\text{Ca}^{++}$  en  $\text{Mg}^{++}$  en de uitscheiding van fosfaationen.

In de verzamelbuisjes die door het gebied met hoge  $\text{Na}^+$ -concentratie in de mergzone lopen wordt eventueel nog een hoeveelheid water uit de urine gereabsorbeerd, onder invloed van het genoemde ADH.

In tabel 2 geven we een aantal concentraties voor stoffen in het bloedplasma, de voorurine, en de urine.

stof	plasma	voorurine	urine	stof	plasma	v.urine	urine
eiwitten	75	---	---	ureum	0,3	0,3	20
glucose	1	1	---	urinezuur	0,02	0,02	0,4
$\text{Na}^+$	4	4	3,5	kreatinine	0,01	0,01	1,2
$\text{K}^+$	0,2	0,2	1,5	sulfaat	0,05	0,05	1,2
$\text{Ca}^{++}$	0,1	0,1	0,3	fosfaat	0,25	0,25	4
$\text{Mg}^{++}$	0,05	0,05	0,2	$\text{NH}_4$	0,01	0,01	0,4
$\text{Cl}^-$	3,6	3,6	6				

TABEL 2

in  $\text{gr.}\% \times 10^{-1}$

### I.3. Verschillende nierziekten.

De nierziekten kunnen globaal in vier hoofdgroepen worden geklassificeerd ( lit.2):

- NEPHRITIS, NEPHROSIS, NEPHROSCLEROSIS, CONGENITALE STOORNISSEN.

We zullen deze hoofdgroepen hierna beknopt behandelen.

1) NEPHRITIS. Dit zijn nierziekten waarbij een ontsteking werkzaam is. De meest voorkomende ziekten uit deze klasse zijn de acute en chronische glomerulonephritis en de pyelonephritis. De glomerulonephritis is primair een ontstekingsziekte van de glomeruli. De primaire oorzaak is meestal ontsteking ten gevolge van de aanwezigheid van een soort streptococci, maar de ziekte zelf is geen bacterie-infektie van de nier. Waarschijnlijk is het een antigeen-antilichaamreactie die de glomerulus beschadigd. De meeste patienten met acute Gl. genezen spontaan zonder behandeling. Chronische Gl. kan in het latere leven leiden tot een hoge bloeddruk en een combinatie van verschijnselen, uremie genaamd. Het gaat vooral bij de aanvang gepaard met verregaande proteïnurie, hypoproteïnemie en hypercholesterolemie. ( de uitgang -emie duidt op op een aanwezigheid in het bloed terwijl de uitgang-urie een aanwezigheid in de urine aangeeft. Hypo- betekent:te weinig, hyper- betekent: te veel)

In het verloop van de ziekte kan een sterke morfologische verandering in de nier optreden. De nier is dan geen nier meer in de gebruikelijke betekenis. Zout- en waterverlies is een groter probleem dan een overmatige retentie hiervan. In de gevorderde fase van chronische Gl. wordt de proteïnurie minder belangrijk naarmate de filtratiesnelheid afneemt. Wanneer de glomerulaire filtratiesnelheid snel afneemt ontstaat een toestand, azotemie genaamd. Stikstof retentie, verhoging van fosfaat, sulfaat, uraat, en creatinine die dan optreden worden verklaard door de verminderde filtratiesnelheid ten gevolge van de totale vernietiging van een aantal glomeruli, en ten gevolge van een afname van het aantal capillaire lussen in andere glomeruli.



De chronische pyelonephritis blijkt redelijk vaak voor te komen. In twee series routine-autopsies bleek in 6% van de gevallen py. voor te komen. Omdat de optredende symptomen minimaal en variabel zijn kan de diagnose vaak tijdens het leven niet gesteld worden. In vergevorderde py. , die gepaard gaat met hoge bloeddruk en azotemie, kan men geen onderscheid maken tussen pyelonephritis, glomerulonephritis, en nephrosclerosis. Pyelonephritis is een uiting van bacteriële infectie van de nier. De boosdoeners zijn dan meestal Esch. coli en staphylococci. Beschadigingen treden vooral op in de niermergzone. De py. gaat vaak gepaard met obstructies in en infecties van het lagergelegen urinaire kanaal. Er kan steenvorming optreden in het nierbekken of de blaas. Het feit dat vooral de mergzone het moet ontgelden doet vermoeden dat de voornaamste stoornissen zich voordoen in de verzamelbuizen en de lissen van Henle. Een belangrijke diagnostische test is het meten van het concentrerend vermogen van de nier. Het is mogelijk dat ontstekingshaarden het vermogen van de lissen van Henle om een hypertoniciteit in de mergzone te handhaven, verlagen. De concentrering van de urine wordt juist hierdoor bewerkstelligd. Ook acidose is karakteristiek voor chronische pyelonephritis. Dit kan worden verklaard door een verminderd functioneren van de verzamelbuizen. De belangrijkste eigenschappen van tubulaire acidose zijn hyperchloremie, onvermogen tot vorming van zure urine, zeer grote urinaire excretie van  $\text{Ca}^{++}$ , fosfaat,  $\text{K}^+$ , en  $\text{HCO}_3^-$ -ionen, en de ontwikkeling van osteomalacie. Dit is een beenverweking ten gevolge van een tekort aan  $\text{Ca}^{++}$  in de beenderen.

2) NEPHROSIS. Dit is een verzamelterm voor nierziekten die worden gekenmerkt door degeneratieve veranderingen in de tubulaire structuur. Hiertoe behoren dus ook bepaalde stadia van andere nierziekten. Verder behoren hiertoe de lipoide nephrose, en tubulaire necrose ten gevolge van toxische chemicaliën. In het nephrotische stadium van glomerulonephritis en lipoide nephrose worden vooral de glomeruli beschadigd en niet de tubuli. De glomeruli zijn dan zeer permeabel voor eiwitten.

Tubulaire veranderingen zijn dan grotendeels het gevolg van overmatige reabsorptie van eiwitten en van een gewijzigd lipide metabolisme. Chemische necrose van tubuluscellen wordt veroorzaakt door chemicaliën zoals Hg, Pb, U, Bi, oxalaat, tartraat, bi-chromaat, elementaire P, bacteriële toxinen,  $CCl_4$  enzovoort. Deze stoffen kunnen naast hun giftige werking voor het tubulaire protoplasma, ook een sterk vaatvernauwende werking uitoefenen die gevolgd wordt door necrose.

Het nephrotisch syndroom is een combinatie van verschijnselen zoals: ernstige albuminurie, hypoalbuminemie en hyperlipemie dat wordt gekenmerkt door een verhoogd plasmanivo voor cholesterol. De indrukwekkende tubulaire veranderingen die hieraan ten grondslag liggen zijn zoals hiervoor reeds gezegd een gevolg van de overmatige reabsorptie van eiwitten.

Tubulaire necrose kan worden veroorzaakt door giftige stoffen of door een bloedeloosheid en zuurstoftekort (afsluiting, vaatvernauwing). De tubulaire necrose heeft acute nierinsufficiëntie tot gevolg. De hoeveelheid urine vermindert (oligurie) of blijft totaal achterwege (anurie). De nier heeft gelukkig het vermogen het beschadigde epitheelweefsel van de tubuli in enkele weken te herstellen, mits in de tussenliggende tijd met dialyse wordt bijgesprongen, en mits de beschadiging zich niet heeft uitgebreid tot het basale membraan van het epitheelweefsel.

3) NEPHROSCLEROSIS. Tengevolge van een langdurige hoge bloeddruk kan beschadiging van de bloedvaten in de nieren optreden. In de eerste plaats zullen dat beschadigingen van arteriolen en kleine arteriën zijn. Veranderingen van de verschillende lagen in de slagaderwand en afzetting van lipoide en hyaline (glasachtig) materiaal komen voor bij een goedaardige vorm van nephrosclerosis. Een kwaadaardige vorm kan voorkomen bij zeer ernstig verhoogde bloeddruk. Verspreid liggende tubuli kunnen verschrompelen als gevolg van vaatinsufficiëntie.

4) CONGENITALE STOORNISSEN. Deze aangeboren stoornissen of afwijkingen kunnen vaak pas op latere leeftijd tot problemen aanleiding geven. Vergroeiingen kunnen dan de nierfunctie gedeeltelijk of volledig onmogelijk maken, zoals dit kan gebeuren in de polycyste-ziekte. Aangeboren afwijkingen in het tubulair transportmechanisme kunnen verschillende vormen hebben.

Nephrogene diabetes insipidus wordt gekenmerkt door verhoogde urineproductie en onvermogen tot concentrering van de urine. Alle andere functies van de glomeruli en tubuli zijn normaal.

Renale tubulaire acidose heeft als kenmerken: onvermogen tot de vorming van zure urine, stoornissen in het K en Ca metabolisme die zwakheid en pijn in de botten en verweking t.g.v. Ca-tekort tengevolge hebben. Verlies van K kan storingen in het hartritme veroorzaken.

Renale hypofosfatemie, hyperfosfaturie, vitamine-D resistente Engelse ziekte, zijn alle terug te voeren op een verhoogde excretie van fosfaat ondanks verlaging van het fosfaatplasmanivo. De andere nierfuncties zijn normaal.

Bij Cystinurie treedt een hogere excretie op van de aminozuren cystine, lysine, arginine en ornithine. De reabsorptie van deze aminozuren is dan verminderd.

Andere aangeboren afwijkingen in het tubulair transportmechanisme zijn: glycinurie, beta-aminoboterzsure acidurie, de ziekte van Hartnup en het syndroom van Fanconi.

In tabel 3 is de frekwentieverdeling van verschillende soorten nierziekten gegeven. Vele van deze ziekten leiden tot een geheel van symptomen, de UREMIE genaamd. In het volgende hoofdstuk gaan we hier nader op in.

	Man(%)	Vrouw(%)	Totaal(%)
Glomerulonefritis	59.3	41.6	52.3
Pyelonefritis	15.0	29.7	20.8
Medicam. nefropathie	1.7	5.0	3.0
Cystenieren	7.2	9.2	8.0
Hereditaire chron. nefropathie	1.9	1.2	1.6
Congenitale hypoplasie	1.6	1.6	1.6
Vasculaire oorzaken	5.3	3.3	4.5
Traumatisch of chirurgisch verlies van nieren	0.4	0.3	0.4
Corticale necrose	0.3	1.1	0.6
Overige aandoeningen	6.5	6.2	6.4

(uit: Mededelingen St. Joseph-  
ziekenhuis, Dialysenummer, 1977)

TABEL 3.

#### I.4. Uremie en haar behandeling.

Uremie is een totaal van symptomen die direct of indirect worden veroorzaakt door het falen van de nierfunctie.

Directe gevolgen zijn:

1. retentie van afbraakprodukten die normaal worden uitgescheiden.
2. retentie van water, natrium en enkele andere elektrolyten.
3. abnormale hormonale secretie en metabolische werking van de nier.

Deze verschijnselen kunnen de oorzaak voor vele secundaire symptomen worden. De grote verscheidenheid en samenhang van deze secundaire symptomen geeft een goede indruk van de belangrijke functie die de nier vervult in de homeostase. Figuur 3 laat de gecompliceerdheid van het geheel zien.

Tot de secundaire verschijnselen behoren afwijkingen in het functioneren van het zenuwstelsel, storingen in het spijsverteringskanaal, veranderingen in de ademhaling en storingen in de bloedsomloop. Hierna zullen we secundaire symptomen klassificeren en behandelen in vier groepen.

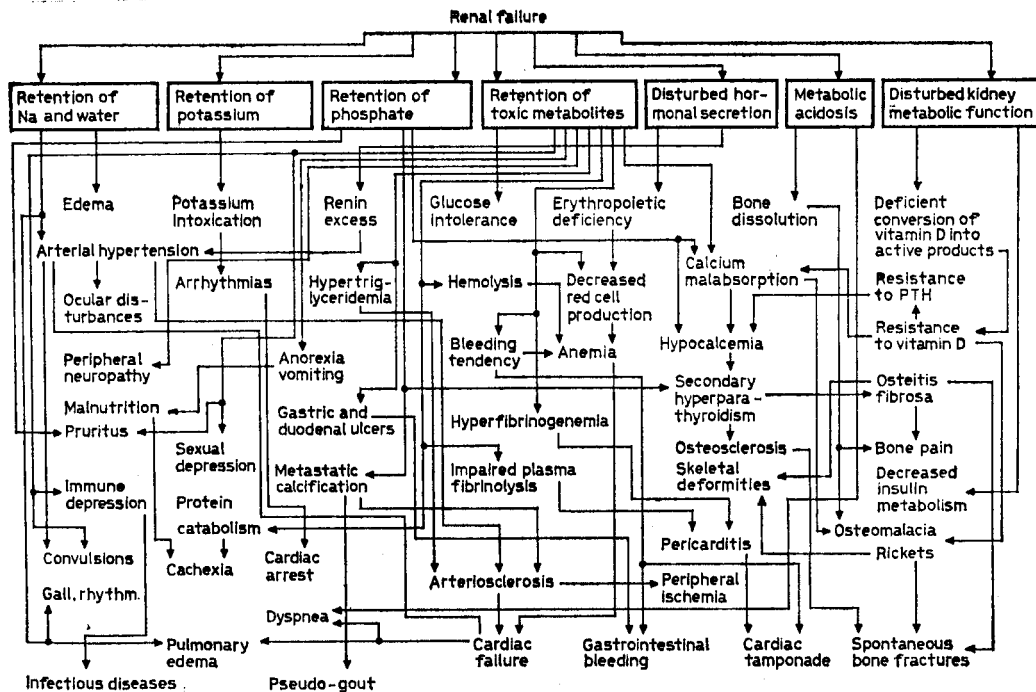


Fig. 3

(uit: lit.3)

a) De toxische symptomen. Deze worden veroorzaakt door retentie van metabolieten, en bewijzen hun toxische achtergrond doordat ze vaak volledig verdwijnen na adequate dialyse. Zulke verschijnselen zijn o.a. overgeven (vomitus), gebrek aan eetlust (anorexie), koolhydraatintolerantie, en perifere neuropathie. Een aantal verschijnselen worden slechts ten dele door dialyse opgeheven zoals: anemie (bloedarmoede), hypertriglyceridemie, jeuk (pruritus) en hyperfibrinogenemie. Men veronderstelt daarom dat deze verschijnselen slechts gedeeltelijk zijn terug te voeren op toxische factoren. We zullen nu even ingaan op de hiervoor genoemde neuropathie (lit.4)

Storingen van het zenuwstelsel komen tamelijk veel voor bij uremische patienten. De zgn. perifere neuropathie begint voornamelijk in de voeten en benen. Krampen, rusteloze benen, spierzwakte, en brandende voeten zijn een aantal voorkomende verschijnselen. Objectieve metingen zijn gedaan in de vorm van zenuwgeleidbaarheidsmetingen. De aantasting van de myelineschede van de zenuwen en een toxische inhibitie van de zenuwmembraanfunctie worden geacht de achtergrond te zijn. Het precieze mechanisme is onbekend maar gezien het feit dat een op tijd gestarte dialysebehandeling

een langzame vooruitgang kon veroorzaken leidt tot de konklusie dat toxische metaboliëten een belangrijke rol spelen.

Clements(lit.5) opperde de mogelijkheid dat de in een aantal patienten gekonstateerde verhoogde plasma-inositolkoncentratie in verband zou kunnen staan met de neuropathie. Myoinositol is een bouwstof voor een groep fosfolipiden (de fosfoinositiden), die te maken hebben met de funktionele zenuwaktiviteit.

b) Storingen van de bloedsomloop. Hoge bloeddruk (hypertensie) is het meest voorkomende en belangrijkste verschijnsel uit deze categorie. Retentie van water en natrium zijn hierop negatief van invloed en zijn ook vaak de oorzaak. Er zijn echter ook patienten waarbij zout en vochtverlies geen enkele invloed hebben op de te hoge bloeddruk. Een van de andere mogelijke oorzaken is een te hoge renine-koncentratie in het bloed (hyperreninemie). Optredende storingen in de hartfunctie kunnen door hypertensie worden veroorzaakt, maar ook door retentie van kalium. Kalium-intoxicatie was vroeger vaak dodelijk en kan dat nog zijn.

c) Storingen in de hormoonsecretie en de metabole nierfunctie. Hierbij is vooral een afgenomen erythropoëtine-secretie van belang, die aanleiding kan zijn voor anemie. Een toegenomen renine-secretie als oorzaak voor arteriële hypertensie werd hierboven reeds genoemd. In figuur 4 is schematisch het renine-angiotensine terugkoppelingssysteem weergegeven.

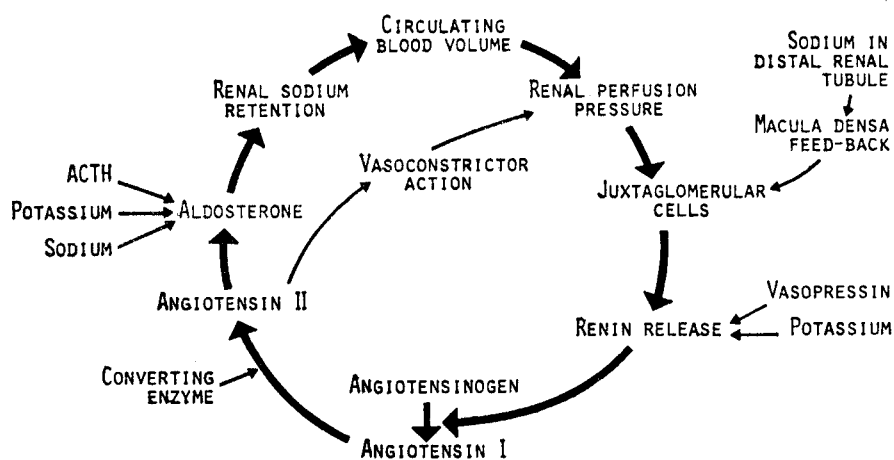


Fig. 4

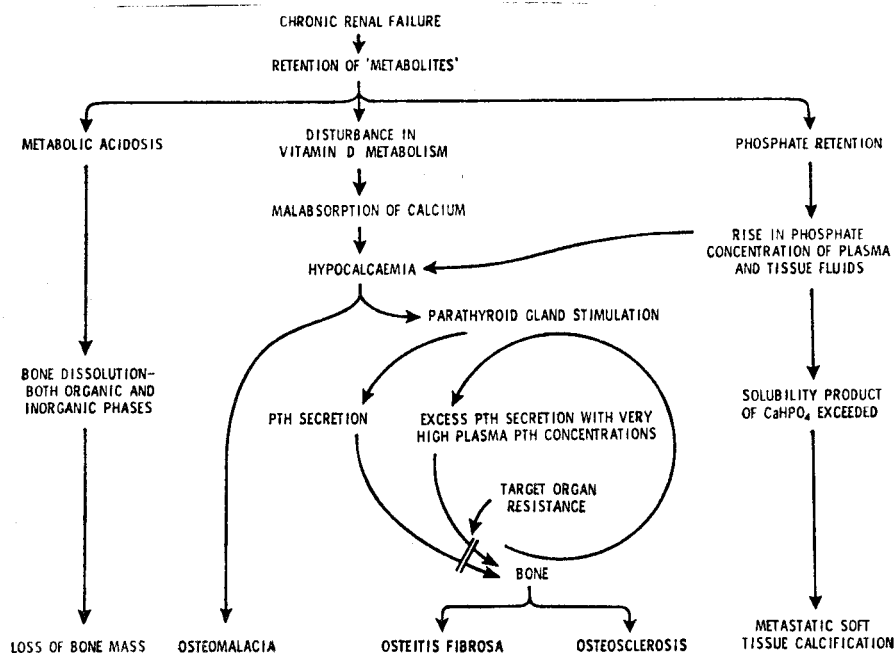
( uit: Wills, lit.4)

Daaruit wordt duidelijk hoe een verhoogde renineproductie enerzijds een vaatvernauwing en anderzijds natriumretentie en verhoging van het bloedvolume veroorzaakt.

d) Algemene hormonale en metabolische storingen.

Een storing in de omzetting van provitamine-D in het actieve 1,25-dihydroxycholecalciferol, en de retentie van fosfaat, naast het optreden van acidose (te "zuur" bloed) zijn de belangrijkste factoren bij het ontstaan van afwijkingen in het Ca-metabolisme. Deze afwijkingen zijn tegenwoordig de belangrijkste en meest voorkomende metabolische stoornissen uit de dialysepraktijk.

Botverweking ten gevolge van een tekort aan Ca en tengevolge van acidose, en metastatische verkalking van vitale organen worden steeds meer de limiterende factoren bij chronisch uremische patienten onder dialysebehandeling. Een schematische weergave van de verandering in het Ca-metabolisme wordt gegeven in figuur 5.



(uit: Wills, lit.4)

Fig. 5

Een tweede belangrijke storing is een afwijking in het koolhydraat- en lipidemetabolisme.

De door insuline bepaalde opname van glucose in vetweefsel buiten de lever lijkt te worden geremd bij uremische patienten.

Vooral de invloed die een storing in het koolhydraatmetabolisme heeft op het vetmetabolisme bepaalt het belang van eerstgenoemde. Een verwachte hogere glucoseconcentratie in het bloed wordt niet gekonstateerd. De verstoring in het vetmetabolisme komt tot uiting in een verhoging van de plasma-triglycerideconcentratie. Een aantal mogelijke oorzaken hiervoor zijn: afname van de TG-klaring uit het bloedplasma, overmatige synthese van TG in de lever ten gevolge van een storing in het koolhydraatmetabolisme, en stimulatie van de TG-synthese uit vrije vetzuren (in de lever). Deze vrije vetzuren zouden dan ontstaan door afbraak van TG uit vetweefsel onder invloed van lipolytische hormonen. (lit. 4, 6).

Inzicht in en kennis van de gecompliceerde samenhang van verschijnselen is vooralsnog niet volledig. Dit heeft tot gevolg dat de optredende klinische effecten niet of onvoldoende kunnen worden voorkomen.

Tot slot willen we nog opmerken dat ook de dialyse zelf verantwoordelijk kan zijn voor het optreden van bepaalde symptomen, bijvoorbeeld door een te hoge klaring van sommige stoffen of elektrolyten die we eigenlijk niet willen dialyseren. Het zogenaamde "disequilibrium syndrome" dat zich soms ontwikkelt tijdens de dialyse, en gepaard gaat met hoofdpijn, verwarring en krampen, wordt wel toegeschreven aan een hyponatremie als gevolg van de dialyse.

De behandeling van uremie. Deze valt uiteen in ondersteuning of vervanging van de nierfunctie met behulp van een kunstnier, en een combinatie van dieetmaatregelen en medicatie. Geen enkele behandeling kan op dit moment volledig worden genoemd, en alleen een niertransplantatie kan uremie volledig doen verdwijnen. Transplantatie is echter de behandeling van het nierfalen, en niet zozeer van de uremie. Een beter inzicht in de aard van uremische toxinen, van hun metabolisme en werking, van de hormonale en metabolische activiteiten van de nier, en van het ontstaan van hypertensie kunnen in de toekomst de behandeling meer rationeel en efficiënt maken.



De hemodialyse is een behandeling waarbij een uitwisseling plaatsvindt tussen het bloed van de patient en een vloeistofbad. Deze uitwisseling vindt plaats door een membraan heen, waarbij het concentratieverschil voor een bepaalde komponent de drijvende kracht is voor diffusie van die komponent van het bloed naar het dialysaat. Het membraan kan bestaan uit cellophaan, cuprophaan, of bijvoorbeeld polyacrylonitril. Het laatste membraan wordt onder andere in het St. Josephziekenhuis gebruikt; het RP-6 membraan is doorlaatbaar voor molekulen met een molgewicht lager dan 6000.

Het bloed van de patient wordt door middel van een arterio-veneuze shunt door de kunstnier gevoerd, waar de uitwisseling plaatsvindt. In figuur 6 zijn twee gangbare soorten kunstnieren afgebeeld. Het werkingsprincipe is voor beide apparaten gelijk. Het verschil is dat in het geval van de Kolff twin-coil kunstnier spoelvloeistof uit een bad langs het membraan wordt rondgepompt, terwijl bij de Skeggs-Leonard versie een continue verversing van dialysaat vloeistof plaatsvindt.

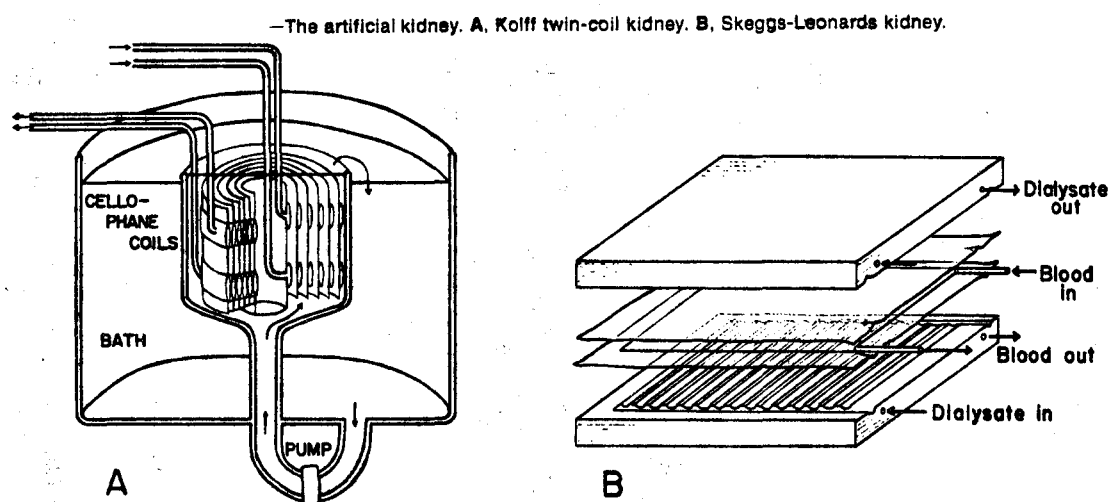


Fig.6

( uit: Pitts, lit.2)

Een methode om vooral water en kleine molekulen te verwijderen is de zogeheten ultrafiltratie. Door middel van een drukverschil over een membraan worden kleine molekulen daardoor heen geperst.

### I.5. Bekende en onbekende uremische toxinen.

In het verleden zijn vele stoffen aangewezen als dé veroorzaker van het uremisch syndroom. Hieronder zullen we een aantal van deze stoffen en stofklassen bespreken.

Tegenwoordig is men steeds meer genegen tot het standpunt dat niet één maar meerdere componenten verantwoordelijk zijn voor de uremische verschijnselen.

UREUM (MW:60). Tegenwoordig wordt ureum beschouwd als een metaboliet zonder belangrijke toxische eigenschappen, bij de concentraties zoals deze in uremisch serum worden gevonden. Het is echter geen volledig inerte stof, en men weet dat het toch bepaalde biologische effecten teweeg kan brengen (lit.7). Met name de koolhydraatintolerantie wordt waarschijnlijk tot op zekere hoogte veroorzaakt door een verhoogd plasmanivo van ureum in het bloed.

KREATININE (MW:113). Alhoewel kreatinine net als ureum bij nierfalen in sterk verminderde mate wordt uitgescheiden, beschouwt men het toch algemeen als een niet-giftige stof. Toch zijn er wel waarnemingen gedaan die er wijzen dat KR een aantal uremische symptomen veroorzaakt, zoals koolhydraatintolerantie, en slaperigheid.

METHYLGUANIDINE (MW:73). Deze stof blijkt in uremische patienten niet alleen te worden geaccumuleerd, maar er treedt ook een verhoogde produktie op uit kreatinine. Injektie van MG bij honden induceerde het optreden van uremische symptomen zoals hypertriglyceridemie, geremde Ca-resorptie in de darm, toename van het plasmafibrinogeen en koolhydraatintolerantie (lit.8,9). Het MG blijkt bij voorkeur te accumuleren in de intracellulaire vloeistof, dus daar waar ook de meeste enzymatische processen plaatsvinden (lit.10). Volgens Giovaletti en Barsotti speelt het MG een belangrijke rol bij de verschillende uremische verschijnselen in de mens. Anderzijds stellen Baker en Marshall (lit.11) dat

de MG plasmakonzentratie over het algemeen te laag is om enig toxisch effect te kunnen induceren, en konden Felgate en Taylor(lit.12) geen inhiberend effect van MG op de zuurstofopname in verschillende soorten weefsel konstaten. Yamada en Nakagawa namen een cytotoxische werking waar van laagmoleculaire frakties van uremisch ultrafiltraat, waarin met name ook MG aanwezig bleek (lit.13). Voor GUANIDINE gaat globaal hetzelfde verhaal op, waarbij wel moet worden opgemerkt dat de toxiciteit van deze stof toch een stuk lager wordt geschat dan die van MG.

GUANIDINEZUREN. Sasaki et.al. stelden dat de verhouding van urinair guanidinoacetaat en guanidinosuccinaat een indicator kan zijn voor een storing in de nierfunctie (lit.14). Cohen opperde de mogelijkheid dat guanidinosuccinaat (guanidinobarnsteenzuur) een enzyminhibiterende werking zou kunnen hebben (lit.15). Naast guanidinobarnsteenzuur vonden Shainkin et.al. ook nog guanidino-propionzuur in hoge concentratie in uremisch serum. In experimenten bleek G.Propionzuur in rode bloedcellen de glucose-6-fosfaat dehydrogenase activiteit te remmen. De auteurs konkluderen daarom dat G.Propionzuur verantwoordelijk zou kunnen zijn voor een toegenomen hemolyse zoals die optreedt in de uremische toestand (lit.16).(Hemolyse is een soort ontleding van rode bloedcellen).

AMINES. Zowel alifatische als aromatische amines komen in verhoogde mate voor in het plasma van uremische patienten. Hoewel melding wordt gemaakt van een mogelijke rol van amines in de neurologische en psychische symptomen bij ernstige uremie, zijn geen waarnemingen van chronische toxiciteit beschikbaar (lit.10). Injektie van hoeveelheden methylamine, dimethylamine en ethanolamine die tien maal zo hoog waren als in uremisch serum, konden bij honden geen merkbaar toxisch <sup>effect</sup> teweeg brengen. Simenhoff (lit.17) rapporteerde een verhoogde dimethylamine concentratie in de dunne darm van uremische patienten en suggereerde dat de uremische toestand veranderingen in de darmflora veroorzaakt waardoor de gevormde

toxische amines door absorptie in de circulatie terecht komen.

URINEZUUR (MW:168). Deze stof, afkomstig van de afbraak van nucleïnezuren, komt ook verhoogd in plasma van uremische patienten voor. Het wordt echter niet beschouwd als een belangrijk toxine. In een op zichzelf staande observatie meende men een verband te konstateren tussen het optreden van pericarditis (ontsteking van het hartzakje) en hoge plasmanivo's van urinezuur.

FENOLEN, FENOLISCHE ZUREN, INDOLISCHE ZUREN. Hicks (lit.18) trof een hele serie van dit soort componenten aan in het bloed van een patient met acute nierinsufficiëntie. Deze stoffen werden vooral vroeger verantwoordelijk gesteld voor vele uremische symptomen. Dit gebeurde op basis van experimenten met de vrije stoffen. Het is echter gebleken dat ze vooral in gekonjugeerde vorm, dus aan eiwitten gebonden, in uremisch plasma ophopen. Van deze gekonjugeerde stoffen is bekend dat ze veel minder toxisch zijn dan de vrije componenten. Giovanetti en Barsotti (lit.10) injecteerden honden met hoeveelheden vrije componenten die gelijk of hoger waren dan de hoeveelheden in plasma van ernstig uremische patienten, maar konden geen neurologische of andersoortige veranderingen waarnemen. In tegenstelling hiermee staan onderzoeken die aantoonen dat dihydroxybenzoëzuur (lit.19) een neurotoxisch effect in ratten vertoonde, en dat p-hydroxyfenylazijnzuur een vermindering van het aantal bloedplaatjes veroorzaakt, bij concentraties gelijk aan die in uremisch bloed ( lit.20). Verder bestaat er ook nog een belangrijke bewijsvoering voor de hypothese dat fenolen een rol spelen in het ontstaan van uremische hemolyse (lit.21).

ONBEKENDE UREMISCHE TOXINEN. Hoewel al sinds langere tijd het bestaan werd vermoed van onbekende uremische toxinen, wordt deze mogelijkheid pas sinds enkele jaren systematisch onderzocht. Vooral na de formulering van de " square-meter-hours" hypothese door Babb in 1971 (lit.22) kwam deze beweging op gang. Volgens die hypothese, die later zou worden omgedoopt in " middle molecule" hypothese, wordt de uremische vergiftiging veroorzaakt door stoffen met een

molekuulgewicht tussen de 300 en 1500, in plaats van door laagmoleculaire stoffen.

Deze stelling werd oorspronkelijk gesteund door de waarneming dat chronisch uremische patienten die een regelmatige peritoneale\* dialyse ondergingen, daar even goed op reageerden als andere patienten op een regelmatige hemodialyse. Dit gebeurde ondanks het feit dat in de peritoneale dialyse de plasmanivo's van laagmoleculaire stoffen zoals ureum en kreatinine veel hoger waren dan bij de gewone hemodialyse. De verklaring hiervoor leek te zijn dat veronderstelde toxische " middle molecules" door peritoneaaldialyse voldoende worden verwijderd. Giovanetti wijst er echter op dat dit ook nog op een andere wijze kan worden verklaard. Tijdens dialyse zal een laagmoleculaire stof zoals methylguanidine langzaam van de intracellulaire naar de extracellulaire ruimte bewegen. Dit betekent dat bij gebruik van efficiënte dialysators een grote daling in de plasmakonzentratie wordt bereikt, terwijl de konzentratie in de intracellulaire ruimte relatief hoog blijft. Aan de andere kant zal zich bij peritoneale dialyse een evenwicht kunnen instellen tussen het intra- en extracellulaire MG, ten gevolge van de lage klaring ervan. Dit betekent dat in tegenstelling tot de normale efficiënte dialyse, bij peritoneale dialyse aan het eind van het dialyseproces een nog steeds relatief hoge extracellulaire MG-konzentratie blijft bestaan, zodat dan nog steeds MG zal worden verwijderd. Het gevolg hiervan is dat het plasmanivo in hemodialysepatienten na dialyse zeer snel zal stijgen tot weer een evenwicht is bereikt, terwijl in de peritoneale dial. patienten dit evenwicht nog praktisch was ingesteld. Twaalf uur na dialyse zijn echter de MG-plasmanivo's in beide soorten patienten even sterk gedaald ten opzichte van de situatie vóór dialyse. Dit betekent dat in beide gevallen evenveel MG is gedialyseerd, terwijl in het peritoneale geval toch meer ureum en kreatinine is achtergebleven.

Uit experimenten was gebleken dat de stroomsnelheid van het dialysaat in de kunstnieren de klaringssnelheid van middle molecules nauwelijks beïnvloedt, terwijl die van laagmoleculaire stoffen juist

\* dialyse met het buikvlies van de patient als membraan.

wel sterk wordt beïnvloed. Verder bleek dat het dialyse-oppervlak de klaringsnelheid van " middle molecules " weer wel beïnvloedt (lit.23). Dit gaf dus de mogelijkheid om door verandering van de dialysecondities de verwijdering van de beide groepen molekulen onafhankelijk van elkaar te veranderen. Op deze wijze ontstonden er verschillende dialysestrategiën waarmee de middle molecules hypothese zou kunnen worden getest:

- Dialyse bij lage dialysaatstroomsnelheid, waarvan verwacht kon worden dat er geen symptomen van onvoldoende dialyse zouden optreden wanneer de MM-hypothese juist zou zijn.
- vergroting van het dialyseoppervlak van de kunstnier met als doel een kortere dialyseuduur mogelijk te maken zonder "onderdialyse"-verschijnselen te veroorzaken.
- verkleining van het dialyseoppervlak, en optimalisering van de interne geometrie ter verhoging van de efficiëntie voor laagmoleculaire stoffen. Als de MM-hypothese juist zou zijn zouden hier juist verschijnselen van onderdialyse naar voren moeten komen. Experimenten met deze strategiën hebben niet ondubbelzinnig de juistheid van de "middle molecules " hypothese kunnen bevestigen. Voor een discussie over de resultaten van de verschillende experimenten verwijzen we naar publikaties van Giovanetti & Barsotti, en Bergström & Fürst (lit.10,24).

Naast deze experimenten met verschillende dialysestrategiën hebben Yamada en Nakagawa (lit.13) de verschillende molgewichtsfractionen van uremisch ultrafiltraat onderworpen aan experimenten om de cytotoxiciteit te meten. Leverweefsel van muizenembryo's werd in contact gebracht met de verschillende fractionen en de kweken werden na verloop van tijd met behulp van elektronenmicroscopie onderzocht op celbeschadiging. Daarbij bleek dat de laagmoleculaire fractionen ( MW lager dan 500) zeker enige celbeschadiging hadden veroorzaakt en de MM-fraction aanzienlijk minder. Naast de cytotoxiciteit werd ook de mate van enzyminhibitie gemeten. De MM-fraction bleek een zekere inhibitie te vertonen van de pyruvaatkinase en de Na-K-ATPase activiteit.

Samenvattend kan gezegd worden dat er nog geen eenduidig bewijs is voor één van de verschillende theoriën met betrekking tot de aard der componenten die verantwoordelijk moeten worden geacht voor de uremische toestand.

HOOFDSTUK II.

ANALYTISCH ONDERZOEK NAAR AANLEIDING VAN  
HET NIERFALEN.

## II.1. Analytisch onderzoek aan lichaamsvloeistoffen van uremische patienten.

In het verleden werden verschillende analyse technieken aangewend om iets meer te weten te komen omtrent de identiteit en kwantiteit van stoffen die verhoogd voorkomen in lichaamsvloeistoffen van uremische patienten en die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de uremische verschijnselen.

Bultitude & Newham konden met behulp van gaschromatografie massaspectrometrie (GC-MS) in uremisch plasma een aantal componenten identificeren die karakteristiek leken voor de uremische toestand, dan wel verhoogd in het plasma voorkwamen. Deze stoffen waren: melkzuur, glycerol, erythritol, erythronzuur, 2-deoxyerythronpentonzuur, arabinitol, arabinonzuur, inositol en lactose.

Ze onderzochten niet het volledige plasma maar analyseerden frakties uit een scheiding met gelpermeatiechromatografie (lit.25).

Masimore et.al. identificeerden zes componenten in hemodialysevloeistof met behulp van GC-MS. De monstervoorbewerking bestond daarbij uit anion-exchange. De geïdentificeerde componenten waren: fosforzuur, glucopyranurono(6-1)lacton, citroenzuur, D-gluconzuur-delta-lacton, alfa-D-Glucose, en beta-D-glucose (lit.26).

Dowty et al. onderzochten uremisch bloedplasma op vluchtige componenten met GC-MS. Daarbij bleek dat de dialysebehandeling de concentraties van verschillende vluchtige stoffen aanzienlijk had teruggebracht, waarvan sommige tot de in gezonde personen gemeten nivo's (lit.27).

Bowen (lit.28) konstateerde een hoge concentratie aan benzylalcohol in uremisch plasma m.b.v. GC-MS.

Pettersen et al. (lit.29) onderzochten met GC-MS dialysevloeistof van de behandeling van patienten waarvan de nieren chirurgisch waren verwijderd. Ze troffen daarbij organische zuren aan die normaal in urine worden aangetroffen.

Dzúrik et al, Chang, en Gordon et al. (lit.30,31,32) poogden uremisch plasma te karakteriseren met gelpermeatiechromatografie, met name gericht op de "middle molecules".



Migone et.al. onderzochten op soortgelijke wijze de urine en dialysevloeistof op middle molecules (lit.33).

Lutz et.al wijdden een onderzoek aan de isolatie van oligopeptiden in uremisch plasma (lit.34), en bepaalden de chemische samenstelling van peptiden in peritoneaal dialysaat (lit.35).

Zeer recent beschreef Cueille (lit.36) een relatief snelle methode voor de kwantitatieve analyse van middle molecules met de afmetingen van het vitamine B<sub>12</sub> molecuul. Hij maakte daarbij gebruik van een koppeling van een gelpermeatie- en een anionwisselingskolom.

Senftleber (lit.37) analyseerde hemodialysaat van uremische patienten met behulp van " reversed-phase " vloeistofchromatografie.

Mikkers et al. (lit.38) profileerden uremisch bloedserum met behulp van isotachoforese, en ontwikkelden daarmee een snelle en handzame methode om profielen te verkrijgen waarmee zowel informatie over laagmoleculaire, als over hogermoleculaire stoffen gelijktijdig ter beschikking komt.

Schutjes ontwikkelde een gaschromatografische profileringsstechniek voor de analyse van uremisch ultrafiltraat. Hij ontwikkelde daarbij een goed systeem om de GC-informatie te verwerken en te presenteren, hetgeen in de naaste toekomst voor computerverwerking geschikt zou kunnen worden gemaakt (lit.39).

Yamada et.al. gebruikten de ultrafiltratietechniek voor het verkrijgen van frakties met verschillende molgewichtsgrenzen. Ze analyseerden de laagmoleculaire fraktie met elektroforese, infrarood spectrometrie, proton-NMR, en massaspectrometrie (lit.13).

Hicks (lit.18) analyseerde de abnormale bloedbestanddelen bij acuut nierfalen met behulp van papierchromatografie. Het ging hier voornamelijk om fenolen, fenolische zuren en indolische zuren.

Sasaki et al. (lit.14) bepaalden de verhouding van concentraties van guanidinobarnsteen zuur en G. azijnzuur met kationwisselingschromatografie en papierelektroforese, in de urine van gezonden, en nierlijdende patienten.

Shainkin et.al gebruikten een automatische aminozuuranalysator om plasmaguanidinezuren te meten in uremisch serum (lit.16).

Wengle en Hellström (lit.40) tot slot, analyseerden vluchtige fenolen in uremisch serum, met behulp van gaschromatografie.

## II.2. Profilering van uremisch ultrafiltraat met chemische ionisatie massaspectrometrie.

Door het kiezen van de juiste ionisatiekondities is het mogelijk de fragmentatie die normaal optreedt in de massaspectra van vele stoffen aanzienlijk te verminderen. Daardoor wordt het ook mogelijk mengsels van stoffen in hun geheel te analyseren.

De ionisatietechniek die hiervoor bij uitstek geschikt is, is de CHEMISCHE IONISATIE. We zullen hierna eerst de belangrijkste eigenschappen van deze techniek beschrijven.

### II.2.1. CHEMISCHE IONISATIE MASSASPECTROMETRIE.

De chemische ionisatie massaspectrometrie (CI-MS) (lit.41,42,43,44,45) onderscheidt zich van de conventionele elektronen-ionisatie (EI) op de volgende punten.

- De ionisatie van monstermolekulen wordt niet veroorzaakt door een rechtstreekse beschieting met elektronen van een gloeidraad (filament) maar door tussenkomst van een ionenplasma van een zogenaamd reaktiegas. Door overdracht van protonen tussen reaktiegasionen en monstermolekulen worden de laatste geïoniseerd. In deze vorm kunnen ze door middel van elektrische en/of magnetische velden naar massa worden gescheiden en gedetekteerd. Het reaktiegas is meestal in duizendvoudige overmaat ten opzichte van de monstermolekulen aanwezig. De normale CI- en EI-werkdrukken zijn dan ook behoorlijk verschillend: respectievelijk 0,1-1 torr en ca.  $10^{-4}$  torr.. ( 1 torr. = 1 mm Hg).

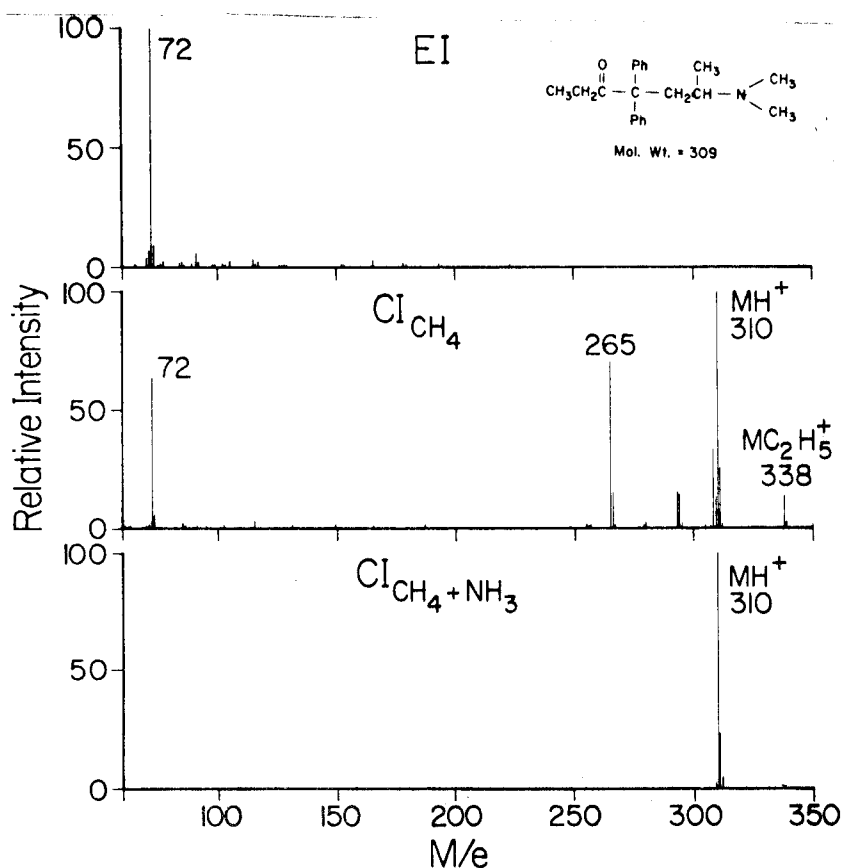
- Bij CI wordt minder energie overgedragen op de monstermolekulen tijdens de ionisatie, waardoor beperking van de fragmentatie wordt bereikt. De mate van fragmentatie wordt in de eerste plaats bepaald door de aard van het reaktiegas. Een belangrijke grootte daarbij is de PROTONAFFINITEIT, waar we nog op terugkomen.

- Bij CI is het moleculaire ion een even-elektron ion, in tegenstelling tot dat in de EI. Even-elektron ionen zijn minder vatbaar voor fragmentatie dan oneven-elektron ionen. Ook dit is een reden voor de verminderde fragmentatie in CI.

- De aard van de fragmentatie is ook anders. De CI-fragmentatie heeft wel wat weg van reaktieschema's zoals die <sup>in</sup>waterige oplossing optreden, en vindt voornamelijk plaats door afsplitsing van functionele groepen. Daardoor is de CI-fragmentatie beter voorspelbaar en biedt ze de mogelijkheid tot een meer rationele en minder empirische vorm van massaspectrometrie.

- Bij de CI kunnen we een hogere gevoeligheid verwachten omdat door de hogere druk het ionisatierendement hoger kan zijn. Andere ionisatietechnieken zoals veldionisatie en veld desorptie worden onder andere besproken door Milne (lit.46), en Fales et. al. (lit.47).

Ter illustratie geven we in figuur 6' de massaspectra van methadon met verschillende reaktiegassen, en met EI-ionisatie.



(uit: Foltz, lit.48)

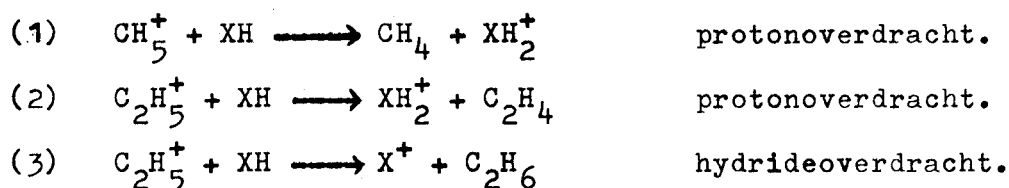
Fig. 6'

Hierna zullen we wat verder ingaan op de ionisatie door middel van protonoverdracht, en op het begrip protonaffiniteit.

PROTON- EN/OF HYDRIDEOVERDRACHT.

a) principe.

Bij dit soort reakties zal proton- en/of hydrideoverdracht plaatsvinden respectievelijk van en naar het reaktiegasion. Bij wijze van voorbeeld beschouwen we de ionisatie van een monstermolekuul XH met methaan als reaktiegas.

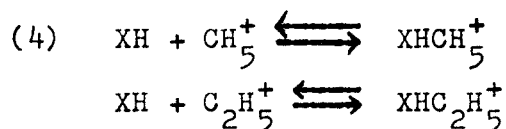


In reactie (1) kan het gevormde  $\text{XH}_2^+$ -ion in een aantal gevallen weer direkt dissociëren volgens  $\text{XH}_2^+ \longrightarrow \text{X}^+ + \text{H}_2$ . We spreken dan van dissociatieve protonoverdracht. Gemeten naar het resultaat is dit hetzelfde als in (3), alleen wordt er een ander reactiemechanisme doorlopen.

De ionen  $\text{CH}_5^+$  en  $\text{C}_2\text{H}_5^+$  zijn de meest intense ionen in het ionenplasma van methaan. Over de vorming van deze ionen komen we nog te spreken.

In alle bovenstaande reakties hebben we te doen met even-elektron ionen: de moleculaire ionen  $(M+1)^+$  en  $(M-1)^+$ . Deze zijn stabielere dan het oneven-elektron moleculaire ion  $M^+$  in de EI. Het is afhankelijk van de aard van de monstermolekullen of we  $(M+1)^+$  dan wel  $(M-1)^+$  in het spectrum zullen aantreffen. (Beide is ook mogelijk).

Naast de genoemde ionisatiereakties kunnen ook additiereakties plaatsvinden. De positieve reaktiegasionen hechten dan aan aan elektronrijke plaatsen zoals vrije elektronenparen en dubbele bindingen. In het geval van methaan bijvoorbeeld:

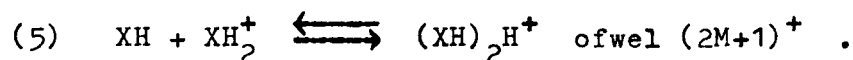


Hierbij worden dus  $(M+17)^+$  en  $(M+29)^+$  gevormd. Het al of niet optreden van dit soort ionen is afhankelijk van de aard van

reaktiegas en monster, en verder van de temperatuur ( zie hoofdstuk over temperatuurafhankelijkheid) en de concentratie van het monster. Bij andere reaktiegassen zouden we kunnen krijgen: bij  $\text{NH}_3$ ,  $(M+18)^+$ ,  $(M+35)^+$ , en  $(M+52)^+$ ; bij isobutaan  $(M+39)^+$ ,  $(M+43)^+$ , en  $(M+57)^+$ .

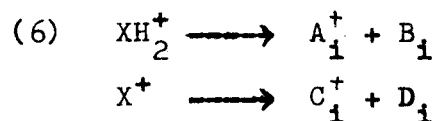
De aanwezigheid van dit soort ionen kan vaak een hulp zijn bij de snelle bepaling van het molekulgewicht van een monster-molekuul.

Een ook tamelijk veel voorkomende ion-molekuulreactie is de zogenaamde dimerisatie.



Het optreden van deze reactie is vooral afhankelijk van de druk van het monster en van de temperatuur.

De gevormde molekulaire ionen  $(M+1)^+$  en/of  $(M-1)^+$  kunnen en zullen ook vaak verder fragmenteren.

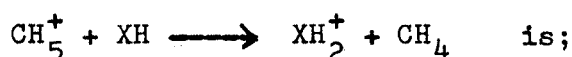


Bij deze reacties is ook weer een temperatuureffekt werkzaam. Naast het temperatuureffekt is het enthalpieverschil tussen produkten en reaktanten in de voorafgaande ionisatiereactie een zeer belangrijke faktor in de mate van fragmentatie. Als het reaktiegas een veel sterker Brönsted- zuur is dan het monstermolekuul, zal de ionisatie niet alleen goed verlopen, maar zal het gevormde molekulaire ion een grote hoeveelheid chemische energie meekrijgen. Dit kan dan leiden tot een hoge mate van fragmentatie.

Een belangrijke grootheid voor het enthalpieverschil ofwel het warmte-effekt van de ionisatiereactie is de zogenaamde PROTONAFFINITEIT.

b) de protonaffiniteit.

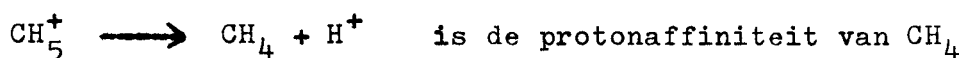
De reaktieenthalpie van de reaktie,



$$\Delta H_{\text{reaktie}} = \Delta H_f(\text{CH}_4) + \Delta H_f(\text{XH}_2^+) - \Delta H_f(\text{CH}_5^+) - \Delta H_f(\text{XH}) \quad \dots\dots\dots(a)$$

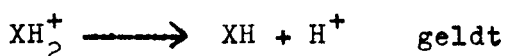
De protonaffiniteit is nu als volgt gedefinieerd,

Voor de reaktie



$$\text{PA}(\text{CH}_4) = \Delta H_f(\text{CH}_4) + \Delta H_f(\text{H}^+) - \Delta H_f(\text{CH}_5^+) \quad \dots\dots\dots(b)$$

en voor de reaktie



$$\text{PA}(\text{XH}) = \Delta H_f(\text{XH}) + \Delta H_f(\text{H}^+) - \Delta H_f(\text{XH}_2^+) \quad \dots\dots\dots(c)$$

Er blijkt na herschrijving van (a) met behulp van (b) en (c) dat:

$$\underline{\underline{\Delta H_{\text{reaktie}} = \text{PA}(\text{CH}_4) - \text{PA}(\text{XH})}}$$

De reaktie zal plaatsvinden als deze exotherm is, dat wil zeggen als  $\Delta H < 0$ ; Dit zal het geval zijn als  $\text{PA}(\text{XH}) > \text{PA}(\text{CH}_4)$ .

Voor de bepaling van protonaffiniteiten van verschillende stoffen en voor uitzonderingen op bovenstaande regel zie Appendix 1.

In onderstaande tabel 1 is een lijst gegeven van verschillende reaktiegassen en hun protonaffiniteiten (PA) en hydrideaffiniteiten (HA).

tabel 4

gas	ion	PA kcal/mol	HA kcal/mol	Naarmate de protonaffiniteit in de rij toeneemt, neemt de zuursterkte van het ion af. Iedere stof in de rij kan door het ion van een stof met lagere protonaffiniteit worden geïoniseerd.
H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> <sup>+</sup>	100	---	b.v. H <sub>2</sub> O + CH <sub>5</sub> <sup>+</sup> → CH <sub>4</sub> + H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>
CH <sub>4</sub>	CH <sub>5</sub> <sup>+</sup>	129	---	zal plaatsvinden, terwijl H <sub>2</sub> O + t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> <sup>+</sup> → C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> + H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> niet zal optreden.
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> <sup>+</sup>	160	272	
H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	165	---	
i-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> <sup>+</sup>	195	232	
NH <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	207	---	
NO	NO <sup>+</sup>	---	244	

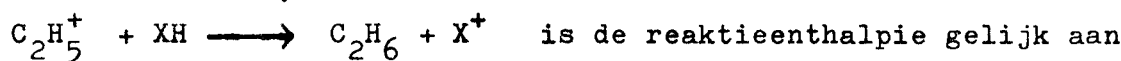
De waarden van de protonaffiniteiten bepalen dus of een reactie al dan niet plaatsvindt.

Hoegroter het verschil tussen de protonaffiniteiten, des te groter de overgedragen chemische energie, des te meer fragmentatie van het molekulare ion. In nevenstaande figuur 6' is dit duidelijk te zien. In bijlage 1 zijn in tabelvorm de protonaffiniteiten van een grote groep organische verbindingen gegeven.

Voor de hydrideabstractie geldt een analoge redenering als bij de protonaffiniteit. Bij de hydrideabstractie spreken we echter niet van Brönstedzuren, maar van Lewiszuren. Een Lewiszuur is een elektronpaaracceptor. De Lewiszuursterkte van het molecuul kan worden uitgedrukt in de hydrideaffiniteit van het ion. De hydrideaffiniteit van  $C_2H_5^+$  is gelijk aan de reactieenthalpie van de reactie:



Voor de reactie,



$$\Delta H_{\text{reactie}} = \Delta H_f(C_2H_6) + \Delta H_f(X^+) - \Delta H_f(C_2H_5^+) - \Delta H_f(XH)$$

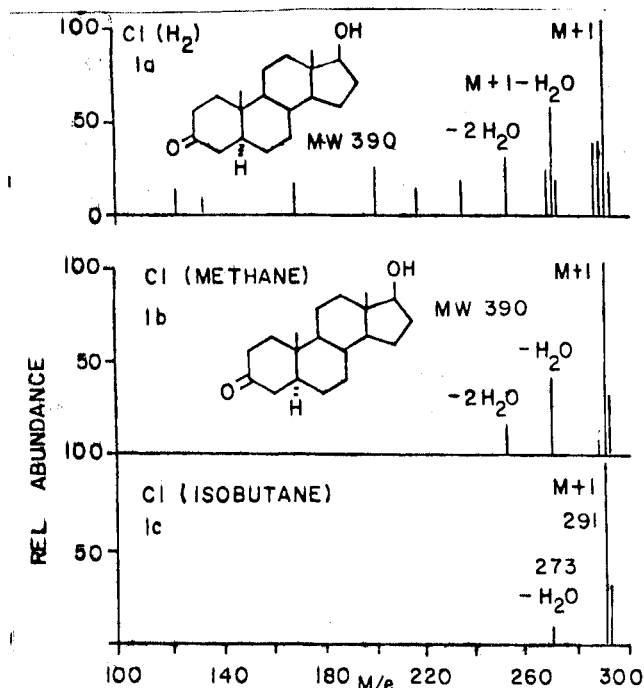
$$= HA(X^+) - HA(C_2H_5^+) \quad .$$

Reactie vindt plaats als  $\Delta H < 0$ , dus als  $HA(C_2H_5^+) > HA(X^+) \quad .$

Er geldt verder dat naarmate de hydrideaffiniteit toeneemt, ook de Lewiszuursterkte toeneemt. ( zie tabel 4).

c) De gevoeligheid.

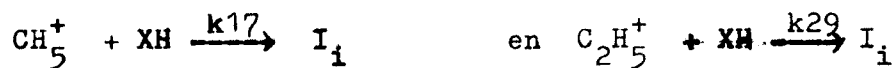
Een maat voor de relatieve gevoeligheid van twee verschillende stoffen is de verhouding van de ionenstromen, of piekhoogten van de twee stoffen, onder dezelfde experimentele omstandigheden. Volgens Munson (5) zijn er geen drastische verschillen in gevoeligheid voor  $CI(CH_4)$ , bij verschillende klassen van verbindingen.



Dihydrotestosterone CI mass spectra recorded with (a) hydrogen, (b) methane, and (c) isobutane as the reagent gases.

Fig. 6'

De reaktiesnelheidskonstanten voor de reacties



variëren voor verschillende monstermolekulen ongeveer van 2 tot 5 maal  $10^{-9}$  cm<sup>3</sup>/mol.s . De gevoeligheden zullen dus vaak niet meer dan een faktor twee van elkaar afwijken.

Wel geldt dat bij een hogere reaktiegasdruk een betere gevoeligheid bereikt kan worden, doordat er meer botsingen kunnen plaatsvinden die een hogere waarde van de snelheidskonstante veroorzaken.

Er zijn weinig gegevens bekend over de invloed van de verandering van het reaktiegas op de gevoeligheid van een bepaalde stof. Kwalitatieve waarnemingen leiden tot ongeveer gelijke gevoeligheden voor verschillende gassen. Dit onder het voorbehoud dat van een redelijke exothermiciteit van de ionisatiereactie sprake is. Er zijn vergelijkbare gevoeligheden gemeld van polyaminen voor de reactie met de gassen N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, en i-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>. (Whitman, Klemann, Field). Michnowicz en Munson namen geen noemenswaardige afname van de ionenstroom van valerophenon waar bij de verandering van het reaktiegas van CH<sub>4</sub> naar H<sub>2</sub>O. Ze konkludeerden dat de protonoverdracht van CH<sub>5</sub><sup>+</sup>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup> en H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> met ongeveer dezelfde snelheidskonstanten plaatsvonden. Ditzelfde werd gevonden voor verandering van het reaktiegas in de gasmengsels N<sub>2</sub>/NO, CH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> en CH<sub>4</sub>/(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O, door geleidelijke verandering van de mengverhouding.

Als de CI reacties redelijk exotherm zijn, kunnen we verwachten dat de snelheidskonstanten en daarmee de gevoeligheden geen grote veranderingen zullen ondergaan bij verandering van de structuur van het reaktiegas of monstermolekuul. Duidelijke veranderingen van snelheidskonstanten treden pas dan op als een reactie endotherm wordt door verandering van het reaktiegas of van het neutrale molekuul.



## II.2.2. PROFILERING MET DIRECTE CHEMISCHE IONISATIE MASSA-SPECTROMETRIE.

Om molekuulgewichtprofielen te verkrijgen van mengsels van stoffen is het zaak de fragmentatie vrijwel volledig te onderdrukken. Naast het kiezen van een geschikt reaktiegas zijn er nog andere mogelijkheden om die fragmentatie te verminderen en om thermische decompositie van het monster op de top van de " direct insertion probe" te voorkomen.

Baldwin en McLafferty beschreven een methode waarbij het monster was aangebracht op de verlengde tip van een direct insertion probe (DIP), waarbij het monster tussen filament en collector gebracht werd, dus midden in het ionenplasma van het reaktiegas. De temperatuur van de DIP moest slechts tot waarden die meer dan 150° lager waren dan normaal, worden opgewarmd om een spectrum te kunnen opnemen ( lit.49). Dit wordt ook wel de in-beammethode genoemd. Hunt gebruikte veld-desorptie-emitters als solid probes onder CI-kondities. Componenten die thermisch labiel zijn zoals creatine, arginine en guanosine gaven daarbij moleculaire ionen terwijl dit onder normale CI kondities niet plaatsvindt ( lit.50).

Zeer recent publiceerden Hansen en Munson een variatie op de in-beam techniek. Het monster werd daarbij aangebracht op de verlengde tip van de DIP, die nu bestond uit een Teflon capillair. Alhoewel de intensiteit van de molekulair ionen van verschillende stoffen wel sterk afhankelijk was van de probetip afstand tot de electronenbundel, bleek deze afstand voor de verschillende stoffen hetzelfde te zijn (lit.51).

Bij het opnemen van molekuulgewichtprofielen wordt het monster op de top van een DIP aangebracht, en direct in de ionenbron van de massaspectrometer geschoven. Er gaat dus geen gaschromatografische of andersoortige voorscheiding aan vooraf.

In het ideale geval krijgen we een spectrum waarin iedere piek een bepaalde komponent uit het mengsel vertegenwoordigd, en een m/e-waarde bezit die karakteristiek is voor het molekuulgewicht.

Op deze wijze ontwikkelden Issachar en Yinon (lit.52) een methode om in urine aminozuren te profileren, zonder voorafgaande scheiding. Dezelfde methode pasten zij toe op analyse van carbonzuren in urine (lit.53).

Anbar, Dyer en Scolnick gebruikten ook MS molekuulgewichtprofielen in de klinische diagnose van metaboliëten in urine. Ze pasten daarbij de veld-desorptie ionisatiëtechniek toe, en niet de chemische ionisatie (lit.54).

Mee, Korth en Halpern konden op deze wijze snelle en kwantitatieve bepalingen van aminozuren in het bloed doen (lit.55).

Boerner (lit.56), Zitrin en Yinon (lit.57), en Tatematsu (lit.58) pasten de direct-MS techniek toe op de analyse en identificatie van drugs in plasma.

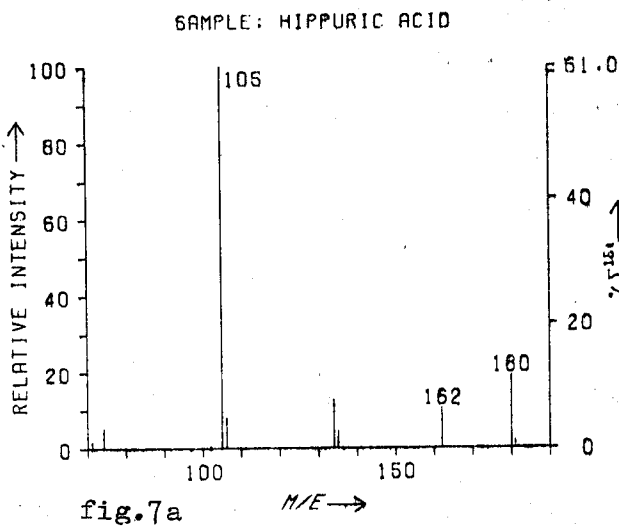
In plaats van CI gebruikten Grigsby et.al.(lit.59) de EI-ionisatie voor de directe MS-analyse van eenvoudige mengsels van stoffen.

In ons onderzoek ontwikkelden we een CI-direct MS profilerings-techniek voor componenten in uremisch ultrafiltraat. Ultrafiltraat is kwa samenstelling een veel eenvoudiger mengsel dan bijvoorbeeld plasma of serum. We kunnen hier aanzienlijk minder storing verwachten van pyrolyseprodukten van eiwitten en koolhydraten, die in de profilering van serum of plasma met grote waarschijnlijkheid zullen optreden.

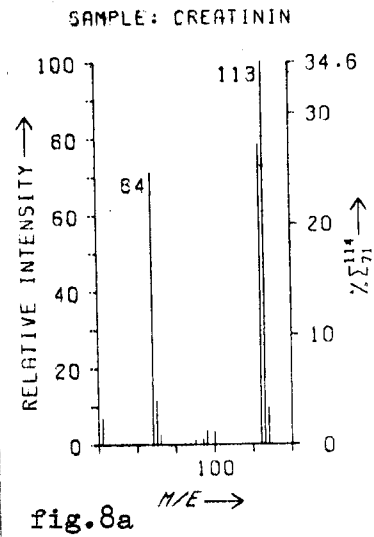
II.2.3. EXPERIMENTEEL, DE KEUZE VAN OPERATIONELE PARAMETERS.

II.2.3.1. Keuze van het reaktiegas.

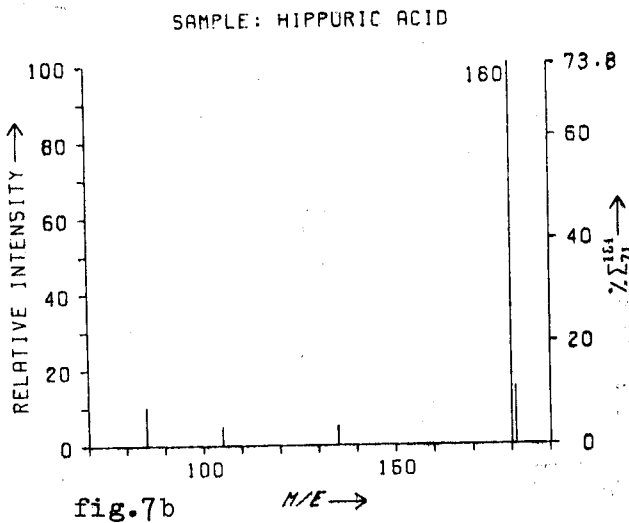
Zoals we reeds gezien hebben is de protonaffiniteit van het reaktiegas van invloed op de mate van fragmentatie. In tabel 4 werden de protonaffiniteiten van een aantal gassen gegeven. Naarmate het verschil in protonaffiniteit tussen reaktiegas en monstermolekule kleiner is, zal de protonoverdracht van reaktiegas naar monster minder exotherm verlopen en zal het gevormde moleculaire ion minder inwendige energie meekrijgen. In figuur 7 zijn de massaspectra gegeven van hippuurzuur met methaan als reaktiegas(a), en isobutaan (b). Figuur 8 geeft de spectra van kreatinine met electron impact en isobutaan-CI.



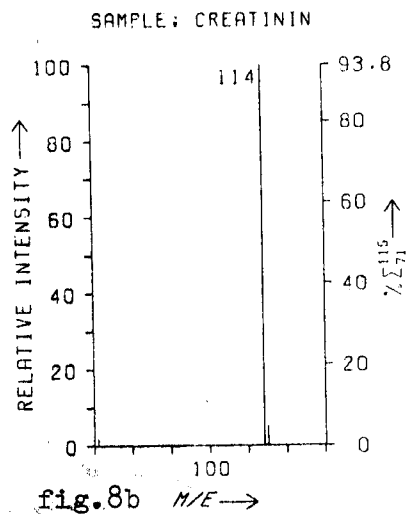
SAMPLE: HIPPURIC ACID  
MOLWEIGHT: 179  
CIT (METHANE), PRESSURE: 0.12 TORR.  
FIN 4000, 1SEC/SCAN  
EL-ENERGY: 23 EV, EL-CURRENT: 0.2 MA  
SOURCE TEMP.: 220, PROBE TEMP.: 150  
AD SCHOOTS - 771110



SAMPLE: CREATININ  
MOLWT: 113  
FIN 4000, MODE: EI, EL-EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSF.: 1 SEC/SCAN  
SOURCE TEMP.: 250, PROBE TEMP.: 170  
INLET: PROBE INLET CONDIT...  
AD SCHOOTS - 780208



SAMPLE: HIPPURIC ACID  
MOLWEIGHT: 179  
CIT ISOBUTAN, PRESSURE: 0.15 TORR.  
FIN 4000, 1SEC/SCAN  
EL-ENERGY: 15 EV, EL-CURRENT: 0.2 MA  
SOURCE TEMP.: 220, PROBE TEMP.: 160  
AD SCHOOTS - 771110



SAMPLE: CREATININ  
MOLWEIGHT: 113  
CIT ISOBUTAN, PRESSURE: 0.24 TORR.  
FIN 4000, 1SEC/SCAN  
EL-ENERGY: 25 EV, EL-CURRENT: 0.2 MA  
SOURCE TEMP.: 200, PROBE TEMP.: 150  
AD SCHOOTS - 771110

fig.7

fig.8

Aangezien we de profielen zo eenvoudig mogelijk willen houden lijkt isobutaan het meest geschikt. Hieronder (fig.9) geven we nog de spectra van ultrafiltraat met isobutaan en methaan als reaktiegas.

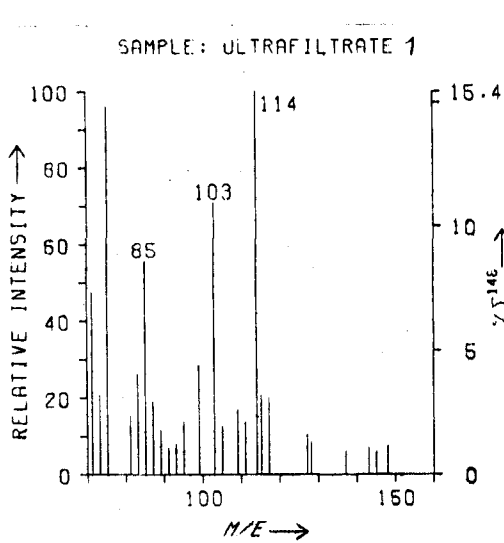


fig.9a. ultrafiltraat met CI-methaan.

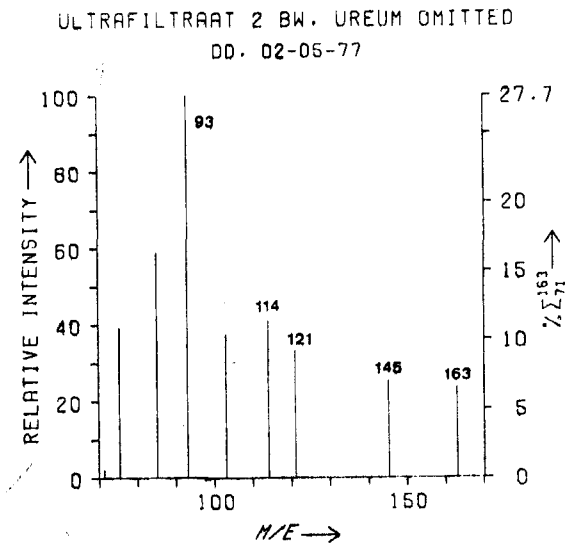
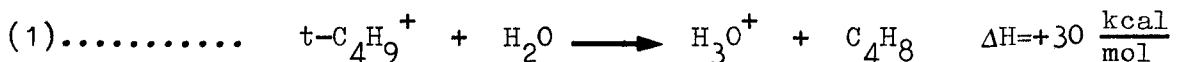
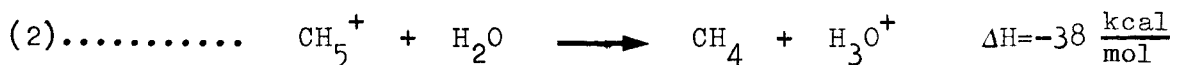


fig.9b. ultrafiltraat met CI-isobutaan.

Hieruit blijkt duidelijk de geringere fragmentatie bij isobutaan. Door variatie van de reaktiegasdruk is het mogelijk de samenstelling van het ionenplasma van isobutaan te wijzigen (zie paragraaf reaktiegasdruk). We streven ernaar de intensiteit van het meest intense ion m/e 57 ( $t\text{-C}_4\text{H}_9^+$ ) minstens tien maal zo hoog te maken als het ion op m/e 43 ( $\text{C}_3\text{H}_7^+$ ). Een extra voordeel van isobutaan is dat door zijn protonaffiniteit van 195 kcal/mol eventueel aanwezig water niet wordt geïoniseerd, zodat de plasmasamenstelling van het reaktiegas niet aan veranderingen onderhevig is tijdens de analyses. De protonaffiniteit van water is 165 kcal/mol, hetgeen betekent dat de volgende reactie niet zal verlopen:



Wanneer we methaan zouden gebruiken kregen we wel problemen met het water:



Een beperking van de mogelijkheden van isobutaan als reactiegas is gelegen in het feit dat een aantal stoffen niet geïoniseerd zullen worden, vanwege hun lage PA's. Zulke stoffen zouden kunnen zijn alkanen, lagere aldehyden en lagere carbonzuren. In bijlage 1 vindt men een tabel met protonaffiniteiten voor verschillende stoffen en stofklassen.

Ammoniak, met een PA van 207 kcal/mol is ook een reactiegas dat voor ons doel interessant is (lit.60,61,48).

Het ionenplasma bestaat grotendeels uit  $\text{NH}_4^+$ -ionen (PA=207 kcal/mol). Daarnaast komen nog voor de ionen  $(\text{NH}_3)_n\text{H}^+$ , met  $n=2,3,\dots$ .

Het ion met  $n=2$  heeft een PA van 220 kcal/mol, en dat met  $n=3$  een waarde van 245 kcal/mol. Deze hoge PA's zijn tegelijk een voordeel en een nadeel. Een nadeel is dat slechts zeer basische monstermolekullen zullen worden geprotoneerd, waardoor minder componenten kunnen worden geprofileerd dan met isobutaan. Anderzijds worden een reeks van stoffen met elektronrijke groepen geïoniseerd met het gehele  $\text{NH}_4^+$ -ion. Ook kan een combinatie van additie en protonering optreden. Daardoor zouden  $\text{CI}(\text{NH}_3)$ -profielen wel eens meer informatie over de componenten op kunnen leveren dan die van  $\text{CI}(i\text{-C}_4\text{H}_{10})$ . De verschillende stofklassen, en de specifieke activiteit van het ammoniakreactiegas daarop zijn:

1. Amides, amines, enkele alfa,beta-onverzadigde ketonen.

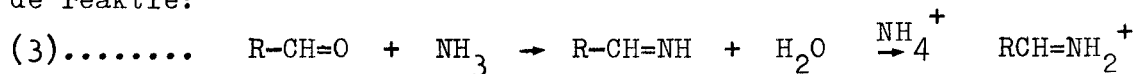
Deze stoffen vertonen naast een  $(M+1)^+$ -ion vaak ook nog  $(M+\text{NH}_4)^+$ . Pieken bij massawaarden die 35, of 52 eenheden hoger liggen dan het molekulgewicht van het monstermolekuul kunnen ook voorkomen, additie van  $(\text{NH}_3)_n\text{H}^+$  met  $n=2$  en  $n=3$ . Dit wordt waarschijnlijker wanneer we werken met zuiver  $\text{NH}_3$  als reactiegas, dus wanneer de partiële druk van  $\text{NH}_3$  hoog is.

2. Ketonen, aldehyden, esters, en zuren zullen alleen  $(M+\text{NH}_4)^+$  geven. Het zijn molekullen met elektronrijke groepen, waarvan de protonaffiniteit te laag is om een molekulaair ion te vertonen.

3. Ethers, alcoholen, fenolen, nitroverbindingen, koolwaterstoffen en aromaten geven noch additie noch protonering.

Een belangrijk nadeel van ammoniak is nog dat het niet chemisch inert is, zowel ten opzichte van de apparatuur als tegenover de monstermolekullen. Voor wat betreft de monstermolekullen kunnen we het volgende voorbeeld geven. De  $\text{CI}(\text{NH}_3)$  spectra van aldehyden

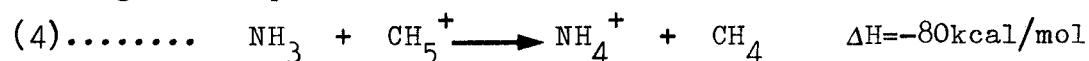
vertonen een ion met een massa gelijk aan het molekulgewicht.  
Dit is echter geen molekulaair ion maar het produkt uit onderstaande reaktie:



Het produkt uit de eerste reaktie noemt men een Schiff-base.  
Het optreden van dit soort reakties kan dus tot misverstanden leiden.

Het werken met zuiver ammoniak heeft een schadelijke uitwerking op de apparatuur. Over de invloed van  $NH_3$  op de gloeidraad (filament) zijn tegenstrijdige verklaringen afgelegd. Het oplossen van de ammoniak in de pompolie is echter zeer schadelijk.

Al deze problemen kunnen grotendeels worden vermeden wanneer we het ammoniak verdunnen in een gasvormig oplosmiddel, bijvoorbeeld methaan of isobutaan. In dat geval zal de volgende ionenreaktie in de gasfase optreden:



De volgende reaktie treedt echter niet op:



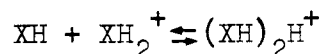
Wanneer we aannemen dat in eerste instantie zowel  $NH_3^-$  als  $CH_4^-$  molekulen worden geïoniseerd na beschieting met elektronen, zal reaktie (4) snel verlopen en reaktie (5) in het geheel niet.

Dat betekent in de praktijk dat een gasmengsel van  $NH_3$  en  $CH_4$  in een mengverhouding van 1 op 50 een ionenplasma heeft waarin  $NH_4^+$  het belangrijkste ion is.

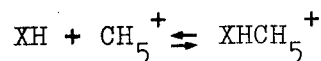
### II.2.3.2. Keuze van de brontemperatuur.

De CI-reakties in de ionenbron van de massaspectrometer zijn in verschillende experimenten temperatuurafhankelijk gebleken (lit. 62,63). We kunnen daarbij twee soorten reakties onderscheiden:

1. De fragmentatie van het molekulaair ion  $XH_2^+ \rightarrow A_i + B_i$
2. Ion-molekuulreakties, zoals de dimerisatie



of additie



De snelheidskonstante van de reactie uit de eerste categorie kan beschreven worden door de vergelijking (lit.63):

$$k = A \cdot \exp(-E_a/kT) \quad ; \text{waarin } A \text{ de frekwentiefactor}$$

een maat voor het aantal botsingen, en  
 $E_a$  de aktiveringsenergie.

anders geschreven:  $\log k = A - E_a/kT$

Grafisch uitzetten van  $1/T$  versus  $\log k$  levert een zogenaamde Arrheniusplot. Uit deze vergelijking volgt dat  $k$  groter wordt bij toenemende temperatuur, met andere woorden méér fragmentatie bij hogere temperatuur.

De tweede categorie, de ion-molekuulreacties blijken te kunnen worden beschouwd als evenwichtsreacties. De evenwichtskonstante is op de volgende wijze temperatuurafhankelijk:

$$\log K_p = - \Delta G/RT \quad ; \Delta G \text{ is de reactie vrije enthalpie}$$

$K$  is de verhouding van de kon-  
centraties van produkten en  
reaktanten.

Een grafische weergave van  $\log K_p$  tegen  $1/T$  geeft een lineair verband, en heet een van 't Hoffplot.

Het blijkt dus dat  $K_p$  kleiner wordt bij toenemende temperatuur. Dit wil zeggen dat bij hogere temperatuur de dimerisatie en additie minder belangrijk worden.

Keuze voor een " extreme " temperatuur geeft dus óf te veel fragmentatie, óf te veel dimerisatie en additie.

Een vergelijking van ultrafiltraat profielen bij een brontemperatuur van  $100^\circ$ ,  $150^\circ$ ,  $180^\circ$  en  $210^\circ$  leverde de volgende konklusies op:

a) De profielen bij  $180^\circ$  en  $210^\circ$  gaven geen noemenswaardige verschillen te zien.

b) De profielen bij  $100^\circ$  en  $150^\circ$  vertoonden een hogere mate van dimerisatie van het ureum, dat zoals bekend in hoge konsentrasie voorkomt in uremisch ultrafiltraat. Overigens moeten we hier opmerken dat een zekere dimerisatie van ureum wel gewenst is omdat het resulterende ion een indikatie geeft over het ureum, terwijl

het molekulaire ion zelf ( $m/e$  60) een zodanige intensiteit in de profielen zou vertonen dat de overige componenten daarbij in het niet zouden vallen. Bovendien bevindt dit molekulaire ion zich zodanig dicht in de buurt van het reactiegas  $m/e$  57 van isobutaan dat we genoodzaakt zijn het begin van het massabereik te stellen op  $m/e$  70.

Een ander aspect dat belangrijk is voor de keuze van de brontemperatuur is het toepassen van een temperatuurprogramma van de probe. Tengevolge van de verschillende vluchtigheden van de componenten in ultrafiltraat bleek het noodzakelijk de probe te programmeren van  $50^{\circ}\text{C}$  tot  $300^{\circ}\text{C}$ . Dat wil zeggen dat gedurende het hele traject, dat de probetemperatuur hoger is dan die van de bron, stoffen die van de probe zijn afgedampt in de bron zullen kondenseren en zo op den duur een sterke verontreiniging van de bron zullen veroorzaken die invloed heeft op de gevoeligheid van de analyses.

Op grond van al deze argumenten kwamen we tot de konklusie dat een brontemperatuur van  $200^{\circ}\text{C}$  het meest geschikt was. Bovendien kan die temperatuur beter wat hoger zijn dan wat lager vanwege de dimerisatie en de vervuiling. Dat er bij een aantal analyses andere brontemperaturen werden gebruikt is een gevolg van het feit dat ten tijde van deze "vroege" analyses nog niet was besloten tot een temperatuur van  $200^{\circ}\text{C}$ .

#### II.2.3.3. De elektronenenergie.

Herhaalde waarnemingen toonden aan dat een elektronenenergie van 41 eV het beste was, omdat daar de intensiteit van het  $m/e$  57-ion al bijna maximaal was en de verhouding van  $m/e$  57 en  $m/e$  43 het gunstigst. De metingen zijn neergeslagen in figuur 10.

In de literatuur wordt vaak een elektronenenergie gemeld van enkele honderden elektronvolts bij CI-analyses. Een mogelijke verklaring voor het feit dat op dit apparaat (Finnigan 4000) veel lagere optima worden gemeten voor de elektronenenergie zou kunnen liggen in de brongeometrie van dit specifieke apparaat. Dit vermoeden wordt versterkt door het feit dat de elektronenenergie slechts tot ca. 200 eV is te regelen.

Ondanks de lage elektronenenergie is er toch onmiskenbaar sprake van "echte" CI-spektra, wanneer we de aard van de molekulair ionen, en van de karakteristieke fragmentatie in ogenschouw nemen.



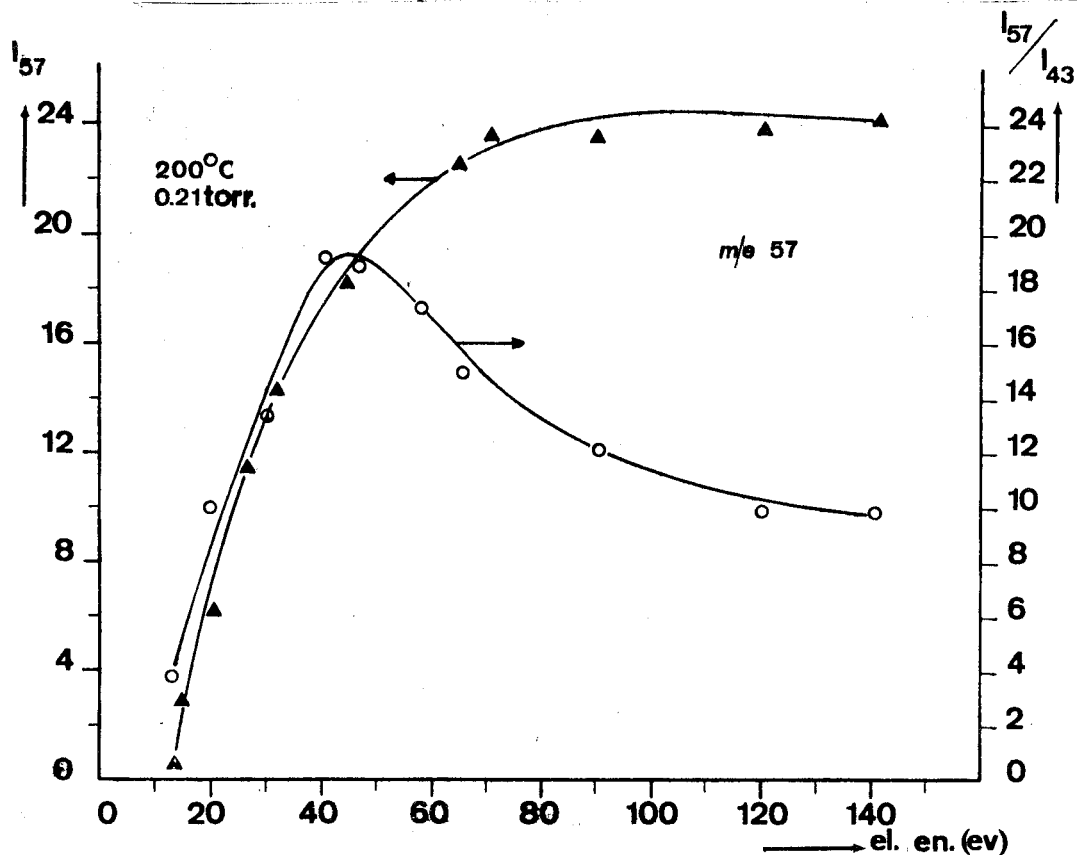


fig. 10

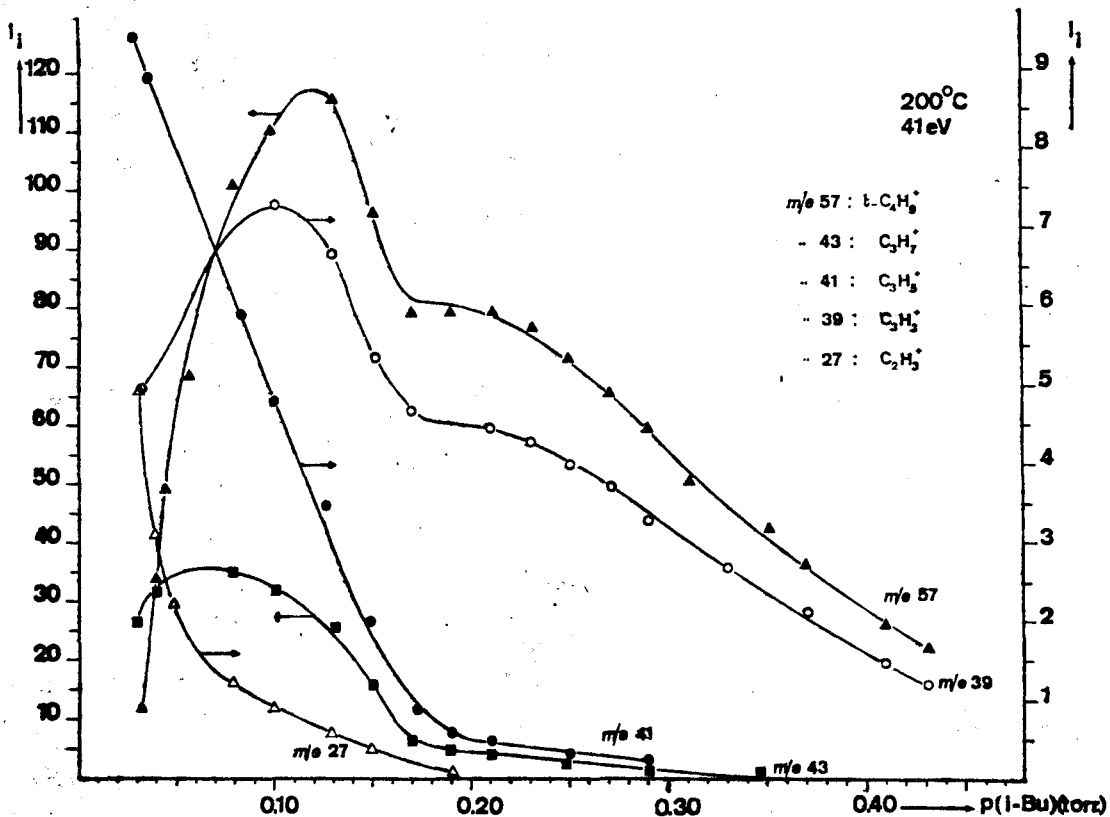
#### II.2.3.4. De druk van het reaktiegas.

De samenstelling van het ionenplasma van het reaktiegas is afhankelijk van de druk van dat gas in de ionenbron. De mate van ionisatie van de monstermolekulen wordt onder meer bepaald door de samenstelling van dat plasma en door de intensiteiten van de verschillende ionen.

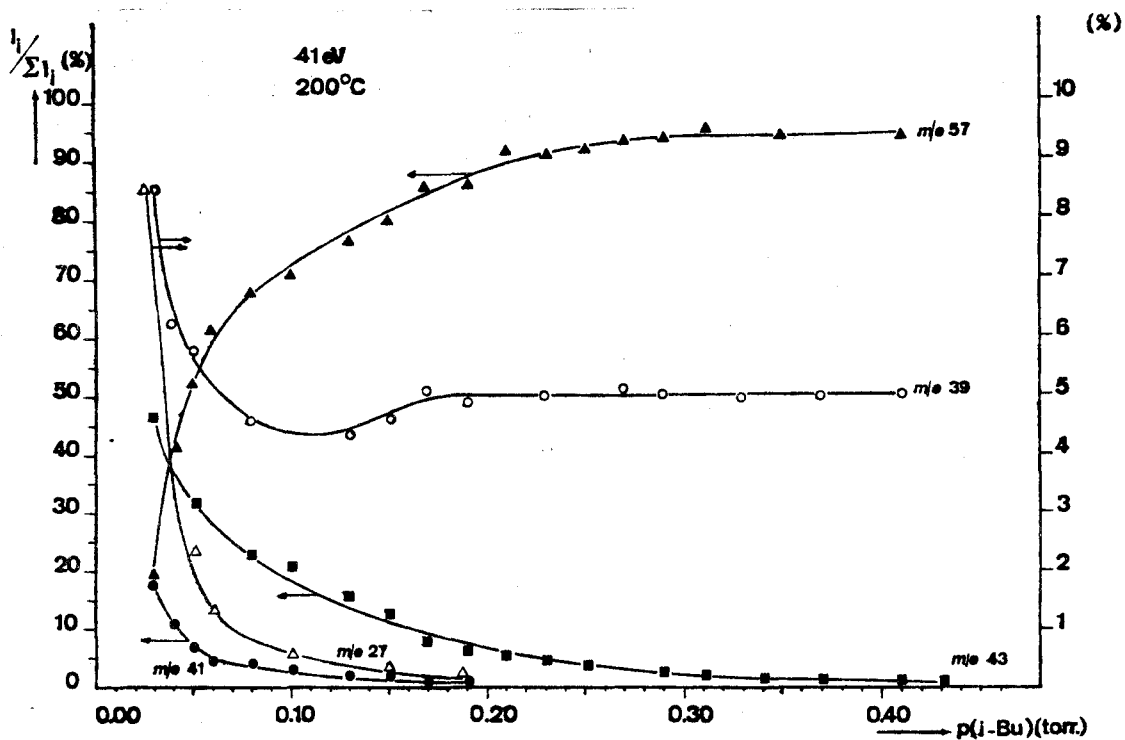
Daarom werden de piekhoogten van de verschillende reaktiegasionen gemeten bij verschillende drukken. Daarna werden de relatieve piekhoogte berekend en uitgezet tegen de druk (zie figuur 11 en 12).

Het ionenplasma van isobutaan bestaat uit de volgende ionen:  $t\text{-C}_4\text{H}_9^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3^+$  bij respectievelijke  $m/e$ -waarden, 57, 43, 41, 39, 27. Enkele andere ionen komen ook nog voor maar met zeer lage intensiteit.

De metingen werden gedaan bij een brontemperatuur van  $200^{\circ}\text{C}$ , en een elektronenenergie van 41 eV.. In figuur 11 kunnen we zien dat bij een druk van ca. 0,12 torr. een maximale absolute intensiteit optreedt voor het  $t\text{-C}_4\text{H}_9^+$ -ion ( $m/e$  57).



figuur 11



figuur 12

Daar blijkt ook de ionisatie van monstermolekulen maximaal te zijn.

In de figuur 12 zien we dat boven 0,17 torr. de verhouding van m/e 57 tot m/e 43 groter wordt dan tien. Om een eenduidige plasmasamenstelling te houden in het verloop van de analyses streefden we naar een (arbitraire) verhouding van deze twee ionen van ongeveer 10. Daarom kozen we voor de analyses een reaktiegasdruk van 0,16-0,17 torr.. Bij 0,12 torr. was de intensiteit van m/e 57 dan wel maximaal maar daar was de hoogte van m/e 43 nog altijd 25% van die van 57.

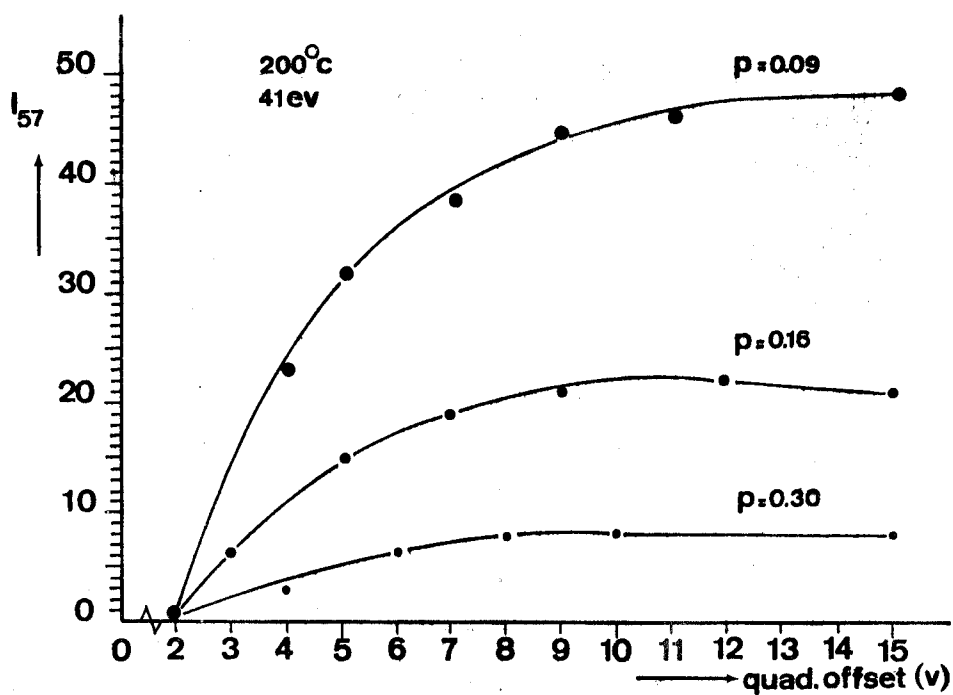
De eenheden op de ordinaat in figuur 11 zijn arbitraire eenheden. De eenheden van de linker en rechteras zijn hetzelfde, zodat "10" op de linkeras ook werkelijk 10 maal zo groot is dan "1" op de rechter. Tot slot moet worden opgemerkt dat de absolute intensiteiten bij herhaalde experimenten nogal konden afwijken. Dit geldt echter niet voor de onderlinge verhoudingen en de plaats van het maximum in figuur 11. Verder geldt dat de optima in elektronenenergie en reaktiegasdruk in het verloop van maanden konden veranderen, zodat de hier gegeven getalwaarden niet onbetreft juist hoeven te zijn.

#### II.2.3.5. De quadrupole offset-spanning.

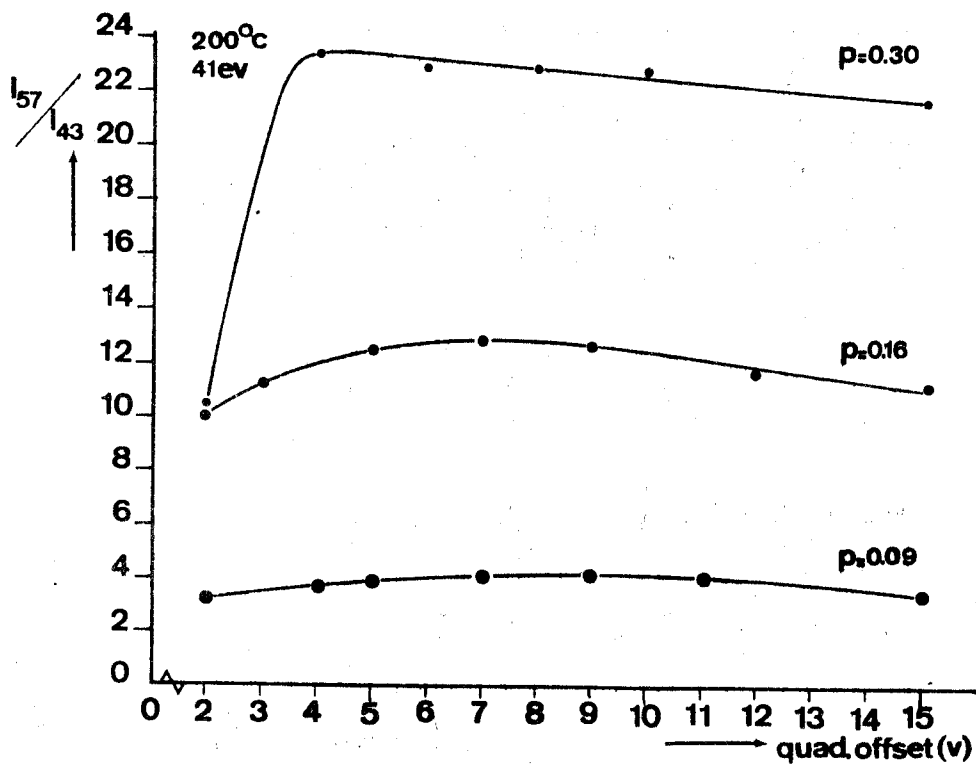
Deze spanning dient om ionen uit de bron de quadrupole analysator<sup>x</sup> in te drijven. Haar functie in de massascheiding is veel minder belangrijk dan de versnelspanning, zoals die toegepast wordt bij magnetische afbuigingsapparatuur.

Variatie van de spanning, levert voor de absolute intensiteit van m/e 57 een verloop zoals gegeven in figuur 13. We zien dat de intensiteit van m/e 57 voor verschillende reaktiegasdrukken naar een maximum nadert. Een offset-spanning van 7,5 V levert bij 0,16 torr. een  $I_{57}$ -waarde op die 90% van de maximale waarde is. Hogere offsetspanningen geven een relatief geringe toename van de intensiteiten terwijl een steeds grote piekvervorming gaat optreden. Een spanning van 7,5 V lijkt daarom voor ons doel een geschikte waarde.

<sup>x</sup> voor een korte bespreking van het quadrupole massascheidingsprincipe zie bijlage 2.



figuur 13



figuur 14

#### II.2.4. APPARATUUR EN MATERIALEN.

Alle analyses werden uitgevoerd op een Finnigan 4000, dual EI/CI massaspectrometer.

On-line plots van de massaspectra kwamen tot stand door middel van een koppeling met de DCC D-116E minicomputer en een Zeta 100 plotter. Het MS-computer interface is ontwikkeld door Hans Wijtvliet.

De data acquisitie en verwerkings software werd ontwikkeld door Hans Wijtvliet en Anton Drouen. (programma's FIN en FNGA).

De off-line verwerking van spectra kwam tot stand door digitaliseren van spectra van de UV-recorder met de MS-unplotter (lit.64) waarna de ponsband werd verwerkt door de centrale Burroughs B-6700-computer. De totale ionenstroom werd geregistreerd op een Yokogawa 3047 recorder.

Als reaktiegassen werden zeer zuiver methaan ( $\text{CH}_4$ , code N45) en isobutaan ( $i\text{-C}_4\text{H}_{10}$ , code CH35) gebruikt. In de toevoerleiding van het methaangas was een Oxisorb-filter opgenomen. Van het gebruikte ammoniakgas was de zuiverheid niet bekend.

De drie gassen werden via verschillende inlaatpoorten in de massaspectrometer gebracht. Om menging van methaan en ammoniak in de leidingen van de MS mogelijk te maken werden in de toevoerleidingen twee Fischer & Porter rotameters opgenomen naast twee naaldventielen om de gassen onafhankelijk van elkaar te kunnen regelen. Voor de problemen bij het mengen van gassen verwijzen we naar bijlage 3.

#### II.2.5. METHODEN.

Serum en ultrafiltraatmonsters van uremische patienten en gezonde personen waren afkomstig van het St. Josephziekenhuis te Eindhoven en het universitair ziekenhuis van de universiteit van Gent.

De door ons gebruikte ultrafiltraatmonsters kunnen in twee categorieën worden verdeeld. De monsters uit het St. Josephziekenhuis waren afkomstig van een ultrafiltratie-behandeling van uremische patienten. Van serummonsters uit Gent ( en ook Eindhoven) werd in eigen beheer ultrafiltraat gemaakt door deze te filtreren over Diaflo Ultrafilters XM-50 en PM-30 van de firma Amicon.

Opvallend was de hoge intensiteit van m/e 93 in de door ons zelf gefiltreerde monsters. Dit bleek te worden veroorzaakt door gly-

cerol in de filters. Dit glycerol was daaraan door de fabrikant toegevoegd om de filters minder bros en breekbaar te maken. Na deze ontdekking worden de filters eerst gespoeld met gedestilleerd water.

Hoeveelheden van 10  $\mu$ l werden met behulp van een Hamilton injectiespuit ingebracht in de vaste stof probes (kwarts). De monsters werden vervolgens bij kamertemperatuur onder een  $N_2$ -stroom drooggeblazen tot 10% van het oorspronkelijke volume. De overgebleven 10% kon in de vakuumsluit van de massaspectrometer snel worden verwijderd. Dit laatste proces kan worden gevolgd door de "inlet"-druk in de gaten te houden. Nadat de druk lager was geworden dan 0,08 torr., werd de sluis geopend en de DIP (direct insertion probe) naar binnen geschoven in de ionenbron. De begintemperatuur (50°C) van het probe-temperatuurprogramma werd bereikt door de GC-oven tot die temperatuur af te koelen.

Nadat het "ready"-signaal was gegeven door de microprocessor werd de probe met de daarvoor dienende plug op de microprocessor aangesloten waardoor tegelijkertijd de temperatuurprogrammering van de GC wordt uitgeschakeld.

Vóórdat de probe in de bron werd gebracht werden eerst alle CI-MS condities ingesteld op de optimale waarden:

elektronenenergie: 41 eV voor isobutaan, 80 eV voor ammoniak.

offset-spanning: 7,5 V.

reactiegasdruk: 0,16-0,17 torr. voor isobutaan, 0,04 torr. voor  $NH_3$ .

brontemperatuur: 200°C.

probetemp. programma: 1' 50°C/ 20° per min./ 300°C, 3'.

versterker gevoeligheid:  $10^{-8}$  A/V.

emissie stroom: 0,2 mA.

scansnelheid: 1 sec/scan.

coëfficiënten A en B van de ijklijn voor stuurspanning-massacorrelatie werden bepaald met behulp van het markergas "FC 43".

Na de start van het temperatuurprogramma werd om de ca. 50° een spectrum opgenomen.

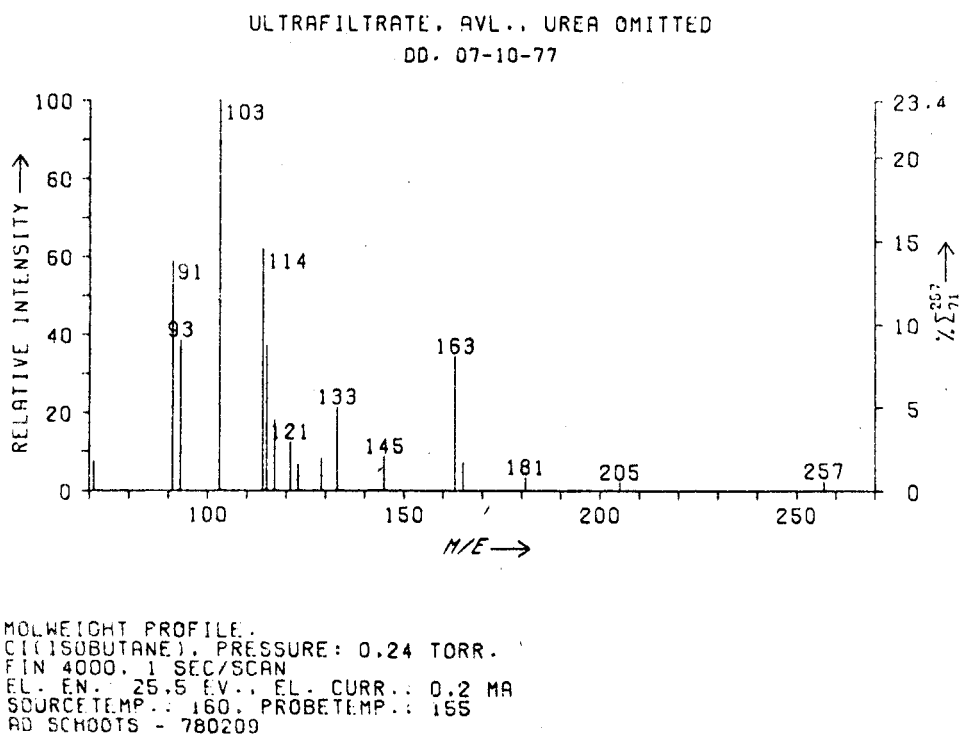
## II.2.6. RESULTATEN EN INTERPRETATIE.

### II.2.6.1. Isobutaan als reaktiegas

Er werden molekuulgewichtsprofielen opgenomen van ultrafiltraat van enkele uremische patienten ( AvL, Eindhoven, BW, Gent) , en van enkele gezonde personen ( o.a. PN, Gent).

Bovendien werden analyses gedaan van ultrafiltraatpools van uremisch serum vóór en na dialyse, en van gezonde personen.

Bij wijze van voorbeeld geven we het spectrum van uremisch ultrafiltraat ( AvL, 07-10-'77), dat werd opgenomen bij een probe-temperatuur van 155°C. (fig.15).



figuur 15

Enkele andere spectra behorende bij deze analyse zijn te vinden in bijlage 4.

Wanneer we de profielen van AvL vergelijken met andere uremische profielen zien we een aantal pieken steeds terugkeren. Vergelijking met profielen van gezonde personen levert zowel kwalitatieve als kwantitatieve verschillen op.

We zullen nu de belangrijkste gemeenschappelijke pieken uit de uremische profielen bespreken.

Pieken bij m/e 91 en m/e 121 representeren waarschijnlijk de vluchtigste componenten in onze monsters, zij bereiken het eerst hun maximale intensiteit. We hebben hier waarschijnlijk te doen met glycerol (MW: 92) en ureum (MW:60). Omdat het massabereik van de MS ingesteld op de grenzen 70 en 300 zal niet het moleculaire ion, maar wel het dimerisatie-ion van ureum (m/e 121) in de profielen verschijnen. Referentiespectra deze en andere stoffen zijn te vinden in bijlage 5. van

Een piek bij m/e 91 zou afkomstig kunnen zijn van melkzuur, of eventueel oxaalzuur. De stof is in ieder geval minder vluchtig dan ureum. Isotachoforetische en GC-MS experimenten hebben de aanwezigheid van zowel ureum en glycerol als melkzuur aangetoond. Ten overvloede zij nog vermeld dat het niet mogelijk is op basis van de CI-MS profielen definitieve konklusies te trekken omtrent de identiteit van de aanwezige componenten omdat die profielen te weinig structuurinformatie in zich dragen.

m/e 103 is een piek die gedurende de analyse korte tijd de hoogste piek uit het profiel wordt. We hebben hier waarschijnlijk te maken met een sommatie van piekhoogten van verschillende stoffen en fragmenten: Acetoazijnzuur (MW:102), valeriaanzuur (MW:102) en een fragment van glucose op deze massawaarde.

m/e 114 is bijna zeker het moleculair ion van kreatinine, waarvan bekend is dat het in hoge concentraties in bloedplasma van uremische patienten voorkomt.

m/e 127 voorzover aanwezig moet waarschijnlijk worden teruggevoerd op het aanwezige glucose, waarvan het een fragment is.

m/e 145 is ook een fragment van glucose. Opvallend was echter dat in verschillende analyses deze piek hoger was dan die bij m/e 163 (ook afkomstig van glucose), terwijl in het referentiespectrum van glucose de intensiteit van 145 ongeveer de helft van die van 163 was. Dit zou er op kunnen wijzen dat ook nog (een) andere komponent(en) bijdragen in de ionenstroom op deze massawaarde.

m/e 149 kwam in enkele analyses tamelijk intens voor, vooral in het lagere temperatuurgebied. De verdenking dat het hier gaat om een ion karakteristiek voor plasticizers ( met name dioctylftalaat) ligt voor de hand.



In dat geval zouden we echter verwachten dat in iedere analyse de intensiteit van dit ion ongeveer gelijk zou zijn. Daar dit niet het geval was moeten we de mogelijkheid openlaten dat hier nog een onbekende component in het spel is.

m/e 153. Wanneer we rekening houden met de aard van de te verwachten componenten in uremisch ultrafiltraat, dan zijn er een aantal kandidaten: arabinitol (MW:152), xanthine (MW:152), mannonzuur (MW:152), amandelzuur (MW:152) en hydroxyfenylazijnzuur (MW:152).

Amandelzuur en waarschijnlijk ook hydroxyfenylazijnzuur geven echter een sterke waterafsplitsing, resulterend in een hoogste piek bij m/e 135 (zie ref. spectra, bijlage 5). Zo'n piek werd echter niet aangetroffen zodat deze componenten niet in aanmerking komen.

m/e 163. Dit is het meest intense fragmention van glucose. Het glucose geeft dus pieken op m/e 163, 145, 127, 103, 91, en 85 (zie ref. spectrum in figuur 16).

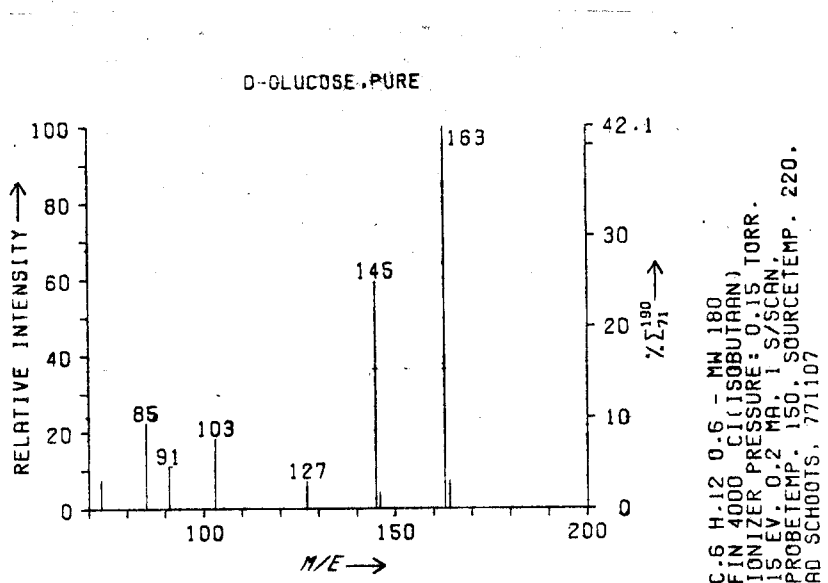


Fig. 16.

Opvallende is de afwezigheid van het moleculaire ion dat we op m/e 181 zouden verwachten.

m/e 181. In de profielen van uremisch ultrafiltraat verschijnt bij tamelijk hoge probetemperatuur een piek op deze massawaarde. Het is echter uitgesloten dat dit het moleculair ion van glucose is.

Ten eerste komt deze piek in het referentiespectrum niet voor en ten tweede verschijnt hij bij een zodanige temperatuur dat de intensiteiten van de glucose fragmentpieken al weer behoorlijk zijn afgenomen. Dit laatste wordt geïllustreerd in figuur 17.

We zien dat de eliminatiecurven van de glucosefragmenten  $m/e$  163, en 145 parallel verlopen terwijl die van  $m/e$  181 bij hogere temperatuur zijn maximum vindt.

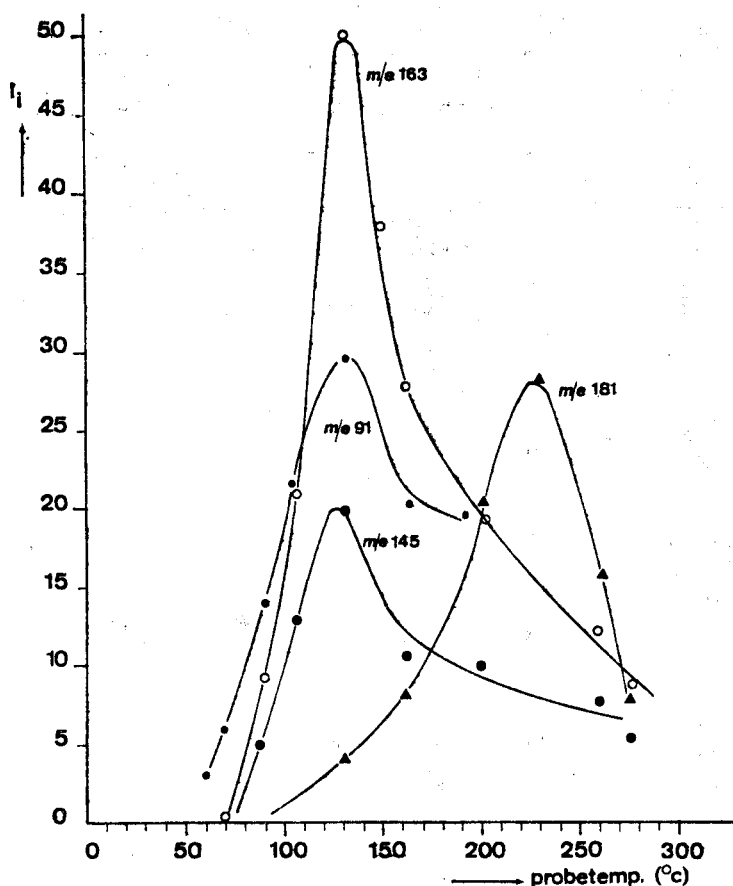


Fig. 17.

Overigens moet worden opgemerkt dat het werken met deze eliminatiecurven voorzichtigheid vereist. Het niet parallel verlopen van de curven kán tot de konklusie leiden dat we met verschillende componenten te maken hebben. Het is theoretisch nog mogelijk dat het spectrum van een bepaalde komponent onder invloed van de probetemperatuur zal veranderen. Daar kan in het onderhavige geval echter geen sprake van zijn omdat bij hogere probetemperatuur hoogstens méér fragmentatie zal optreden, zo dat het optreden van

een molekulaire ion dan nóg onwaarschijnlijker wordt.

Op het eerste gezicht lijkt ook de trimerisatie van ureum een mogelijke oorzaak van de piek op m/e 181. Hier geldt echter hetzelfde verhaal als bij het glucose: de temperatuur waarbij het maximum optreedt in de eliminatiecurve ligt veel hoger dan die voor ureum. Andere mogelijkheden voor de identiteit van deze piek zijn: hydroxyfenylpyrodruivenzuur (MW:180), theophylline (dimethylxanthine, MW:180), en inositol (MW:180). Van deze componenten konden we geen referentiespectra opnemen, behalve van theophylline. m/e 117. Wordt in meerdere of mindere mate aangetroffen in alle ultrafiltraatmonsters en is mogelijk het molekulaire ion van fumaarzuur (MW:116).

m/e 133. Deze piek die een intensiteit bereikt tot ca. 25 à 30% van de hoogste piek (m/e 103 of 114) kon nog niet aan een bepaalde component worden toegekend. Een aantal mogelijkheden zouden kunnen zijn: glutaarzuur, oxaloazijnzuur, methylbarnsteenzuur (alle MW:132). Voor structuren van de verschillende zuren zie bijlage 6.

Er werden nog een aantal pieken bij andere m/e-waarden waargenomen maar deze leken patientgebonden componenten te vertegenwoordigen. Opvallend was de afwezigheid van pieken die karakteristiek zijn voor hippuurzuur en urinezuur (resp. MW's 179 en 168).

Tot slot moet nog gewezen worden op een aantal pieken bij de volgende m/e-waarden: 119, 135, 165, 195, 205 en 257. Deze komen in lagere intensiteiten voor, en het is niet duidelijk (vooral voor 195, 205 en 257) of we hier te doen hebben met verontreinigingen.

Vergelijking van ultrafiltraatprofielen van patienten vóór en na dialyse en van gezonde personen.

Een vergelijking van de verschillende ultrafiltraatprofielen levert de volgende konklusies op:

1) Uremisch ultrafiltraat bevat pieken bij m/e 133 en m/e 181 die niet in ultrafiltraat van gezonde personen voorkomen. Hierbij moeten we het voorbehoud maken dat we geen grote serie monsters van zowel gezonden als uremische patienten hebben onderzocht.

Op deze wijze zou onderscheid gemaakt kunnen worden tussen uremisch en niet-uremisch ultrafiltraat. Het onderscheiden van postdialytisch ultrafiltraat en dat van gezonden levert wel problemen op omdat na dialyse de pieken bij 133 en 181 aanzienlijk zwakker zijn geworden. Dit wijst erop dat de betreffende componenten door de dialysebehandeling worden verwijderd.

2) In gezonden en uremische patienten na dialyse zijn de intensiteiten van de volgende pieken aanmerkelijk lager: m/e 91, 114, 121, en 153. (hoogstwaarschijnlijk: melkzuur, kreatinine, ureum, en een niet geïdentificeerde piek). De verschillen voor m/e 93 konden niet worden bekeken omdat in alle spectra een hoge 93-piek overheerste, veroorzaakt door het glycerol in de PM-30 membranen. In de spectra van de verschillende pools hebben we de 93-piek overal ongeveer 70% van de 91 piek gemaakt zodat bij het berekenen van de relatieve intensiteiten niet steeds m/e 93 als hoogste werd genomen door de Burroughs.

Bovenstaande overwegingen hebben meer een kwalitatief dan een kwantitatief karakter. Om kwantitatieve uitspraken te doen is het noodzakelijk gebruik te gaan maken van een interne standaard, omdat er aanzienlijke fluktuaties kunnen optreden in de intensiteiten van de verschillende ionen tengevolge van temperatuurschommelingen en variaties in de reaktiegasdruk.

Op de mogelijkheden van kwantitatieve metingen komen we nog terug.

#### II.2.6.2. Ammoniak als reaktiegas.

Omdat de samenstelling van het reaktiegasmengsel methaan-ammoniak bij de door ons geteste methode niet onder controle gehouden kon worden leverden spectra die op die manier werden opgenomen geen reproduceerbare profielen op. Er ontstonden mengspectra.

Om toch een indruk te krijgen van de profielen met ammoniak als reaktiegas namen we enkele spectra op met zuiver ammoniak. Het kan niet de bedoeling zijn routinematig zulke spectra op te nemen vanwege de al genoemde verontreiniging en aantasting van de pompolie.

De reaktiegasdruk kon niet hoger worden dan 0,04 torr. om een ons onbekende reden. Het is mogelijk dat de drukmeter

zich anders gaat gedragen in een ammoniak omgeving. Een andere mogelijkheid is dat de roestvrij stalen capillair tussen gasfles en massaspectrometer een beperkende faktor is.

Een analyse met het gebruikelijke temperatuurprogramma gaf bij 103°C en 194°C de volgende spectra. (figuur 18).

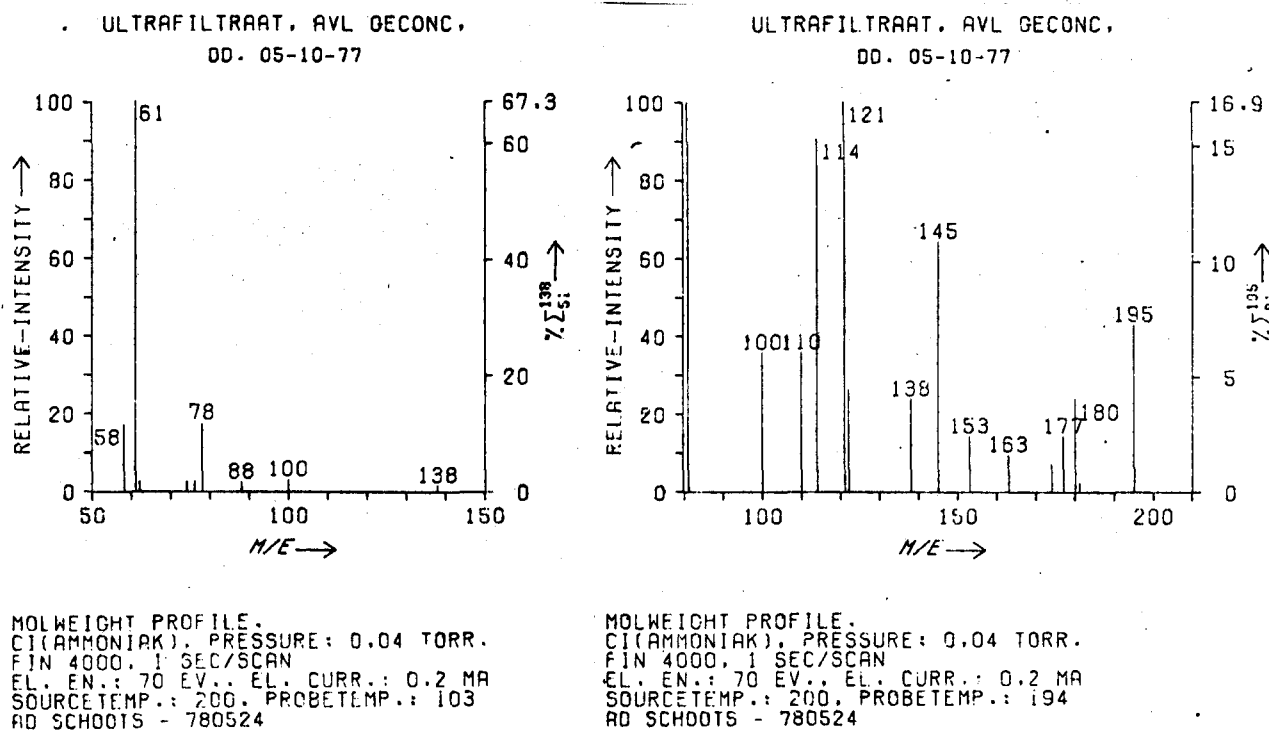


Fig.18.

Een aantal pieken kunnen met redelijke zekerheid worden toegekend; m/e 61 en m/e 78 zijn waarschijnlijk het molekulair ion en een additieion van ureum. m/e 114 vertegenwoordigt kreatinine, dat blijkbaar geen additie-ion vertoont. m/e 110 is hoogstwaarschijnlijk een additie-ion van glycerol (MW:92), dat géén molekulair ion heeft. m/e 153 is waarschijnlijk weer de onbekende component die we ook bij de isobutaan spectra tegenkwamen. m/e 180 is het ion dat ontstaat na waterafplitsing van het additie-ion van glucose,  $(180 + \text{NH}_4 - \text{H}_2\text{O})^+$ . We zullen verder niet op de details ingaan omdat geen enkel referentiespectrum voorhanden is. Het is wél duidelijk dat het maken van profileringen met dit gas in de toekomst mogelijkheden biedt.

## II.2.7. VERDERE MOGELIJKHEDEN VAN DE METHODE.

Kwantitatieve metingen met behulp van een interne standaard (lit.65,66) kunnen worden uitgevoerd door middel van verschillende scantechnieken.

Bij de " multiple ion detection " (MID) wordt niet het gehele massabereik gescand maar wordt de spanning op de quadrupole-staven zodanig door de computer gestuurd, dat alleen een aantal van tevoren ingestelde massawaarden worden afgetast.

Bij de " repetitive scanning "-methode wordt met korte tussenpozen het gehele massabereik gescand. Alle data worden in het (disc)-geheugen van de computer opgeslagen, waarna zogenaamde massa-chromatogrammen kunnen worden opgesteld door voor een bepaalde massawaarde de intensiteit tegen de tijd of het scannummer uit te zetten. De oppervlakte onder de pieken van deze chromatogrammen zijn een maat voor de hoeveelheid van de component waarvoor de gekozen massawaarde karakteristiek is. Dit terugzoeken en sorteren van een bepaalde massawaarde kan natuurlijk ook bij de MID-techniek worden toegepast. De oppervlakken onder de verschillende massa-chromatogrampieken kunnen vervolgens worden vergeleken met het oppervlak onder een piek die staat voor een vooraf toegevoegde interne standaard. Relatieve kwantitatieve gegevens kunnen ook worden verkregen voor onbekende pieken in het spectrum. Voor het meten van absolute hoeveelheden is het nodig de identiteit te weten van de betreffende component. Met behulp van bekende hoeveelheden component en standaard kan een calibratiecurve worden opgesteld.

Vooral bij het werken met lage concentraties van de te meten component heeft de MID-techniek de voorkeur vanwege een grotere gevoeligheid (er worden meer ionen geteld per m/e-waarde).(lit.65). Dit soort metingen kunnen pas worden gedaan als de benodigde computer-software voorhanden is.

Een andere mogelijkheid die in de toekomst beproefd zou kunnen worden is het opnemen van spectra van negatieve ionen (lit.67,68). Binnenkort zal de Finnigan 4000 MS worden aangepast zodat het mogelijk wordt beurtelings positieve en negatieve ionen te scheiden en te detekteren (PPNICI = pulsed positive negative ion CI) (lit.69,70).

### II.3. Indirekte koppeling van isotachoforese en massaspectrometrie toegepast op uremisch ultrafiltraat.

#### II.3.1. ISOTACHOFORESE.

De isotachoforese is een vrij nieuwe elektroforetische scheidingstechniek, alhoewel er de laatste jaren een groeiende stroom van publikaties is waar te nemen.

Wanneer we de elektroforetische scheidingstechnieken indelen naar de aard van het elektrolietsysteem, kunnen we vier hoofdgroepen onderscheiden:

- zone-elektroforese
- moving-boundary elektroforese
- isotachoforese
- isoelectric focussing. ( lit. 72,73,74).

In tegenstelling tot de andere genoemde technieken is de isotachoforese een verdringingstechniek, en dus bijvoorbeeld geen elutietechniek als de zone-elektroforese, of een frontale analysestechniek zoals de moving-boundary elektroforese.

Dit betekent dat de monstercomponenten worden voorafgegaan en gevolgd door elektrolieten met respectievelijk een hogere en een lagere effectieve mobiliteit ( loopelektroliet, en terminerend elektroliet).

De voorste grens van de eerste monsterzone migreert met een snelheid die alleen wordt bepaald door de concentratie en de mobiliteit van het loopelektroliet en de elektrische stroomdichtheid.

De effectieve mobiliteit ( $m_e$ ) wordt bepaald door de volgende factoren: de dissociatiegraad ( $\alpha$ ), de activiteitscoëfficiënt ( $\gamma$ ), en een vertragingscoëfficiënt (lit.71), en natuurlijk de absolute mobiliteit, die weer een gecompliceerde functie is van de viscositeit ( $\eta$ ), de diëlektrische konstante van het oplosmiddel ( $\epsilon$ ), de lading, en de grootte en de vorm van het betreffende ion.

Bovendien is de absolute mobiliteit een functie van de temperatuur via de temperatuurafhankelijkheid van voornoemde factoren.

De scheiding vindt plaats door verschillen in de effectieve mobi-

liteiten van de diverse componenten. Nadat de scheiding voltooid is zullen zowel monsterzone als terminator met dezelfde snelheid door het capillair bewegen ( dit is in te zien met behulp van elektroneutraliteitsoverwegingen).

Gaande van loopelektroliet naar terminator zullen een aantal grootheden zich als volgt gedragen:

- De effectieve mobiliteit neemt af.
- de elektrische veldsterkte neemt toe.
- de elektrische weerstand neemt toe, de specifieke geleidbaarheid neemt af, de temperatuur neemt t.g.v. energiedissipatie toe.
- de pH neemt toe bij anionscheidingen, en af bij kationscheidingen.
- de concentratie neemt af.

De concentratie van de componenten in de monsterzones is onafhankelijk van de geïnjecteerde monsterhoeveelheid. Ze hangt echter wel af van de concentratie van het loopelektroliet, en van de effectieve mobiliteiten ( dit wordt beschreven door de zogenaamde Kohlrausch-vergelijking, lit.73).

### II.3.2. PROFILERING MET BEHULP VAN ISOTACHOFORSE.

De isotachoforese is in een studie van Mikkers (lit. 38) een zeer geschikte techniek gebleken voor de anionische profilering van ultrafiltraat en serum van uremische patienten en gezonde personen. Deze methode kan informatie verschaffen over zowel laag- als hoogmoleculaire stoffen in een en dezelfde analyse; de methode is snel en relatief goedkoop.

Bij de analyses werd gebruik gemaakt van onderstaand elektroliet-systeem:

	loopelektroliet	terminator
Anion	chloride	HEPES <sup>x</sup>
Koncentratie	0,01 N	0,01 N
Tegenion	Histidine	TRIS <sup>xx</sup>
pH	6,02	8,5
toegevoegd	0,1% HEC <sup>xxx</sup>	--
oplosmiddel	water	water

<sup>x</sup>Hepes = N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethaansulfonzuur.

<sup>xx</sup>Tris = trishydroxyethylaminomethaan.

<sup>xxx</sup>Hec = hydroxyethylcellulose.



De scheidingen werden uitgevoerd in capillairen met een binnendiameter van 0,2 mm.

Verschillen tussen uremisch serum vóór en na dialyse waren duidelijk waarneembaar ( bijlage 7, uit lit.75).

Uit de figuur is ook duidelijk af te leiden dat de aanwezigheid van hoogmoleculaire stoffen de scheiding van laagmoleculaire componenten niet beïnvloed ( vergelijk de isotachoferogrammen van ultrafiltraat en serum vóór dialyse).

Van enkele componenten in het laagmoleculaire gebied was de identiteit al bekend, zoals sulfaat, acetaat, fosfaat, lactaat, hippuraat en uraat.

We zullen nu een poging beschrijven om een indirecte koppeling van isotachoforese en massaspectrometrie te bewerkstelligen. De bedoeling daarvan was verschillende zones, of gebiedjes met verschillende zones te isoleren en vervolgens te onderwerpen aan MS-analyse.

Door de componenten in het ultrafiltraat "in te klemmen" tussen twee kleurstoffen, kon de voortgang van de monsterzone door het capillair worden gevolgd. Na voldoende scheiding werd het gebied tussen de kleurstoffen geïsoleerd en in stukjes verdeeld. Deze stukjes ( coupes) werden met behulp van de DIP (direct insertion probe) in de massaspectrometer gebracht en geanalyseerd.

### II.3.3. OPERATIONELE PARAMETERS.

#### II.3.3.1. keuze van het elektrolietsysteem.

Aanvankelijk werd het door Mikkers beschreven elektrolietsysteem toegepast. In plaats van HEC werd eerst MOWIOL toegevoegd.

In figuur 18 zijn isotachoferogrammen gegeven van een leading-terminator-, een standaardanionen-, en een ultrafiltraatanalyse op dit systeem. Het bovenste spoor vertegenwoordigt het UV-sigitaal, het onderste het conductiviteitssigitaal. De konstante stroomsterkte was 20  $\mu$ A, de papiersnelheid 5 cm/min., en de spanning liep op tot 15 kV. De onzuiverheid van de terminator HEPES was een niet te vermijden gegeven. ( aanwending van HEPES-Na-zout, pH 9,3, in plaats van het zuur bracht enige verbetering).

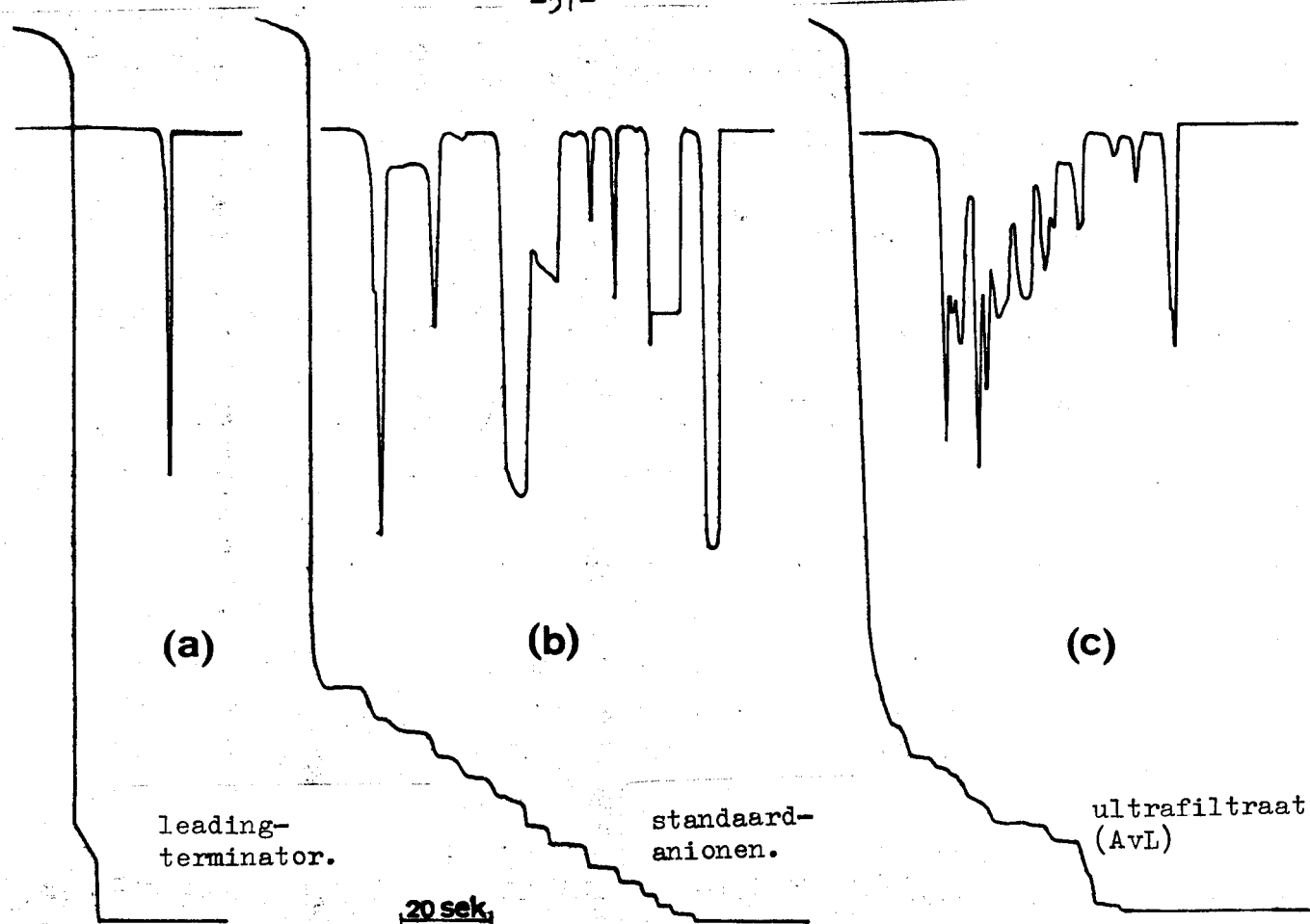


Fig. 18.

Bij MS-analyses bleek dat het tegenion histidine (MW:155) een sterk storende invloed had op de spectra. (CI met isobutaan). Intense pieken verschenen bij  $m/e$  156,  $m/e$  110, en  $m/e$  112. Bovendien zagen we nog minder intense pieken bij:  $m/e$  212, 198, 194, 170, 152, 150, 141, 139, 138, 137, 97, en 95.

Het spectrum van zuiver HEPES vertoonde pieken bij:  $m/e$  113 (base-peak), 99, 109, 127, 129, 131, 151, 155, 159, 169, 173, 187, en 223.

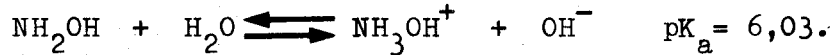
In tegenstelling tot die van histidine zijn de pieken tengevolge van HEPES niet storend, omdat deze stof niet kan voorkomen in de monsterzones. Het is zelfs gunstig dat deze pieken (vooral  $m/e$  113) verschijnen omdat ze dan een indicatie geven van de aanwezigheid van HEPES, en daardoor aangeven dat de coupe genomen is in of op de grens van het terminatorgebied.

Voor de vervanging van histidine moeten we een tegenion vinden dat een  $pK_a$ -waarde heeft in de buurt van dat van histidine ( $pK_a=6,02$ ), en bovendien een zodanig laag molekulgewicht heeft dat we er

in de MS-analyses geen last van ondervinden.

Hydroxylamine heeft een molekuulgewicht van 34, en een  $pK_a$  van 6,03.

Het voldoet dus zeer goed aan de voorwaarden. In oplossing stelt zich het volgende evenwicht in:



Het  $\text{NH}_3\text{OH}^+$ -ion wordt nu dus ons tegenion.

Om verder eventuele storende factoren te minimaliseren werd geen HEC of MOWIOL aan het loopelektroliet toegevoegd. In bijlage 8 geven we een isotachoferogram van een standaard anionenmengsel op het systeem  $\text{Cl}^-(0,01\text{M})-\text{NH}_2\text{OH}(0,02)/\text{MES-TRIS}(\text{pH } 7)$ .

We kunnen hierin, vooral aan het UV-signaal, zien dat de scheiding niet bepaald optimaal is. Dit moet hoofdzakelijk aan het ontbreken van een oppervlakte actieve stof worden geweten.

Omdat het hydroxylamine alleen in de hydrochloride-vorm voorhanden is, moest op de volgende wijze een oplossing van de gewenste molariteit worden gemaakt:

- bereiden van 500 ml 0,02 M  $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$  oplossing.
- verdelen in twee gelijke delen, waarvan één deel ( 250 ml) werd behandeld met een sterk basische ionenwisselaar ( IonenaustauscherIII, Merck, 4 mval./gr.).
- Nadat op deze wijze de  $\text{Cl}^-$ -ionen waren verwijderd, werden de beide delen weer bij elkaar gevoegd. Nu resulteert een oplossing van 0,02M  $\text{NH}_2\text{OH}$  en 0,01M HCl.

Ons definitieve elektrolietsysteem is nu dus:

	loopelektroliet	terminator
Anion	chloride	HEPES
koncentratie	0,01M (later 0,025M)	0,025M
tegenion	$\text{NH}_3\text{OH}^+$ (0,02 en 0,05M)	$\text{Na}^+$
pH	6,03	9,3
toegevoegd	--	--
oplosmiddel	water	water

II.3.3.2. Het testen van kleurstoffen.

Een aantal kleurstoffen werden op hun effectieve mobiliteit getest:

AMARANTH was voldoende "snel" om als voorste "marker" te kunnen dienen. BRILLIANT BLUE was niet traag genoeg om als laatste marker te dienen. SUN YELLOW had wel de goede mobiliteit maar migreert niet als een mooie kompakte plug.

CRYSTAL VIOLET migreert als positief ion!

QUINOLINEGEEL is niet traag genoeg.

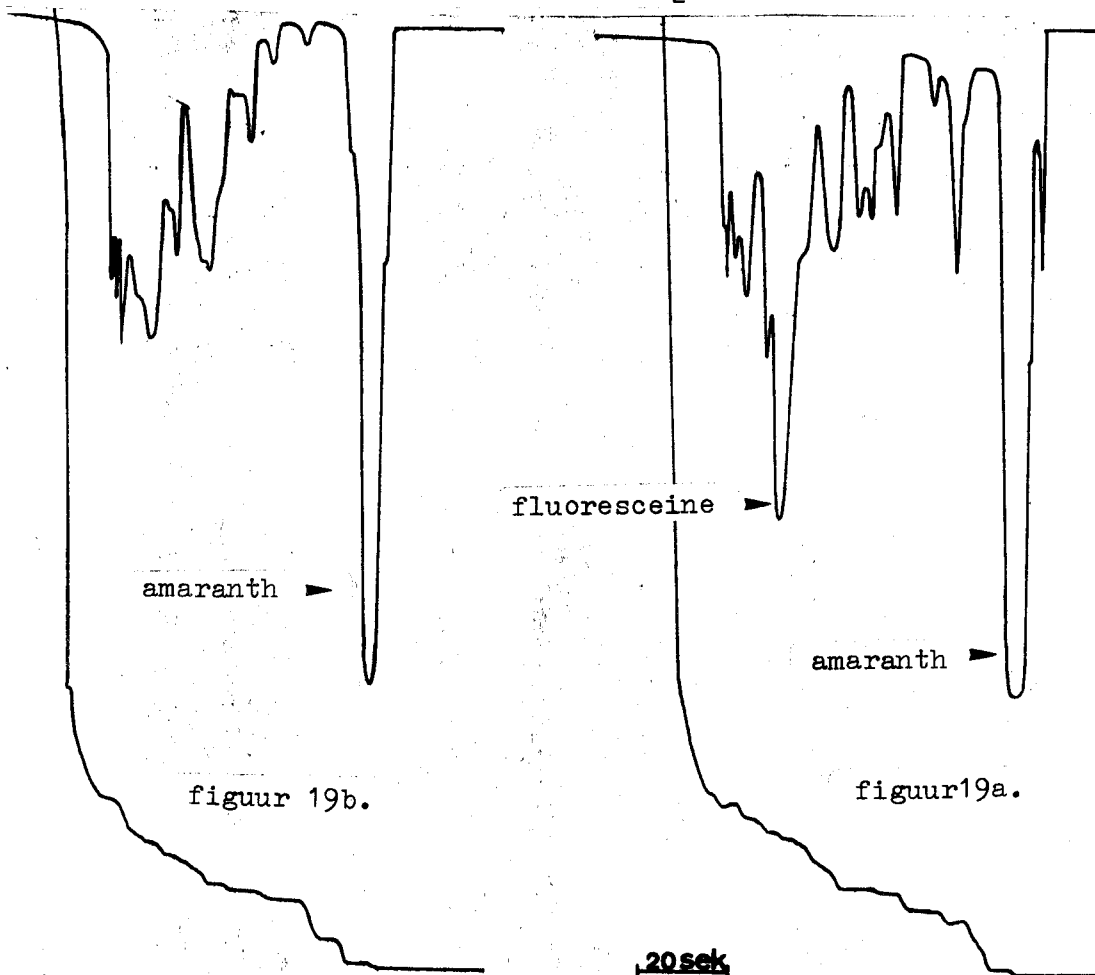
GUINEA GROEN is niet traag genoeg.

FLUORESCEÏNE voldoet redelijk, maar is eigenlijk iets te snel om het gehele ultrafiltraat-gebied af te grenzen.

Amaranth en fluoresceïne werden dus als markers gekozen.

Op het systeem HCl/Histidine/Hepes migreren de kleurstoffen ten opzichte van de ultrafiltraatcomponenten zoals in figuur 19a.

Hetzelfde monster op het systeem HCl/NH<sub>2</sub>OH/Hepes, zie figuur 19b.



### II.3.4. APPARATUUR EN METHODE.

De gebruikte isotachoforese-apparatuur werd opgebouwd uit door Verheggen ontworpen en vervaardigde onderdelen. Om de isolatie van monstergebiedjes te vergemakkelijken werd het scheidingscapillair horizontaal opgesteld. Een schematische opstelling is weergegeven in figuur 20.

Verklaring der cijfers:

1. Brandenburg (konstante) stroombron.
2. Terminatorcompartment met spanningdragende elektrode.
3. Kraan.
4. Injektiecompartment.
5. Kraan voor doorspoelen van het capillair.
6. Scheidingscapillair.
8. Anoderuimte.
9. Elektrodeblok.
11. Kraan voor toevoeren van loopelektrolyet.
12. Grensvlak tussen loopelektrolyet en terminator.

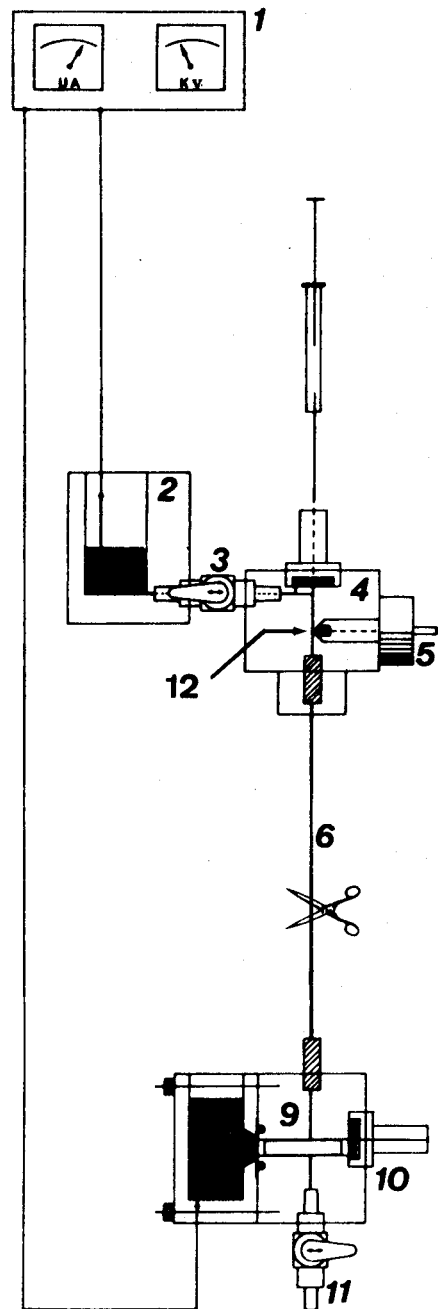


Fig. 20.

De binnendiameter van het scheidingscapillair bedroeg 0,45 mm. Afhankelijk van de geïnjecteerde hoeveelheid monster werd de stroom gestabiliseerd op 50 - 75  $\mu$ A.

Hoeveelheden van 3 - 10  $\mu$ l ultrafiltraat werden geïnjecteerd, samen met 0,2  $\mu$ l amaranth en 0,5  $\mu$ l fluoresceïne.

Na voldoende scheiding ( ca. 75 - 100 min.) werd de volgende werkwijze gevolgd:

1. uitschakelen van de stroom.
2. afsluiten van het terminatorvatje met kraan 3.
3. gelijktijdig afklemmen van het capillair ter plaatse van het amaranth en het fluoresceïne met twee fijne tangetjes. Aangezien dit kon gebeuren zonder de kleurstofzones al te veel te verstoren kunnen we aannemen dat de andere zones redelijk intact blijven.
4. doorsnijden van het capillair voorbij de afgeklemde plaatsen. omdat het capillair bij afklemmen zodanig deformeert dat afsluiting gehandhaafd blijft wanneer de tangetjes worden weggenomen kon het capillair worden doorgesneden zonder dat stroming optrad.
5. door afklemming kon het monstergebied verder worden verdeeld.
6. de inhoud van de verkregen stukjes capillair werd met behulp van een injectiespuit, waarop een dun siliconenrubber slangetje was bevestigd, in de MS-probebuisjes gebracht.
7. vervolgens konden de monsters massaspectrometrisch worden onderzocht. De MS-kondities waren: isobutaan als reaktiegas, 0,17 torr., 41 eV, brontemperatuur 200°C.

Aanvankelijk was het de bedoeling de monsterzones te fixeren met vloeibare stikstof. Het bleek echter dat de bevriezing bijna momentaan werd opgeheven als het capillair uit de stikstof gehaald werd, zodat deze methode werd verlaten.

### II.3.5. EXPERIMENTEN.

Van drie verschillende patienten ( De Bl., gent, AvL., ehv, BW,gent) werden ultrafiltraatmonsters op bovenstaande wijze geanalyseerd. Tabel 5 geeft de kondities en resultaten van de verschillende experimenten. Figuur 21 geeft de lokatie van de verschillende coupes

aan ten opzichte van de kleurstofzones.

<u>exp.nr.</u>	<u>ultrafiltr.</u>	<u>injektie</u>	<u>el. syst.</u>	<u>stroom</u>	<u>coupe</u>	<u>m/e-waarden</u>
1	De Bl.190777	3 $\mu$ l	0,01M HCl 0,02M NH <sub>2</sub> OH 0,025M Hepes	50 $\mu$ A	A	91
					BCD	91, 105, 130, 117
2	" "	"			0,025M HCl 0,05M NH <sub>2</sub> OH 0,025M Hepes	"
3	AvL. 071077	10 $\mu$ l	0,025M HCl 0,05M NH <sub>2</sub> OH 0,025M Hepes	75 $\mu$ A	B	174
					C	91, 105
					D	130, 133, 180
4	" "	"	" "	"	B 174, 91 C 91, 105 D 105, 133, 180	
5	BW. (?)	5 $\mu$ l	" "	"	B 91, 126 C 91, 105, 133, 180 103, 149 D 130	
6	AvL. 071077 ( capillair i.d. 0,45-0,20-0,45 mm)	7 $\mu$ l	" "	"	B1 91 D1 133, 180	

Tabel 5.

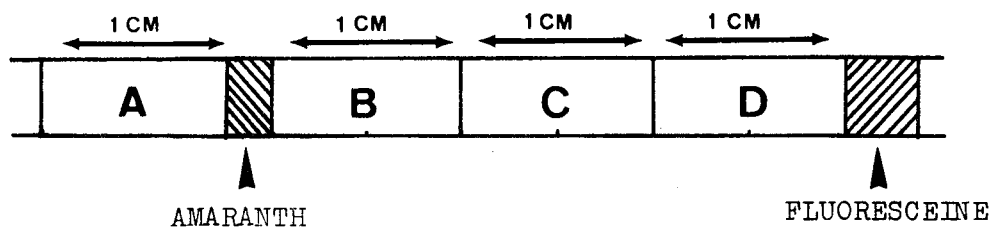


Fig. 21.

De m/e-waarden die bij alle patienten voorkwamen waren m/e 91, 105, 130, 133 en 180. Met name m/e 91 en 105 lijken afkomstig te zijn

van componenten die gelijk met of vlak na amaranth migreren. Het is erg waarschijnlijk dat we hier te doen hebben met lactaat en  $\beta$ -hydroxybutyraat ( MW's resp. 90 en 104). Het is bekend dat deze componenten hier ergens migreren.

Van de andere pieken kan alleen m/e 180 met vrij grote zekerheid worden toegekend aan hippuurzuur.

Het feit dat de component met m/e 133 die we in de CI-direct-MS analyses ook al waren tegengekomen, blijkbaar migreert doet ons vermoeden dat het toch om een zuur gaat.

Omdat bij de experimenten bleek dat verschillende m/e-waarden niet steeds op dezelfde plaats in het capillair gelokaliseerd waren (zie tabel 5) deden we een aanzet om nauwkeuriger en meer gedifferentieerd coupes te kunnen nemen. Daartoe werd het capillair met uniforme dikte vervangen door een capillair bestaande uit drie segmenten met verschillende interne diameters (figuur 22).

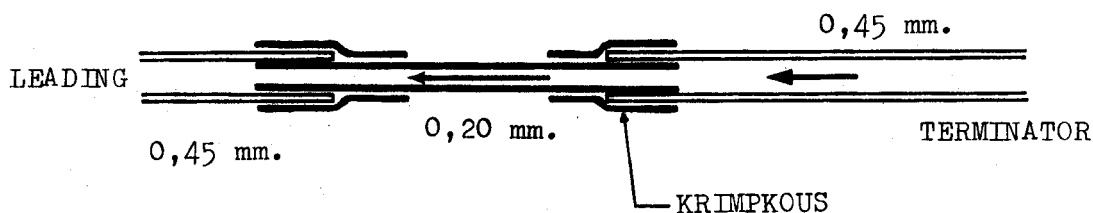


Fig. 22.

De scheiding vindt dan plaats in het gedeelte met 0,45 mm i.d., waarna de monsterzones worden verlengd als ze het smallere stuk (0,2mm) binnenmigreren. Aan de kant van de leading-toevoer moet het capillair weer breed zijn omdat het bevestigingspunt daar op is gedimensioneerd.

Bij experiment 2 was overgegaan op een meer gekoncentreerd loop-elektrolyet, om de injectie van grotere monsterhoeveelheden mogelijk te maken.

Gezien het feit dat in de isotachoforetische scheiding géén verdunning van het monster optreedt, zoals bij de chromatografische technieken, vielen de relatief lage intensiteiten van de MS-pieken wel wat tegen.

Bij een verdere ontwikkeling van de techniek lijkt het zinvol met duidelijk gedefinieerde ( zowel kwalitatief als kwantitatief) monsternengsels te gaan werken, om nauwkeurige lokatiebepalingen te



kunnen doen en de detekteerbaarheid in de CI-MS analyse te onderzoeken.

---

II.4. Gaschromatografie - Massaspectrometrie ( GC-MS) van  
uremisch ultrafiltraat.

II.4.1. INLEIDING.

In de toepassing van de GC-MS combinatie heeft zich de afgelopen tien jaar een stormachtige ontwikkeling voorgedaan. Terwijl voor vele soorten stoffen de GC dé scheidingstechniek bij uitstek is, kan de MS gezien worden als een van de belangrijkste identifikatie-technieken. Koppeling van beide technieken bood, en biedt nog steeds, vele mogelijkheden van toepassing (lit.76,77).

Het belangrijkste probleem bij de koppeling bestaat uit het verschil in werkdruk. De GC opereert gewoonlijk bij drukken van meer dan 760 torr. ( 1 atm.) terwijl de MS-ionenbron werkt bij een druk van  $10^{-1}$  tot  $10^{-5}$  torr. afhankelijk van de ionisatiemethode.

Een aspekt dat de koppeling wel weer extra aantrekkelijk maakt is het feit dat vergelijkbare hoeveelheden worden geanalyseerd met beide technieken. Wanneer we voor een aantal parameters de koppeling v.d. GC met verschillende spectroscopische technieken vergelijken , komen we tot de volgende veelzeggende tabel.

Parameter	UV	IR	PMR	MS
gasfase?	-	-	-	+
vergelijkbare gevoeligheid?	afh. van monster	-	-	+
juiste scantijd	-	+ <sup>x</sup>	+ <sup>x</sup>	+
kontinue flow?	-	-	-	+ <sup>xx</sup>
vergelijkbare temperatuur?	-	-	-	+
atmosf. druk?	+	+	+	-

Tabel 6.

<sup>x</sup> alleen bij Fourier-transformatie  
IR en -NMR.

<sup>xx</sup> niet bij veld-desorptie-ionisatie.

(uit: college spektrometrie II, voorj.'78,  
P.A. Leclercq)

Voordat een koppeling tot stand kan komen moet aan een aantal eisen worden voldaan:

-Het draaggas moet een laag molekuulgewicht hebben, zodat geen interferentie in het spectrum optreedt, en omdat een grote diffusiecoëfficiënt gewenst is.

- Het draaggas moet een hoge ionisatiepotentialiteit hebben zodat de meestal organische monstermolekulen worden geïoniseerd en het draaggas zelf niet. (  $IP_{org. stoffen} = 5-15$  eV. IP's van methaan waterstof, helium en neon resp.: 12,8 eV, 15, 24, 21 eV).

Helium is dus het meest geschikt.

- De GC-kolom moet een stabiele stationnaire fase hebben, dus weinig achtergrond geven.

We zullen nu in het kort enkele GC-MS koppelingen bespreken.

1. de Biemann-Watson separator. De kleinere draaggasmolekulen zullen in een leiding van gesinterd glas met zeer fijne poriën sneller wegdiffunderen dan de grote molekulen, en door een vakuumpomp worden weggepompt.

2. De Becker-Ryhage- of jet-separator. Het GC-effluent wordt in de vorm van een jet uit een glazen capillairuiteinde geblazen.

De monstermolekulen gaan "recht door" eenzelfde glazen capillair in naar de ionenbron van de MS. De kleine draaggasmolekulen zullen door hun hoge diffusiecoëfficiënt snel in zijwaartse richting wegdiffunderen.

3. Het capillaire lek. Hierbij treedt een gedeelte van het GC-effluent via een glazen capillaire restrictie in de ionenbron. Deze koppeling kan alleen worden toegepast bij capillaire GC-kolommen.

4. De direkte koppeling via een glazen of Pt-Ir capillair (lit.78). Hierbij wordt het GC-effluent in zijn geheel in de massaspectrometer gebracht. Het is dan wel gewenst dat het apparaat is uitgerust met een differentieel pompsysteem, waardoor analysator en bron onafhankelijk van elkaar op vacuüm worden gehouden.

Een glazen capillair wordt vooral gebruikt wanneer monstercomponenten aan het Pt-Ir capillair worden geadsorbeerd, of katalytisch worden omgezet. Ook bij apparatuur met een hoge spanning op de ionenbron (magnetische sector instrumenten) moet een glazen capillair worden toegepast.

De monsteropbrengst en monsterverrijking van het GC-effluent wordt voor een aantal koppelingen gegeven in onderstaande tabel.

Koppeling	opbrengst(%)	verrijking
Biemann-Watson	2	10
Becker-Ryhage	10	50
capillair lek	20	1
direkte koppeling	100	1

Tabel 7.

(uit: college spektrometrie II, voorj. '78 P.A. Leclercq).

De GC-MS techniek is in de loop der jaren steeds meer aangewend voor zowel kwalitatieve als kwantitatieve analyses. Vooral ook op het gebied van de biomedische en klinische routine- en researchanalyses is het een onmisbare techniek geworden (lit.79,80,81,82). De toepassing van de techniek op de analyse van lichaamsvloeistoffen van uremische patienten werd al besproken in hoofdstuk II.1. .

#### II.4.2. GASCHROMATOGRAPHIE.

##### II.4.2.1. Monstervoorbewerking en derivatisering.

Om de ter beschikking staande ultrafiltraatmonsters ( zie II.2.5.) geschikt te maken voor GC-analyse moesten de aanwezige componenten worden gederivatiseerd. Daarbij werden OH-, COOH-, en NH<sub>2</sub>-groepen worden omgezet in hun trimethylsilylethers en -esters.

De derivatiseringsreactie met BSA ( bistrimethylsilylacetamide) of BSTFA (bistrimethylsilyltrifluoroacetamide) vereist echter een watervrij milieu. Daarom werden de ultrafiltraatmonsters drooggeblazen onder een stikstofstroom, bij 60°C in een zandbad.

Een, weliswaar tijdrovend, alternatief is de monsters te onderwerpen aan een vriesdroogprocedure. Hierbij worden de monsters tot ca. -15 à -20°C ingevroren en het aanwezige ijs sublimeert dan bij een omgevingsdruk van 0,1 torr. . Een dergelijk vriesdroogapparaat werd gebouwd door Ripson (lit.83).

Een koperen plaat vormde het warmteoverdragend oppervlak tussen monsterflesjes en circulerend koelmedium. Omdat bleek dat het

warmteoverdragend oppervlak niet voldoende was, werd het apparaat in samenwerking met Huub Leuken gemodificeerd. In de koperen plaat werden busjes gelast zodanig dat deze aan de onderzijde door het koelmedium omstroomd worden (zie bijlage 9). Ondanks de verbetering werd voorlopig toch van de procedure afgezien om tweeërlei redenen. Ten eerste is de procedure zeer tijdrovend (ca. 24 uur per keer) en op de tweede plaats bleek zich steeds een ophoping van lucht in het koelblok voor te doen, waardoor de koelcapaciteit aanzienlijk daalde. Dat de op een of ander wijze aangevoerde lucht niet wordt afgevoerd is te wijten aan de te lage afvoeropening in het koelblok. Dat er überhaupt lucht in het blok komt moet hoogstwaarschijnlijk worden toegeschreven aan een té viskeus koelmedium (water:antivries = 50:50), waardoor belvorming plaatsvindt in het geroerde thermostaatvat. Aanvankelijk bleek ook een lek aanwezig tussen koperen plaat en perspex huis, maar nadat in plaats van Cyanolite-lijm Aralditelijm was toegepast bleek geen lek meer op te treden.

Het is gebleken dat de droogblaasprocedure toch wel tot enig verlies van vluchtige componenten aanleiding geeft. Zo bestaat de verdenking dat bijvoorbeeld de concentraties van melkzuur en  $\beta$ -hydroxyboterzuur hierdoor aanzienlijk gereduceerd worden.

Daarom lijkt het zeker zinnig de verschillende droogprocedures aan een vergelijkend onderzoek te onderwerpen. Het is dan wel gewenst dat het koelmedium wordt vervangen door bijvoorbeeld isopropylalcohol.

#### II.4.2.2. Silylering.

De trimethylsilylering (lit.84) leek de meest geschikte derivatiseringsmethode omdat het een tamelijk universele methode is - er worden  $-NH-$ ,  $-NH_2-$ ,  $-OH-$ ,  $-COOH-$ , en  $-SH-$ groepen omgezet - en omdat van trimethylsilyl-(TMS-)derivaten van biologische stoffen zeer veel referentiespectra beschikbaar zijn. Dit geldt in veel mindere mate voor gemethyleerde verbindingen, alhoewel de methylering op zich wel perspectieven biedt (lit.85).

Verschillende silyleringsreagentia waren op ons laboratorium voorhanden. Schutjes (lit.39) kwam tot de konklusie dat een reagensmengsel, sylon btz, het meest geschikt was. (sylon btz is een meng-

sel van BSA, TSIM (trimethylsilylimidazole) en TMCS (trimethylchloorsilaan) in een mengverhouding van 3 : 3 : 2).

Bij gebruik van dit reagens verschijnen er in het chromatogram echter twee grote reagenspieken. Alhoewel door Schutjes werd gekonstateerd dat deze pieken geen invloed hadden op de retentietijden van de ultrafiltraatcomponenten zijn aan het gebruik toch enkele nadelen verbonden.

- Om componentpieken te verkrijgen waarvan een redelijk massaspectrum kan worden opgenomen, moet een zodanige monsterhoeveelheid worden geïnjecteerd, dat voor een ernstige bronvervuiling moet worden gevreesd, tengevolge van de twee grote reagenspieken.

- Bovendien blijkt bij gebruik van BSTFA als reagens, dat een aantal componenten tevoorschijn komen die anders zouden worden gemaskeerd door de reagenspieken. In een vergelijkend onderzoek bleken de reagentia sylon bt ( BSA : TMCS = 5 : 1 ) en BSTFA ( met 1% TMCS ) veel minder storing in het chromatogram te geven dan het sylon btz ( zie bijlage 10 ). BSTFA is volgens de fabrikant ( Pierce, Rockford, Ill. USA ) een even sterk en universeel derivatiseringsreagens als sylon bt. Het heeft echter het voordeel dat de reactieproducten veel vluchtiger zijn dan die van BSA, waardoor ze hoofdzakelijk elueren in of vlak na de oplosmiddel-piek. Derivatisering van een ultrafiltraatmonster met sylon bt en BSTFA leverde de chromatogrammen in bijlage 11 en 12 op. De gemarkeerde pieken in het UF-BSTFA chromatogram zijn pieken die niet voorkomen in het UF-BSA chromatogram, of daarin veel lager zijn. De gemarkeerde piek in het UF-BSA chromatogram is afkomstig uit het sylon bt reagens. Verder konstateren we dat een vervanging van sylon bt door BSTFA geen negatieve invloed heeft op het aantal en de hoogte van de pieken. Daarom kiezen we BSTFA als derivatiseringsreagens in de GC-MS analyses.

Bij de derivatisering gingen we als volgt te werk:

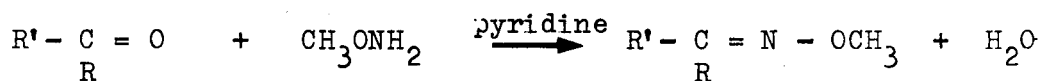
200  $\mu$ l. UF werd drooggeblazen onder stikstof in een zandbad van 60°C. Uit ampullen met 300  $\mu$ l. BSTFA werd 200  $\mu$ l. gepipetteerd met een Finn-pipet en aan het droge UF toegevoegd. De derivatisering vond daarna plaats in de oven bij 80°C gedurende 60 minuten. Na afkoelen werd het mengsel vijf maal verdund met n-hexaan.

De monsters werden bereid en bewaard in HP derivatiseringsflesjes, afgesloten met een teflon dopje.

#### II.4.2.3. Methoximering.

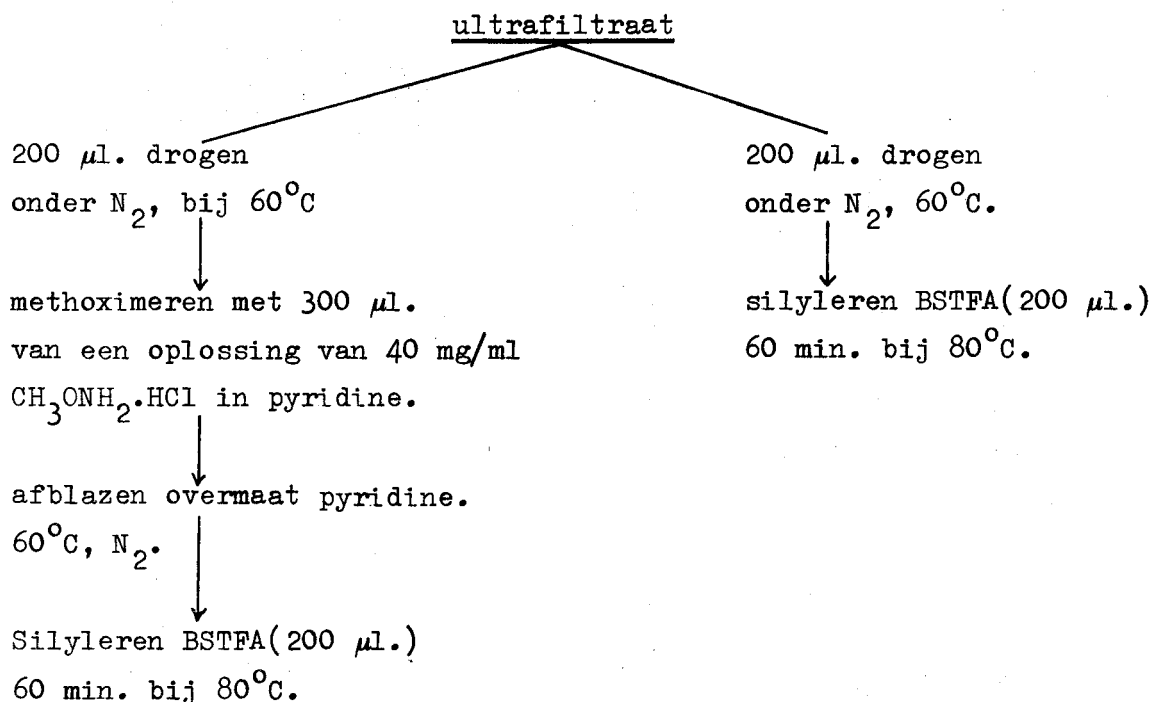
De aanwezigheid van ketogroepen in componenten van het UF kan aanleiding zijn voor slechte GC-eigenschappen. Een methode om die eigenschappen te verbeteren is de zogenaamde methoximering.

Men laat het watervrije monster gedurende enige tijd reageren met methoxylamine opgelost in droge pyridine. De volgende reactie treedt dan op:



Om de invloed van de methoximeringsstap te testen vergeleken we chromatogrammen van UF- (MO-TMS) en UF(TMS); gederivatiseerd ultrafiltraat en gemethoximeerd en gederivatiseerd ultrafiltraat.

Bij de bereiding van deze monsters volgden we het onderstaande schema.



De experimenten leidden ons tot de volgende konklusies.

In de chromatogrammen van de gemethoximeerde en vervolgens gesilyleerde monsters bleken een aantal pieken verdwenen te zijn die nog wel voorkwamen in niet-gemethoximeerde UF-monsters. Dit verschijnsel speelde zich met name af in het begin van het chromatogram. Dit suggereert het verlies van vluchtige componenten ten gevolge van de extra droogdampstap die is geïntroduceerd. Bovendien bleek de methoximering slecht reproduceerbaar, zodat we er verder van af zagen.

#### II.4.2.4. Solvent-extractie.

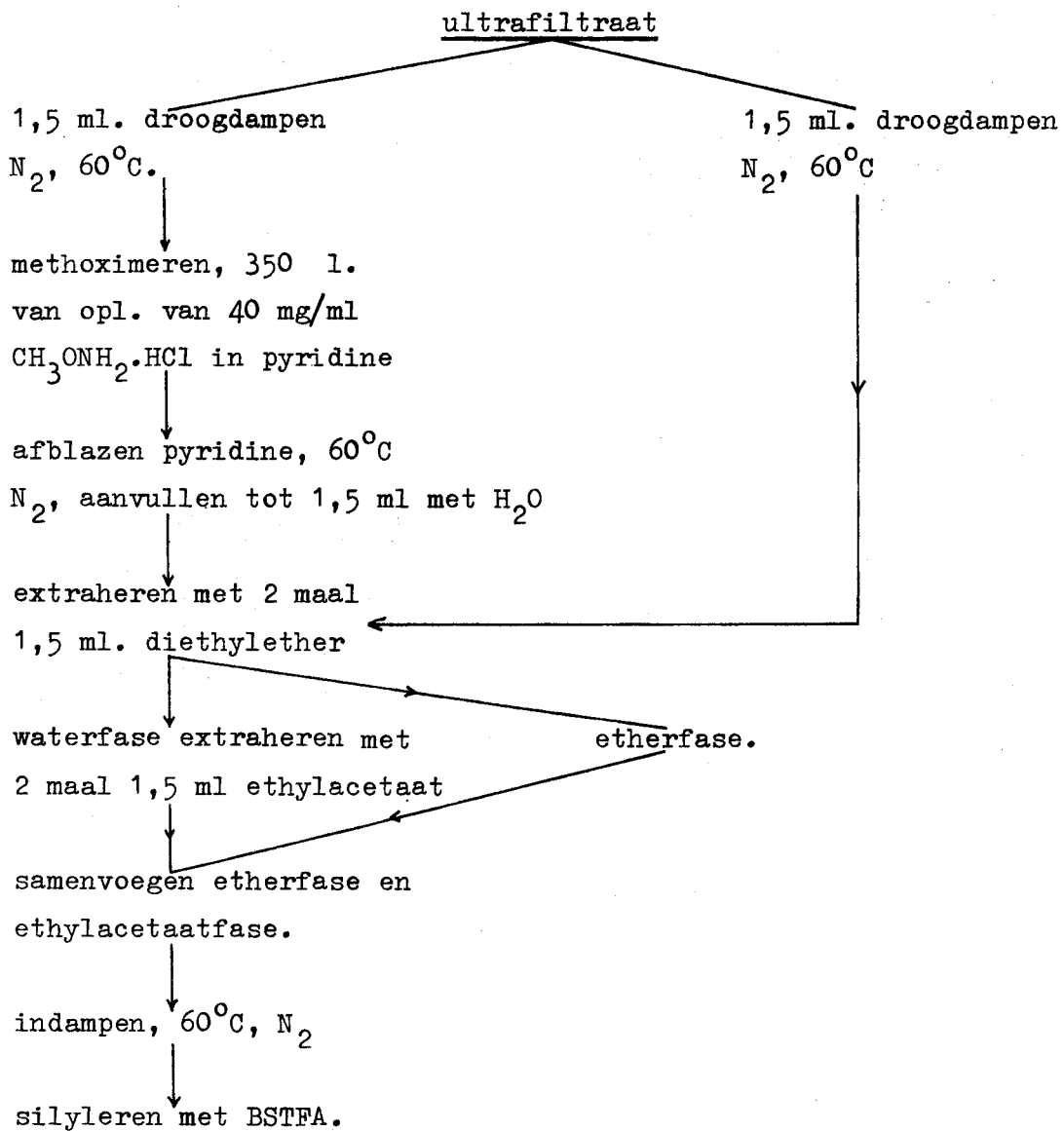
Bij identifikatie van componenten in het ultrafiltraat bleek ( zie II.4.5.1.) dat vooral neutrale stoffen aanwezig waren. Om vooral de eventueel aanwezige zure componenten te kunnen analyseren onderzochten we de mogelijkheid van selectieve extractie met behulp van oplosmiddelen.

In de literatuur zijn verschillende methoden voor de isolatie van zure componenten beschreven. Thompson en Markey (lit.86) vergeleken drie isolatiemethoden: de solvent-extractie met de hand, solvent-extractie met een vloeistof-vloeistofextractie apparaat ( continue extractie) en anion exchange chromatografie op een DEAE -Sephadex-kolom. Zonder hier verder op de details in te gaan bleek in dat onderzoek dat de extraktiemethoden veel minder efficiënt waren dan de anion exchange-methode. Bovendien gaf laatste methode een betere reproduceerbaarheid. Verder bleek dat in de solvent-extraktiemethoden ook neutrale componenten zoals ureum werden meegenomen. Deze methode was echter niet in staat om de voor ons belangrijke klasse van polyhydroxycuren te isoleren. Dit laatste konden we zelf konstateren aan de hand van de geïdentificeerde component erythronzuur.

Ondanks deze negatieve publiciteit over de solventmethoden gingen we toch na of deze methoden misschien voor ons doel geschikt konden zijn.

We volgden daarbij het op de volgende pagina gegeven werkvoorschrift.





Op deze wijze ontstonden TMS- en MO-TMS- ultrafiltraatextracten. De extracties werden uitgevoerd in scheitrechters met een inhoud van 25 ml.

De chromatogrammen leverden de volgende conclusies.

De extractie van ultrafiltraat bleek een slecht rendement te hebben. Veel pieken uit het normale UF-chromatogram verdwenen, en met name ook de door ons geïdentificeerde polyhydroxyzuren. Ook bleken neutrale componenten te worden meegeëxtraheerd, zoals ureum en alpha- en beta-glucose. Daarom moeten we concluderen dat de snelle solvent-extractiemethode niet bruikbaar is, zoals ons door de literatuur eigenlijk al voorspeld was.

In de toekomst zal voor de isolatie van de zure componenten de

meer bewerkelijke anion-exchange chromatografie op DEAE-Sephadex moeten worden gebruikt.

#### II.4.2.5. Het GC-temperatuurprogramma.

Om goede spectra van componenten in ultrafiltraat te verkrijgen is het noodzakelijk dat de GC-pieken goed gescheiden. Vooral in het tweede gedeelte van het chromatogram lagen de pieken soms erg dicht bij elkaar. We besloten een lagere eindtemperatuur voor het GC-temperatuurprogramma toe te passen, dan de waarde gemeld door Schutjes ( 220°C in plaats van 265°C).

Voor de GC-profilering was de waarde van 265°C echter wel geschikt omdat daarmee een eventuele routineanalyse wordt bekort, zonder dat kwalitatieve informatie verloren hoeft te gaan.

#### II.4.3. MASSASPECTROMETRIE.

Voor de identifikatie van monstercomponenten gebruikten we zowel de electron impact als de chemische ionisatie techniek. De beide ionisatietechnieken vullen elkaar goed aan. De EI-spectra leveren vooral karakteristieke fragmentionen, terwijl de CI-spectra vaak moleculaire ionen vertonen, waardoor molekuulgewichts-informatie ter beschikking komt. Op een aantal eigenschappen van EI-spectra van gesilyleerde stoffen komen we nog terug.

In het verleden zijn al van vele gesilyleerde stoffen EI-spectra opgenomen. Daarom bestaan er verschillende goede bibliotheken van referentiespectra. Een bibliotheek die voor ons met name van belang bleek te zijn is het referentiesysteem van Markey (lit.87). Bij de CI-experimenten werd isobutaan als reaktiegas gebruikt. Dit gas werd na de kolom en vóór de ionenbron bij het GC-effluent gemengd. Oorspronkelijk lag het in de bedoeling ook een oplossing van NO in He als reaktiegas te gebruiken. Dit gasmengsel bleek in een studie van Jelus, Munson en Fenselau (lit.88) bij uitstek geschikt voor de ionisatie van bepaalde gesilyleerde stoffen. Het NO (Eng.: nitric oxide) werd ook door andere auteurs als een succesvol reaktiegas beschreven (lit. 89, 90). De ionisatie met dit reaktiegas vindt niet plaats door overdracht van een proton, maar door de overdracht van een elektron van monstermolekuul

naar reaktiegasion ("charge exchange").

Problemen met het bereiden van dit soort gasmengsel zijn er de oorzaak van dat ze nog niet zijn toegepast (bijlage 3, gasmengsels).

#### II.4.4. METHODE EN APPARATUUR.

Hoeveelheden van 0,5  $\mu$ l. TMS-ultrafiltraat werd aangebracht op de punt van de naald in het "vallende naald" injectiesysteem. Nadat het oplosmiddel was verdampt werd het monster geïnjecteerd op een SE-30 kolom ( glazen capillair, 0,25 mm i.d., 37 m,  $p_i=1,1$  kg/cm<sup>2</sup>, T-programma: 8' 120°C/6°p.min./15' 220°C, Pt-Ir capillair GC-MS interface).

De MS kondities waren: el. en. 70eV, quad. offset 7,5 V, massabereik 70-550, multiplier 1590 V, gevoeligheid  $10^{-8}$  A/V, en de brontemperatuur 250°C (deze kondities gelden voor de EI-experimenten). Bij de CI-analyses was de el. energie 41 eV, en de brontemp. 200°C. Totale ionenstroomchromatogrammen (TIC) werden geschreven op een Yokogawa 3047 tweepens-recorder. We gebruikten weer de 9610 GC-4000 MS combinatie van Finnigan. Spectra werden opgenomen op UV-papier of met behulp van het nieuwe MS-COM interface en het FNKA acquisitieprogramma. MS-plots werden verkregen op de wijze zoals beschreven in II.2.4. .

#### II.4.5. RESULTATEN EN INTERPRETATIE.

In eerste instantie hebben we gepoogd zoveel mogelijk pieken in de gaschromatogrammen te identificeren. We zijn nog niet toegekomen aan een vergelijking van ultrafiltraat van gezonden en van uremische patienten vóór en na dialyse omdat de standaard-profileringsstechniek pas onlangs gereed was, zodat verschilgebieden nog niet zijn aan te geven.

In grote lijnen waren de geanalyseerde uremische ultrafiltraat monsters vergelijkbaar, en de door ons geïdentificeerde componenten werden dan ook in de meeste UF-monsters aangetroffen. In de figuren 23 en 24 zijn de chromatogrammen gegeven van TMS-UF van de patienten ArK en BW respectievelijk met EI- en CI-ionisatie.

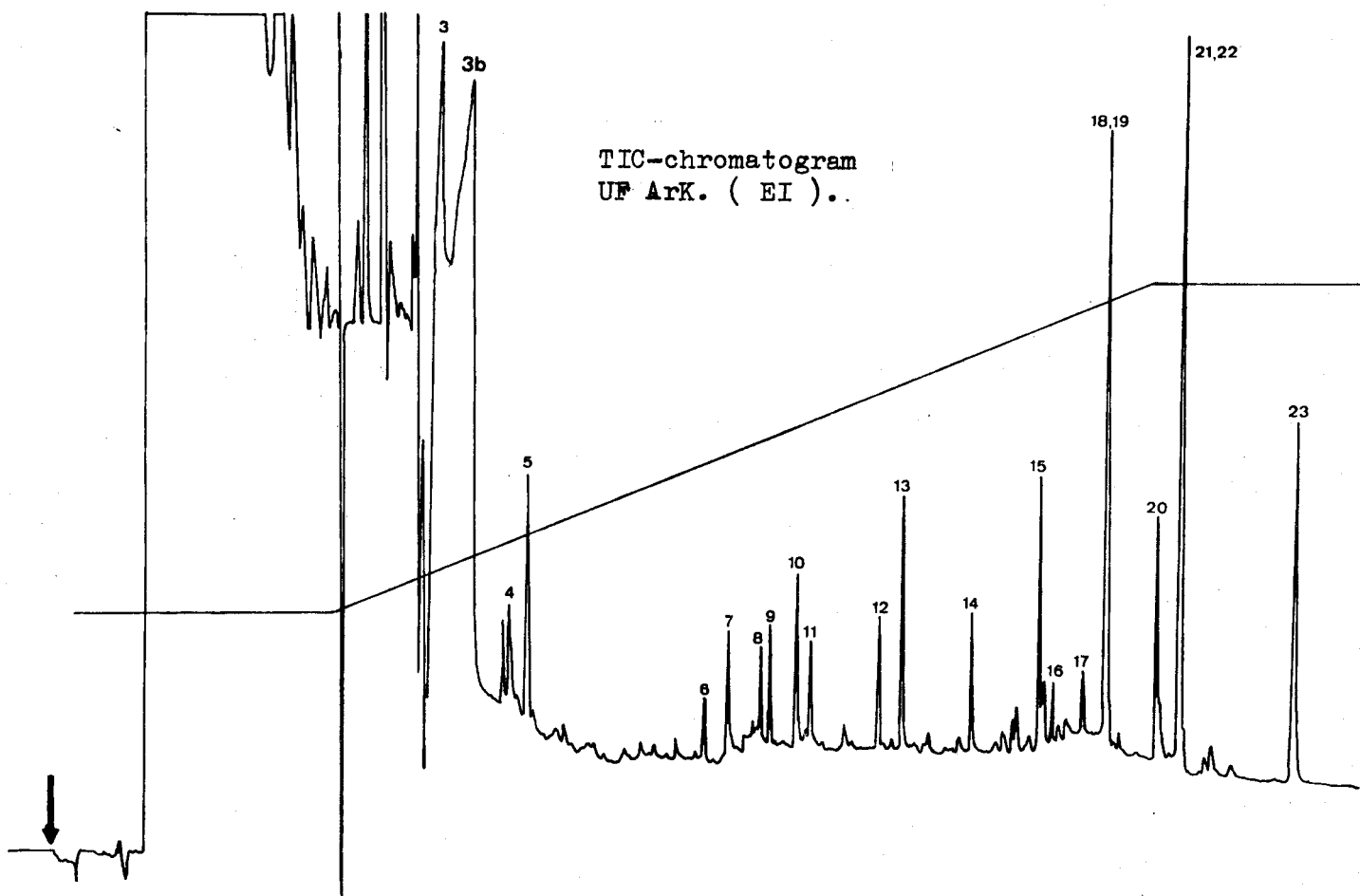


Fig. 23.

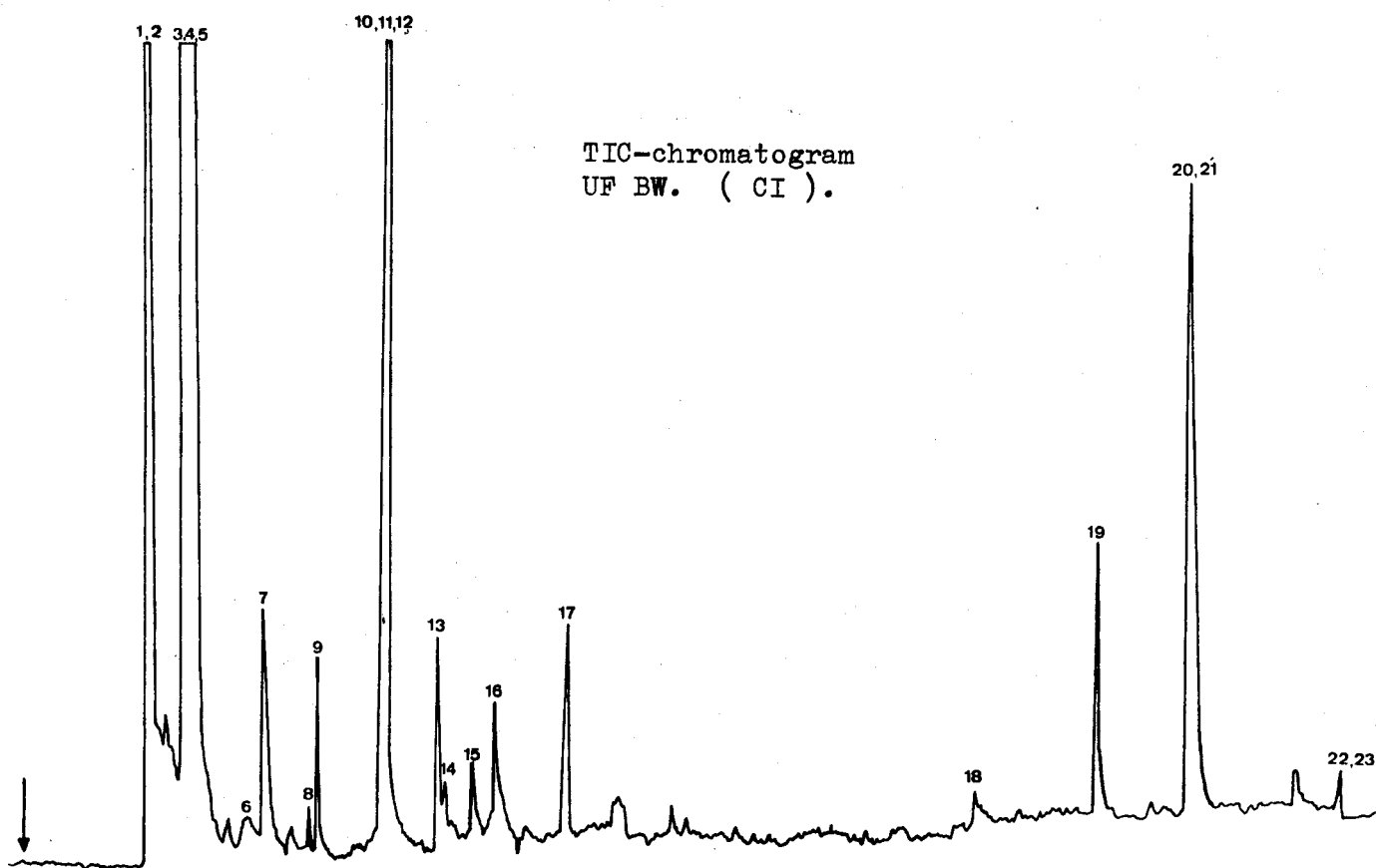


Fig. 24.

Tijdens de analyses bleek dat de CI-methode minder gevoelig was dan de EI-methode. Dat wil zeggen dat wanneer we beide methoden optimaliseren er bij de EI methode meer responsie was per hoeveelheid opgebrachte stof dan bij de CI methode. Voor een bespreking van het in de massaspectrometrie controversiële begrip "gevoeligheid" verwijzen we naar een artikel van Marshall, Petersen en Vouros (lit. 91). In de EI-methode bleek echter wel dat een groot gedeelte van de totale ionenstroom werd gedragen door "rearrangement"-ionen die weinig tot geen additionele structuurinformatie leveren wanneer we verschillende soorten suiker-derivaten met elkaar vergelijken. Met behulp van het referentiesysteem van Markey kwamen tot de identificatie van de volgende componenten in uremisch ultrafiltraat:

GC-piek, EI(CI)	komponent ( MW <sub>gederivat.</sub> , MW <sub>ongederivat.</sub> , opmerkingen)
3b ( 11, 12 )	UREUM-2TMS( 204, 60).
4a ( 13 )	FOSFORZUUR-3TMS ( 314, 98).
4b ( 14 )	GLYCEROL-3TMS ( 208, 92).
5 ( 15, 16 )	moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan het derivatiseringsreagens ( hier sylon bt).
6	ONBEKEND.
7	hoogstwaarschijnlijk APPELZUUR-3TMS (350, 134, Eng:malic) de CI-direkt piek bij m/e 135 zou hierdoor worden verklaard.
8 en 9	ERYTHRITOL-4TMS, en/of THREITOL-4TMS ( beide 410, 122).
10	ERYTHRONZUUR-4TMS ( 424, 136).
11	identiek aan 10.
12	waarschijnlijk WIJNSTEENZUUR-4TMS ( 438, 150, Eng.: tartaric acid, meestal van diëtaire oorsprong.
13	2-DEOXYERYTHROPENTONZUUR-4TMS ( 438, 150).
14	ARABINITOL-5TMS ( 512, 152).
15	mogelijk FRUCTOSE-5TMS ( 540, 180). Het spectrum is identiek aan een door ons opgenomen ref. spectrum, op de piek bij m/e 361 in het ref. spectrum na.
16	ONBEKEND.
17	ONBEKEND.

- 18 ( 19 )             $\alpha$ -D-GLUCOSE-5TMS ( 540, 180).  
 20                    GLUCITOL of MANNITOL-6TMS ( 614, 182), de referentie-  
                       spectra van de twee componenten zijn nagenoeg identiek.  
                       m/e 165 in CI-direkt, mogelijk  $(M+1-H_2O)^+$  hiervan.  
 21 ( 20 )             $\beta$ -D-GLUCOSE-5TMS ( 540, 180).  
 23                    MYO-INOSITOL-6TMS ( 612, 180).

Voor de spectra van de verschillende pieken zie bijlage 13.

Zoals reeds gezegd werden de meeste referentiespectra gevonden in het systeem van Markey. Een referentiespectrum van 2-deoxy-erythro-pentonzuur werd gevonden in een artikel van Petersson (lit.92). Informatie over de elutievolgorde en retentietijden van aldoses, alditolen en zuren uit de Krebs-cyclus werd betrokken uit artikelen van respektievelijk Störset (lit.93) en Horning (lit.94).

#### II.4.6. MASSASPECTROMETRIE VAN TRIMETHETHYLSILYLDERIVATEN.

We zullen de massaspectra van enkele klassen stoffen behandelen, waarvan gebleken is dat ze in uremisch ultrafiltraat voorkomen. Onderstaande tabel geeft de nomenclatuur voor suikers en hun derivaten.

NAMES OF ALDOSE DERIVATIVES			
Type of Compound	Type Name	Examples of Specific Names	
Monosaccharide $HOCH_2(CHOH)_nCHO$	Aldose	<i>Glucose</i>	<i>Mannose</i>
Monocarboxylic acid $HOCH_2(CHOH)_nCOOH$	Aldonic acid	<i>Gluconic acid</i>	<i>Mannonic acid</i>
Dicarboxylic acid $HOOC(CHOH)_nCOOH$	Aldaric acid	<i>Glucaric acid</i> ( <i>Saccharic acid</i> )	<i>Mannaric acid</i> ( <i>Mannosaccharic acid</i> )
Polyhydroxy alcohol $HOCH_2(CHOH)_nCH_2OH$	Alditol	<i>Glucitol</i> ( <i>Sorbitol</i> )	<i>Mannitol</i>
Aldehyde acid $HOOC(CHOH)_nCHO$	Uronic acid	<i>Glucuronic acid</i>	<i>Mannuronic acid</i>

( uit: "Organic Chemistry"  
Morrison &  
Boyd, 1975 )

Tabel 8.

1) Aldoses ( mono- en disaccharides), zoals glucose, fructose arabinose, ribose, mannose, lactose, sucrose enz..

De EI-spectra van de gesilyleerde aldoses vertonen zonder uitzondering de volgende 5 fragmentionen:

m/e 73	$\text{Me}_3\text{Si}^+$ (vaak de base-piek)	afkomstig van C-OH groep
m/e 147	$\text{Me}_3\text{Si-O}^+\text{SiMe}_2$	" " twee of meer C-OH groepen.
m/e 191	$(\text{Me}_3\text{SiO})_2\text{C}^+\text{H}$	" " C-1
m/e 204	$(\text{Me}_3\text{SiO-CH})^+$	" " C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> , C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub>
m/e 217	$\text{Me}_3\text{SiO-CH=CH-CH}^+\text{OSiMe}_3$	

We zullen hier niet op de gedetailleerde fragmentaties en rearrangements ingaan waar deze ionen het gevolg van zijn. Daarvoor verwijzen we naar een artikel van De Jongh (lit.95).

Een onderscheid tussen een pyranose- en een furanose-structuur ( resp. een zes- en een vijftring)

kan worden gemaakt op basis van de intensiteitsverhouding van m/e 204 en m/e 217.



Pyran



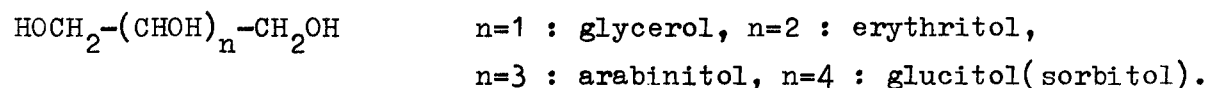
Furan

Pyranose	$I_{204} > I_{217}$	$I_{319} < 1\%$	géén m/e 332.
Furanose	$I_{204} < I_{217}$	$I_{319} = \pm 10\%$	wèl m/e 332.

Ook de intensiteit en aanwezigheid van m/e 319 en 332 zijn kenmerken op basis waarvan een onderscheid gemaakt kan worden.

Voorbeelden van pyranose structuren zijn glucose en galactose, terwijl fructose en ribose een furanosestructuur hebben.

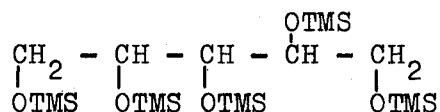
2) Alditolen, zoals glycerol, erythritol, arabinitol en mannitol.



Net als de saccharides vertonen de spectra géén moleculaire ionen.

Pieken bij M-15 worden alleen aangetroffen bij glycerol en ery-

thritol, en dan nog in zeer lage intensiteit. m/e 73 is steeds de base-pek. Ook het rearr. ion m/e 147 was hier weer vertegenwoordigt. Dit ion kan worden verwacht bij alle stoffen met twee of meer trimethylsiloxycgroepen. De meeste van de intense pieken zijn afkomstig van afsplitsing van de C-keten, of van verlies van trimethylsilanol door rearrangements. Als voorbeeld nemen we arabinitol-5TMS:



Afhankelijk van de ketenlengte zullen we dus ionen zien op m/e-waarden 205, 307, 409 enz. Alle alditolen hebben dus, onafhankelijk van de ketenlengte een pek op m/e 205. Tengevolge van rearrangements zien we weer de serie: 73, 147, 191 (inmindere mate), 204 en 217. m e 205 is wel steeds groter dan m/e 204! De trimethylsilanolafplitsing van de C-ketenafplitsingen geeft pieken bij m/e 217 ( 307-90), 319 ( 409-90), en 421 ( 511-90). Afsplitsingen van twee zulke groepen kunnen het optreden van een aantal pieken met lagere intensiteit verklaren.

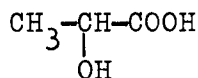
3) Aldonzuren ( polyhydroxycarbonzuren), en 2-, en 3-deoxyaldonzuren.

a) aldonzuren:  $\text{HO-CH}_2\text{-(CHOH)}_n\text{-COOH}$  n=0: glycolzuur, n=1: glycerinezuur, n=3 erythronzuur enz.

b) 2-deoxyaldonzuren  $\text{HO-CH}_2\text{-(CHOH)}_n\text{-CH}_2\text{-COOH}$  n=0 hydracrylzuur, en verder resp. 2-dexytronzuur, 2-deoxyerythropentonzuur enz.

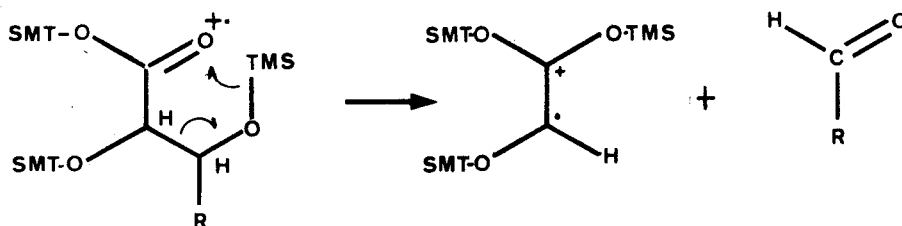
c) 3-deoxyaldonzuren  $\text{HO-CH}_2\text{-(CHOH)}_n\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-COOH}$

Melkzuur is ook een 3-deoxyaldonzuur maar was niet in de algemene structuur te vatten.





Kenmerkend voor de aldonzuren zijn vooral pieken bij m/e 205 en 292. Als n groter of gelijk twee is verschijnt er ook een piek op m/e 217. De combinatie van m/e 205, 217 komt weliswaar ook voor bij de alditolen maar daar vinden we geen piek bij m/e 292. De piek bij m/e 292 ontstaat door een "McLafferty-rearrangement" volgens onderstaand schema.



m/e 205 is weer afkomstig van ringsplitsing net als bij de alditolen. m/e 307 ondergaat een decompositie naar m/e 217 onder verlies van trimethylsilanol. De vrij intense m/e 292 onderscheidt de aldonzuren ook van de 2- en 3-deoxyaldonzuren. Er zijn wel enkele stoffen in de laatste klasse die een m/e 292 vertonen maar dan wel zéér zwak. De 2-deoxyaldonzuren geven zowel m/e 204 als 205 in ongeveer gelijke intensiteiten. Als n groter of gelijk 1 zien we ook een piek bij m/e 233, en bij 245 en 306 als n groter of gelijk 2 is. De 3-deoxyaldonzuren hebben ook vaak een piek bij m/e 219. Voor verdere details verwijzen we naar lit.72.

MS-fragmentatiepatronen van de in tabel 8 genoemde aldaarzuren worden beschreven in lit.96.

## II.5. Mogelijkheden van de koppeling vloeistofchromatografie-massaspectrometrie in het kader van het nieronderzoek.

De derivatisering van het ultrafiltraat voorafgaande aan een gaschromatografische scheiding heeft enerzijds verlies van vluchtige componenten, en anderzijds een moeizame massaspectrometrische identifikatie tot gevolg. Dit laatste vooral omdat door lokaliseren van de lading op Si het fragmentatiepatroon weinig structuurinformatie verschaft ( zie II.4.5.).

Bij toepassing van de vloeistofchromatografie spelen deze factoren geen rol. De vloeistofchromatografie (LC) kan bovendien een prima aanvulling zijn voor de GC, omdat componenten die daar niet voldoende gederivatiseerd of gescheiden worden zoals urinezuur, hippuurzuur, xanthine en dimethylxanthine in de LC juist goed gedetekteerd ( hoge extinctiecoëfficiënt) en gescheiden kunnen worden (lit.97). Op het gebied van de scheiding van aromatische zuren bestaat op dit laboratorium al veel ervaring ( v.d.Venne, lit.98), terwijl ook elders onderzoeken zijn gedaan naar de scheiding van organische zuren op "reversed phase" kolommen (lit.99,100).

Senftleber et al. beschreven de LC-scheiding van componenten in hemodialysaat met behulp van "reversed phase" kolommen (lit.37).

Een ander voordeel van de LC is dat ook stoffen met een hoger molekulgewicht kunnen worden gescheiden, zoals oligopeptiden.

De identifikatie van door middel van LC gescheiden componenten zou kunnen plaatsvinden door fracties op te vangen en deze "off-line" op een massaspectrometer te analyseren.

Een andere technisch veel gecompliceerder methode is het tot stand brengen van een direkte LC-MS koppeling. Het onderzoek op dit gebied lijkt nog lang niet te zijn afgesloten, maar succesvolle toepassing van de techniek is diverse malen in de literatuur beschreven (lit.101,102). De direkte koppeling zoals beschreven door Arpino, Baldwin en McLafferty lijkt de meeste perspectieven te bieden (lit.103,104). Daarbij wordt 1% van het LC-effluent continu via een fijn glazen capillair in

de CI-bron van de massaspectrometer gebracht waarbij het LC-eluent als reaktiegas wordt gebruikt. Het bijmengen van kleine hoeveelheden andere gassen kan het type ionisatie drastisch wijzigen ( zie ook II.2.3.1.). Men lijkt daarom niet gebonden aan bepaalde eluentia voor wat de MS-analyse betreft.

Tsuda en Novotny beschreven gepakte microcapillaire kolommen voor de LC (lit.105). Een voordeel hiervan zou kunnen zijn de lage eluentflow waardoor de koppeling met de MS minder gecompliceerd zou kunnen worden.

Takeuchi, Hirata en Okumura (lit.106) vestigden de aandacht op het gebruik van een GC-MS "one-stage" jet separator voor de monsterverrijking van het effluent van een microvloeistofchromatograaf. Bij gebruik van methanol als eluent, was bij een flow van 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . géén evacuatie van de jetseparator nodig om een druk van 1 torr. in de MS-bron te houden. Met de volledige evacuatiecapaciteit kon 8  $\mu\text{l}/\text{min}$ . eluent flow worden toegepast zonder dat de druk in de bron hoger dan 1 torr. werd.

Toepassing van deze jetseparator met een gewone vloeistofchromatograaf en een splittersysteem behoort ook tot de mogelijkheden.

LITERATUUR.

1. J.A. Bernards en L.N. Bouman, Fysiologie van de mens, tweede druk, p.368 e.v., Utrecht 1976, Bohn, Scheltema & Holkema.
2. R.F. Pitts, Physiology of the kidney and body fluids, 2nd. ed. Year book medical publishers, Chicago 1969, p.228.
3. S.Giovanetti, G.M. Berlyne, An outline of the uremic syndrome, Nephron, 14: 119 (1975).
4. M.R. Wills, Metabolic consequences of chronic renal failure, 2nd.ed. Harvey, Miller & Medcalf, London 1978.
5. R.S. Clements jr., et al. , Raised plasmainositol levels in uraemia and experimental neuropathy, Lancet, 1, 1137, 1973.
6. J.D. Bagdade et al., Hypertriglyceridaemia, a metabolic consequence of chronic renal failure, New Engl. J. Med., 279, 181 (1968).
7. P.L. Balestri, et al., Effects of uremic serum, urea, creatinine methylguanidine on glucose metabolism, Clin. Sci., 42, 395, 1972.
8. S. Giovanetti, G. Barsotti, Methylguanidine in uraemia, Arch. Intern. Med., 131, 709 (1973).
9. I.M. Stein, M.J. Micklus, concentrations in serum and urinary excretion of guanidine, 1-methylguanidine, and 1,1-dimethylguanidine in chronic renal failure, Clin. Chem., 19, 6, 583 (1973).
10. S. Giovanetti, G. Barsotti, Uraemic intoxication, Nephron, 14, 123 (1975).
11. L.R.Baker, R.D.Marshall, Clin. Sci., 41, 563, 1971.
12. R.A. Felgate, W.M. Taylor, The effects of methylguanidine on tissue respiration in vitro, Clin. Sci., 41, 85, (1971).
13. T. Yamada, S. Nakagawa, Analysis of uremic ultrafiltrate: a possible coincidence of highly toxic small molecular fraction with guanidine derivatives, Trans. Amer.Soc. Artif. Int. Organs, XXII, 155 (1976).
14. M. Sasaki, et al., Urinary guanidinoacetate, guanidinosuccinate ratio: an indicator of kidney disfunction, Clin. Chem., 19, 315 (1973).
15. B.D. Cohen, et al., Guanidinosuccinic aciduria in uraemia, a possible alternative pathway for urea synthesis, Am. J. Med., 45, 63, 1968.

16. R. Shainkin, et al., An automated technique for the analysis of plasma guanidino acids, and some findings in chronic renal disease, *Clin. Chim. Acta*, 60, 45, (1975).
17. M.L. Simenhoff, et al., Amine metabolism, and the small bowel in uraemia, *Lancet*, 2, 818, (1976).
18. J.M. Hicks, et al., Abnormal blood constituents in acute renal failure, *Clin. Chim. Acta*, 7, 623, (1962).
19. B.N. Record, et al., Phenolic acids in experimental uraemia I. potential role of phenolic acids in the neurological manifestations of uraemia, *Arch. Neurol.*, Chicago, 21, 387, (1969).
20. S.F. Rabiner, F. Molinas, The role of phenol and phenolic acids on the thrombocytopenia and defective platelet aggregation of patients with renal failure, *Am. J. Med.*, 49, 346 (1970).
21. E.N. Wardle, A study of the effect of possible toxic metabolites of uraemia on red cell metabolism, *Acta Haemat.*, Basel 43, 129 (1970).
22. A.L. Babb, et al., The genesis of the square-meter-hour hypothesis, *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, 17: 81 (1971).
23. A.L. Babb, et al., Hemodialyzer evaluation by examination of solute molecular spectra, *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, 18: 98 (1972).
24. J. Bergström, P. Fürst, Uremic middle molecules, *Clin. Nephrol.*, 5, 4, 1976, 143.
25. F.W. Bultitude, J. Newham, Identification of some abnormal metabolites in plasma from uremic patients, *Clin. Chem.*, 21, 9, (1975), 1329.
26. T.L. Masimore, et al., Gaschromatography-Mass Spectrometry of metabolites in hemodialysis fluid. *J. Chromatogr.*, 143, (1977), 247, ( Biomed. Applic.).
27. B. Dowty, et al., Gaschromatography- Mass spectrometry computer analysis of volatile components in blood plasma from haemodialysis patients, *Biomed. Mass Spectrom.*, 2, 142 (1975).
28. R.D. Bowen, et al., Benzylalcohol in plasma of uremic patients on hemodialysis, High levels found, *Clin. Chim. Acta*, 61, 399 (1975).
29. J.E. Pettersen, et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 35 Suppl. 143 (1975), 147.

30. R. Dzurik, et al., Blood level of middle molecular substances during uraemia and haemodialysis, Proc. EDTA, 10, 1973, 263.
31. T. Chang, Serum middle molecule levels in uremia during long term hemoperfusion, Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs, 20, (1974), 364.
32. A. Gordon, et al., Separation and characterization of uremic metabolites in biological fluids: A screening approach to the definition of uremic toxins, Kidney Int., 7, S-45, 1975.
33. L. Migone, et al., Middle molecules in uremic serum, urine and dialysis fluid, Clin Nephrol., 3, 3, 82, (1975).
34. W. Lutz, et al., Oligopeptides in blood plasma of healthy humans and of patients with nephrotic syndrome, Clin. Chim. Acta, 39, 319, (1972).
35. W. Lutz, Chemical composition and rate of passage across semi-permeable membranes of basic peptides from peritoneal dialysis fluid from patients with chronic renal failure, Acta Med. Pol., XVIII, 2, 137, (1976).
36. G. Cueille, Mise en évidence et évaluation des "moyennes molécules" de la taille de la vitamine B12 présentes dans les liquides biologiques de sujets normaux et de patients urémiques, J. Chromatogr. 146, 55, (1978).
37. F.C. Senftleber, et al., Reversed-phase liquid chromatography analysis of haemodialysate from uremic patients, Clin. Chem., 22, 9, 1522, (1976).
38. F. Mikkers, et al., Analytical isotachopheresis of uremic blood samples, Kidney Int., ter publikatie aangeboden.
39. C. Schutjes, afstudeerverslag T.H. Eindhoven, juni 1978.
40. B. Wengle, K. Hellström, Volatile phenols in serum of uremic patients, Clin. Sci., 43, 493, (1972).
41. B. Munson, Chemical ionization mass spectrometry, Anal. Chem., 43, 13, 28A, (1971).
42. B. Munson, Chemical ionization mass spectrometry, ten years later, Anal. Chem., 49, 9, 772A, (1977).
43. W.J. Richter, H. Schwarz, Chemische Ionisation, ein stark bedeutung gewinnendes massenspektrometrisches Analysenverfahren, Angew. Chem., 90, 449, (1978).

44. N. Einolf, B. Munson, High pressure charge exchange mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Phys.*, 9, 141, (1972).
45. F.H. Field, *MTP Int. Rev. of Science, Physical Chemistry Series One*, vol. 5, 133 (1972).
46. G.W.A. Milne, M.J. Lacey, Modern ionization techniques in mass spectrometry, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, july 1974, 45.
47. H.M. Fales, G.W.A. Milne, et al., Comparison of mass spectra of some biologically important compounds as obtained by various ionization techniques, *Anal. Chem.*, 47, 207, (1975).
48. R.L. Foltz, C.K. Kin, A qualitative and quantitative comparison of EI ionization and CI using various reagent gases, 24th. Int. Conf. MS, and Allied Topics, San Diego, (1976), 711.
49. M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, Direct CI of relatively involatile samples, application to underivatized oligopeptides, *Org. Mass Spectrom.*, 7, 1353, (1973).
50. D.F. Hunt et al., Chemical ionization mass spectrometry of salts and thermally labile organics with field desorption emitters as solids probes, *Anal. Chem.*, 49, 8, 1160, (1977).
51. G. Hansen, B. Munson, Surface Chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 50, 8, 1130, (1978).
52. D. Issachar, J. Yinon, Diagnosis of disorders in amino acid metabolism by chemical ionization mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta*, 73, 307, (1976).
53. D. Issachar, J. Yinon, Determination of carboxylic acid profiles in urine for clinical diagnosis by CI-MS., 25th. Int. Conf. on Mass Spectr. and Allied Topics, Washington D.C., 1977.
54. M. Anbar, R. Dyer, M.E. Scolnick, Clinical diagnosis by molecular profiles of metabolites in urine, 24th. Int. Conf. on Mass Spectr. and Allied Topics, San Diego, Ca. (1976).
55. J.M.L. Mee, J. Korth, B. Halpern, Rapid and quantitative blood amino acid analysis by CI-MS, *Biomed. Mass Spectrom.*, 4, 3, 178, (1977).
56. U. Boerner, et al., Direct mass spectrometric analysis of body fluids from acutely poisoned patients, *Clin. Chim. Acta*, 49, 445, (1973).
57. S. Zitrin, J. Yinon., Identification of opium by CI-MS, *Anal. Lett.*, 10, 3, 235, (1977).

58. A. Tatematsu, et al., Mass spectrometry of medicines, quantitative determination by direct-probe inlet system mass chromatography, *Biomed. Mass Spectrom.*, 5, 3, 192, (1978).
59. R.D. Grigsby, et al., Analysis of composite spectra from mixtures subjected to micromolecular distillation in a mass spectrometer, *Anal. Chem.*, 43, 8, 1135, (1971).
60. D.F. Hunt, selective reagents for chemical ionisation MS, *Prog. Anal. Chem.*, 6, 359, (1973).
61. D.F. Hunt, Reagent gases for chemical ionisation, *Adv. in Mass Spectr.* vol. 7, ed. N.R. Daly, 517, (1978).
62. F.H. Field, *MTP Int. Rev. of Science, Physical Chemistry Series One*, vol. 5, 133, (1972).
63. F.H. Field, *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 2827, (1969).
64. J.G. Leferink, P.A. Leclercq, *Anal. Chem.*, 45, 625, (1973).
65. B.J. Millard, *Quantitative mass spectrometry*, Heyden & Son, London, 1978.
66. W.D. Lehmann, H.R. Schulten, *Quantitative Massenspektrometrie in Biochemie und Medizin*, *Angew. Chem.*, 90, 4, (1978), 233.
67. J.G. Dillard, Negative ion Mass Spectrometry (review), *Chem. Reviews*, 73, 6, 589, (1973).
68. J.H. Bowie, B.D. Williams, *MTP Int. Rev. of Science, Physical Chemistry Series II*, vol. 5, (1975).
69. D.F. Hunt, et al., Pulsed positive negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 48, 14, 2098, (1976).
70. D.F. Hunt, et al., Determination of molecular compositions, on a quadrupole mass spectrometer by pulsed positive negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 49, 12, 1884, (1977).
71. F.M. Everaerts, *collegediktaat elektroforese*, nov. 1975, (voorlopige uitgave), 10.
72. F.M. Everaerts, F.E.P. Mikkers, Th.P.E.M. Verheggen, *Isotachopheresis, Separation and Purification methods*, vol. 6, 2, 287, Marcel Dekker, 1977.
73. F. Mikkers, *collegediktaat scheidingsmethoden II*, voorjaar 1978.
74. F. Everaerts, J. Beckers, Th. Verheggen, *Isotachopheresis*, *J. Chromatogr. Library*, vol.6, Elsevier Amsterdam, 1976.
75. F. Mikkers, niet gepubliceerde meetresultaten.



76. C. Fenselau, The mass spectrometer as a GC-detector, Anal. Chem., 49, 6, 563A (1977).
77. B.J. Gudzinowicz et al., Fundamentals of integrated GC-MS, part I,II, Marcel Dekker, New York, Basel, 1976.
78. P.A. Leclercq, Some applications of mass spectrometry in biochemistry, Thesis, TH Eindhoven, nov. 1975.
79. L. Eldjarn, E. Jellum, O. Stokke, Application of GC-MS in routine and research in clinical chemistry, J. Chromatogr., 91, 353, (1974).
80. A.M. Lawson, The scope of mass spectrometry in clinical chemistry, Clin. Chem., 21, 7,803, (1975).
81. E. Jellum, et al., Applications of GC-MS and computer methods in clinical biochemistry, Anal. Chem., 45, 1099, (1973).
82. E. Jellum, Profiling of human body fluids in healthy and diseased states using GC and MS with special reference to organic acids (review), J. Chromatogr., 143, 427, (1977).
83. P. Ripson, afstudeerverslag TH Eindhoven, april 1977.
84. J. Drozd, Chemical derivatization in gaschromatography, J. Chromatogr.,113, 303, (1975).
85. zie lit. 78.
86. J.A. Thompson, S.P. Markey, Quantitative metabolic profiling of urinary organic acids by gaschromatography mass spectrometry, comparison of isolation methods, Anal. Chem., 47, 8, 1313, (1975).
87. S.P. Markey, et al., Mass spectra of compounds of biological interest, National Technical Information Service, U.S. Dept. of Commerce, TID-26553, vol. I, II, III.
88. B.L. Jelus, B. Munson, C. Fenselau, Reagent gases for GC-MS analysis, Biomed. Mass Spectrom., 1, 96, (1974).
89. zie lit. 44.
90. D.F. Hunt, J.F. Ryan, Chemical ionization mass spectrometry studies. Nitric oxide as a reagent gas, J.C.S. Chem. Comm., 620, (1972).
91. D.J. Marshall, B.A. Petersen, P. Vouros, Some considerations on quantitative methodology and detection limits in organic mass spectrometry, Biomed. Mass Spectrom., 5, 3, 243, (1978).

92. G. Petersson, Mass spectrometry of aldonic and deoxyaldonic acids as trimethylsilyl derivatives, *Tetrahedron*, 26, 3413, 1970.
93. P. Størset, O. Stokke, E. Jellum, Monosaccharides and monosaccharide derivatives in human seminal plasma, *J. Chromatogr.*, 145, 351, (1978).
94. M.G. Horning, et al., Gaschromatographic study of the derivatives of acids of the Krebscycle and related compounds, *Anal. Lett.*, 1, 713, (1973).
95. D.C. De Jongh, et al., Analysis of trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gaschromatography and mass spectrometry, *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 7, 1728, (1969).
96. G. Petersson, Mass spectrometry of hydroxydicarboxylic acids as trimethylsilyl derivatives. Rearrangement fragmentations, *Org. Mass Spectrom.*, 6, 565, (1972).
97. H. Matsui, et al., High performance liquid chromatographic determination of hippuric acid in human urine, *J. Chromatogr.*, 145, 231, (1978).
98. J.L.M. v.d. Venne, J.L.H.M. Hendrikx, R.S. Deelder, Retention behaviour of carboxylic acids in reversed phase column liquid chromatography, *J. Chromatogr.* geaccepteerd voor publikatie.
99. I. Molnár, C. Horváth, Rapid separation of urinary acids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 143, 391, (1977).
101. J.D. Henion, The application of LC/MS/COM to the separation and identification of biologically important substances, *Adv. Mass Spectr.*, vol 7B, ed. N.R. Daly, 865, (1978).
100. W. Distler, Trennung von milch-, glyoxyl-, ameisen-, essig-, und propionsäure mit Hilfe der Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie, *J. Chromatogr.*, 152, 1, 250, (1978).
102. B.G. Dawkins, P.J. Arpino, F.W. McLafferty, Polypeptide sequencing by liquid chromatography mass spectrometry, *Biomed. Mass Spectrom.*, 5, 1, 1, (1978).
103. P.J. Arpino, B.G. Dawkins, F.W. McLafferty, a liquid chromatographic mass spectrometry system, providing continuous monitoring with nanogram sensitivity, *J. Chromat. Sci.*, 12, 574, (1974).

104. P.J. Arpino, M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, Liquid chromatography Mass spectrometry II- continuous monitoring, Biomed. Mass spectrom., 1, 80, (1974).
  105. T. Tsuda, M. Novotny, Packed microcapillary columns in high performance liquid chromatography, Anal. Chem., 50, 2, 271, (1978).
  106. T. Takeuchi, Y. Hirata, Y. Okumura, On-line coupling of a micro-liquid chromatograph and mass spectrometer through a jet-separator, Anal Chem., 50, 4, 659, (1978).
-

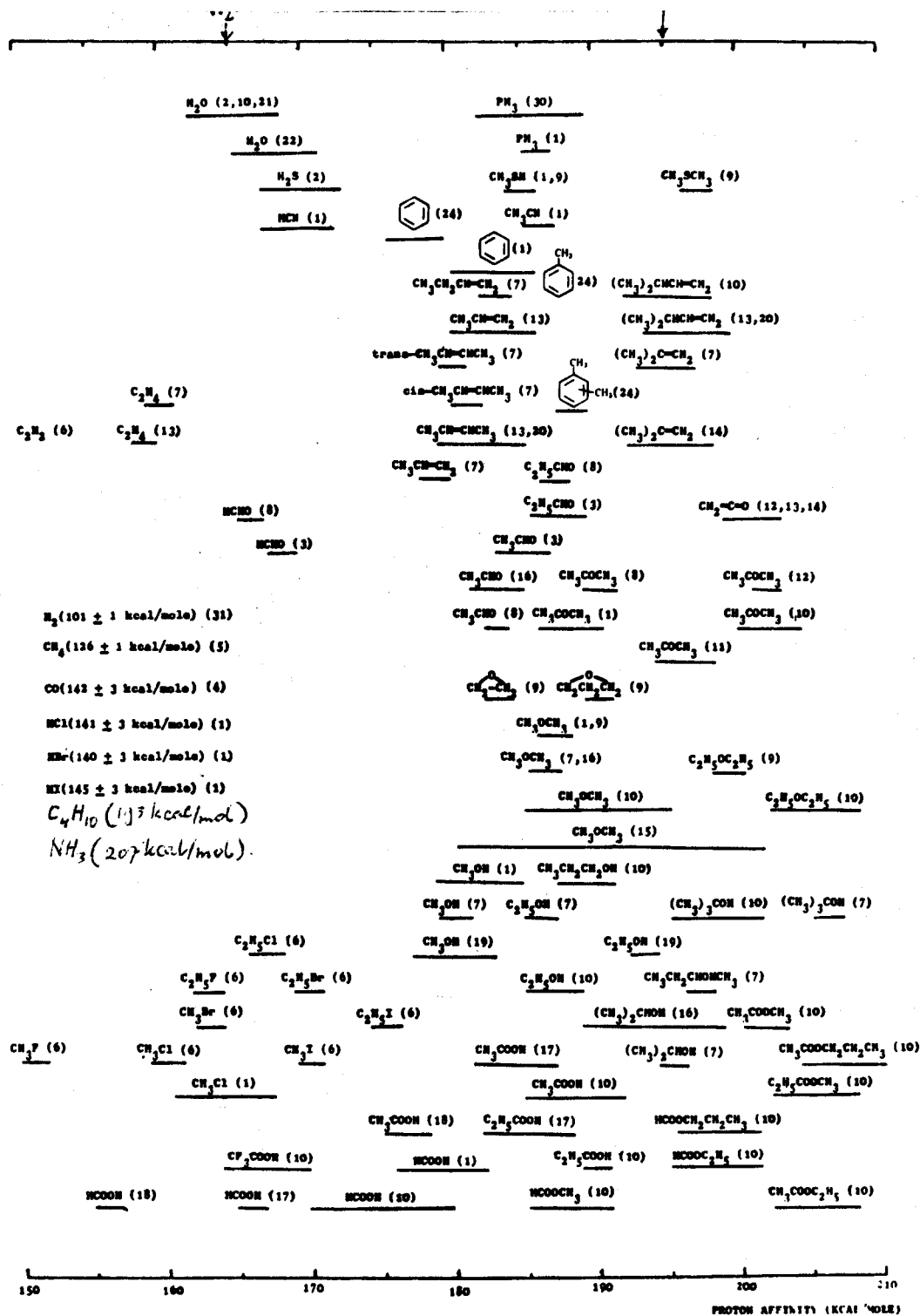


FIGURE 16. Proton affinities of selected organic molecules. The center of each horizontal line represents the measured proton affinity; the length of the line provides a measure of the experimental error. If the proton affinity relative to a standard was measured accurately, or if no experimental error was given in the original paper, an arbitrary length of  $\pm 1$  kcal mole<sup>-1</sup> has been given to the entry. The number in parentheses for each entry refers to the original paper. (See following references.)

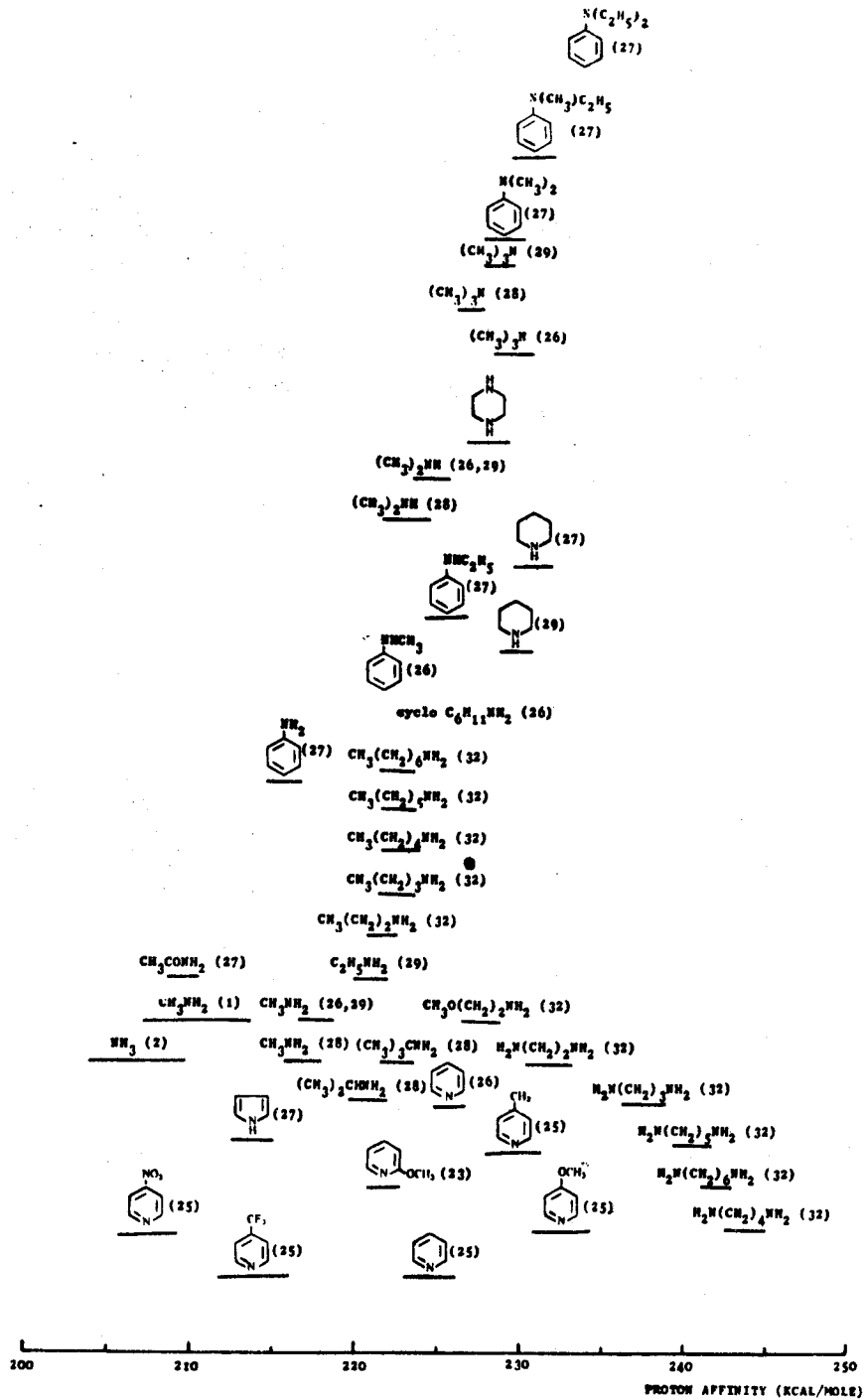
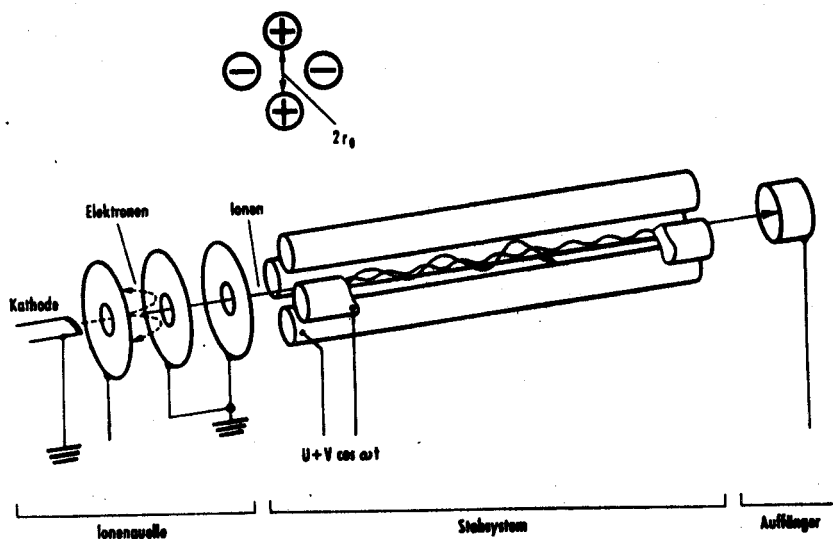


FIGURE 17. Proton affinities of selected organic molecules. The center of each horizontal line represents the measured proton affinity; the length of the line provides a measure of the experimental error. If the proton affinity relative to a standard was measured accurately, or if no experimental error was given in the original paper, an arbitrary length of  $\pm 1$  kcal mole<sup>-1</sup> has been given to the entry. The number in parentheses for each entry refers to the original paper. (See following references.)

QUADRUPOLE MASSASCHEIDING.

Het door ons gebruikte Finnigan apparaat was uitgerust met een quadropole-analysator. Onderstaande figuur geeft schematisch zo'n massafilter weer.



De massascheiding vindt plaats op basis van een wisselend elektrisch veld dat is aangelegd op vier elektroden of staven die in de lengterichting evenwijdig lopen en die cirkelvormig of hyperbolisch in doorsnede zijn. Tegenover elkaar liggende elektroden zijn onderling elektrisch verbonden, waarbij op ieder paar een elektrische spanning staat; deze is opgebouwd uit een gelijkspannings- en een radiofrequentie component ( $V_R \cos \omega t$ ). De gelijkspanning ( $V_D$ ) op beide paren elektroden is gelijk maar tegengesteld van teken. De radiofrequentie spanningscomponent op het ene elektrodenpaar heeft een faseverschil van  $180^\circ$  ten opzichte van die op het andere paar.

Aan één uiteinde worden ionen met behulp van een offsetspanning uit de ionenbron gedreven. Als deze in de analysator zijn aangekomen zijn ze onderhevig aan een elektrostatisch veld dat een oscillatie

BIJLAGE 2 vervolg.

van een bepaald ion in de richting loodrecht op de lengte-richting van de staven veroorzaakt. De begrensdheid van de oscillatie is sterk afhankelijk van de m/e-waarde van het ion. Bij een bepaalde combinatie van r.f. spanning, gelijkspanning, r.f. frekwentie en afstand tot de staven zal slechts een ion met één bepaalde m/e-waarde de analysator in een begrensde oscillatie kunnen passeren. Alle overige ionen, dus die met andere m/e-waarden zullen in een onbegrensde oscillatie tegen de staven worden geslingerd en daar worden ontladen.

Voor een enkelgeladen ion geldt de volgende relatie:

$$m = \frac{0,136 \cdot V}{r_0^2 \cdot f^2} \quad \text{waarbij } V \text{ in volts, } r_0 \text{ in cm en } f \text{ in MHz.}$$

Een scan over het gehele gebied van m/e-waarden wordt bereikt door de r.f.frekwentie te variëren bij konstante spanning, of wat meestal gebeurt, door de r.f.- en gelijkspanning gelijktijdig te variëren bij konstante f. Omdat de scantijd volledig afhankelijk is van elektrische parameters kan deze zeer kort zijn: 1000 a.m.e./sec. De gevoeligheid van de quadrupoleanalysator is hoger dan die van een magnetisch sectorinstrument omdat ionen die tot onder een hoek van 60° de analysator binnenkomen, kunnen worden verwerkt. De geometrie van de elektroden is mede bepalend voor de gevoeligheid en het massabereik. ( een grotere pooldiameter geeft een grotere gevoeligheid, een kleinere pooldiameter vergroot het massabereik, verlenging van de staven verhoogt de resolutie en het vermogen om ionen met hoge energien te verwerken. Een hoge offsetspanning heeft een negatieve invloed op de resolutie) De staven moeten konstant van diameter zijn en volkomen evenwijdig lopen ( tolerantie beter dan 0,0025 mm!).

Ionen die in het elektrische veld worden geïjekteerd zijn onderhevig aan de volgende bewegingsvergelijkingen:

$$m\ddot{x} + \frac{2e(V_D + V_R \cos \omega t)x}{r_0^2} = 0 ; \quad m\ddot{y} - \frac{2e(V_D + V_R \cos \omega t)y}{r_0^2} = 0 ; \quad m\ddot{z} = 0 ;$$

Met behulp van de dimensieloze parameters:

$$A = \frac{8eV_D}{m r_0^2 \omega^2}, \quad Q = \frac{4eV_R}{m r_0^2 \omega^2}, \quad \text{en} \quad \Phi = \frac{\omega t}{2}$$

kunnen de zogenaamde differentiaalvergelijkingen van Mathieu worden opgesteld.

$$\frac{d^2 x}{d\Phi^2} + (A + 2Q \cos 2\Phi) x = 0 \quad \text{en}$$

$$\frac{d^2 y}{d\Phi^2} - (A + 2Q \cos 2\Phi) y = 0 \quad ;$$

Slechts bij bepaalde waarden van A en Q blijft de amplitude van de oscillatie in x- en y-richting eindig. Bij andere waarden zal één van de oscillaties of beide exponentieel toenemen en een botsing met de elektroden tot gevolg hebben.

Tot slot willen we nog wijzen op het belangrijke feit dat de quadrupole-spectra een lineaire massaschaal hebben in tegenstelling tot die van magnetische sectorinstrumenten waar een exponentiële massaschaal optreedt.



Problemen met het mengen van gassen.

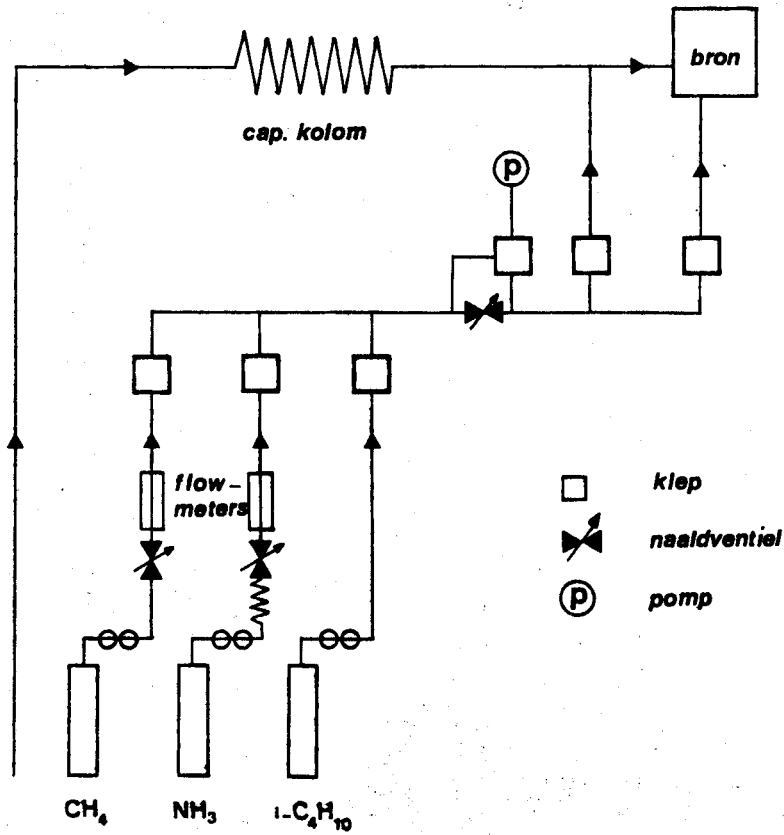
Het bewerkstelligen van een gasmenging in de ionenbron van de massaspectrometer kan op twee manieren plaatsvinden:

- a) door toevoer van de aparte gassen, waarbij opmenging plaatsvindt in de leidingen en de bron van de MS.
- b) Toevoer van het gewenste mengsel aan de MS (menging vóóraf).

De methode a) leek niet haalbaar omdat met het systeem in onderstaande figuur de gewenste flows van de te mengen gassen niet onafhankelijk van elkaar konden worden geregeld, zodat ook de samenstelling van het mengsel in de bron niet bekend was. Toepassing van een gasmengpomp tussen gasflessen en MS zou een mogelijkheid zijn, ware het niet dat de olie en de koperen ( of messing) onderdelen niet bestand zijn tegen een corrosief gas als ammoniak.

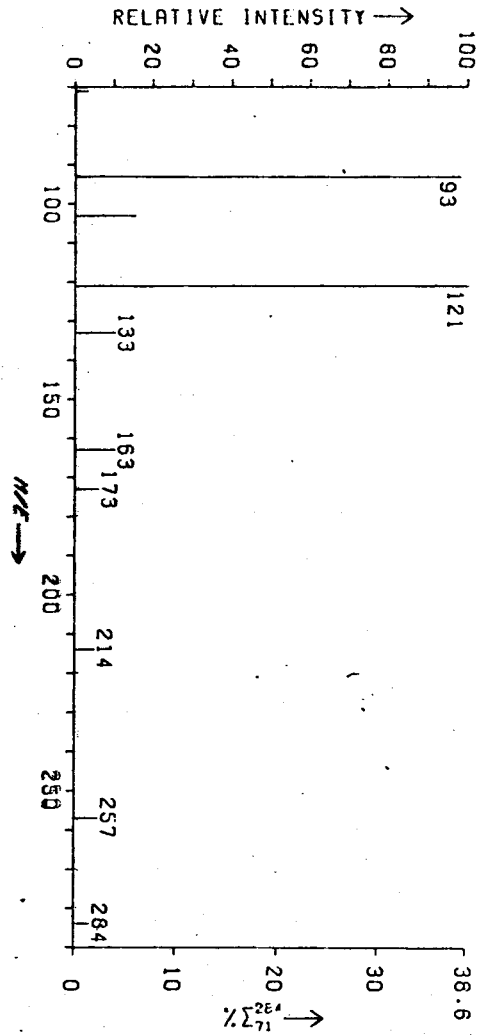
ad b). Gasmengsels kunnen in de gewenste samenstelling worden geleverd door Matheson. Daarbij kan een geschikte gasfles worden gehuurd. Een probleem vormt echter het reduceerventiel. Bij een gasmengsel van methaan en ammoniak moet het reduceerventiel zowel voldoen aan de eisen van een hoge druk, als aan de eisen voor corrosieve gassen zoals ammoniak. Dit betekent dat een monel-stalen reduceerventiel moet worden aangeschaft ( f 1800,-), omdat huren niet kan. Een mogelijkheid is in plaats van methaan isobutaan met ammoniak te mengen. Het isobutaan heeft namelijk een zeer lage flesdruk ( enkele atmosferen), zodat zou kunnen worden gewerkt met het voorhanden zijnde lage druk ammoniak reduceerventiel, al of niet met verloopstuk. In dit geval moet alleen een geschikte worden gekocht of gehuurd ( beide f 200,-).

Onlangs bleek dat de fa. Messer-Griesheim gasmengsels kan leveren van ieder volume, samenstelling en flesdruk mits dit fysisch en veiligheidstechnisch mogelijk is. Een mengsel van methaan en ammoniak zou dan misschien onder lagere druk kunnen worden geleverd, zodat dan met roestvrijstalen naaldventielen zou kunnen worden gewerkt.



Schema voor de toevoer van te mengen gassen aan de massaspectrometer.

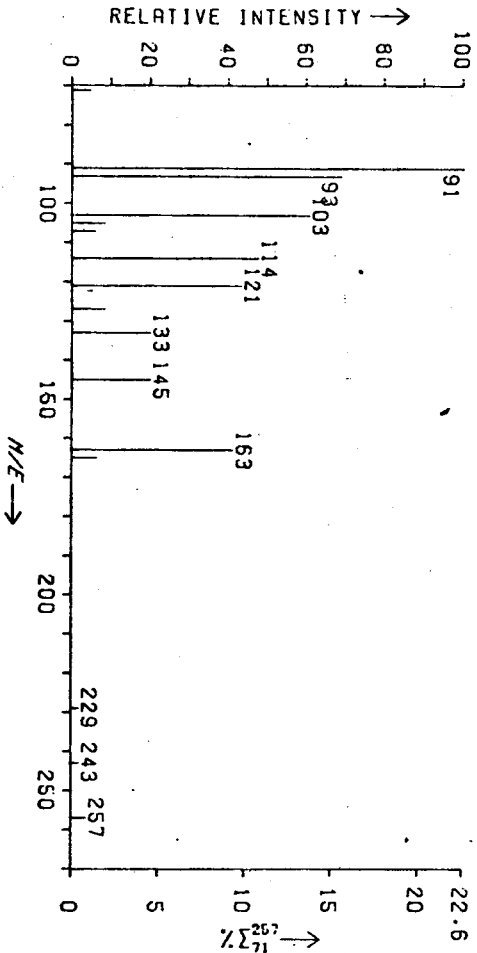
ULTRAFILTRATE, AVL., UREA OMITTED  
DD. 07-10-77



MOLWEIGHT PROFILE.  
C1 (ISOBUTANE), PRESSURE: 0.24 TORR.  
FIN 4000. 1 SEC/SCAN  
EL. EN.: 25.5 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
SOURCETEMP.: 160. PROBETEMP.: 100  
AD SCHCOTS - 780209

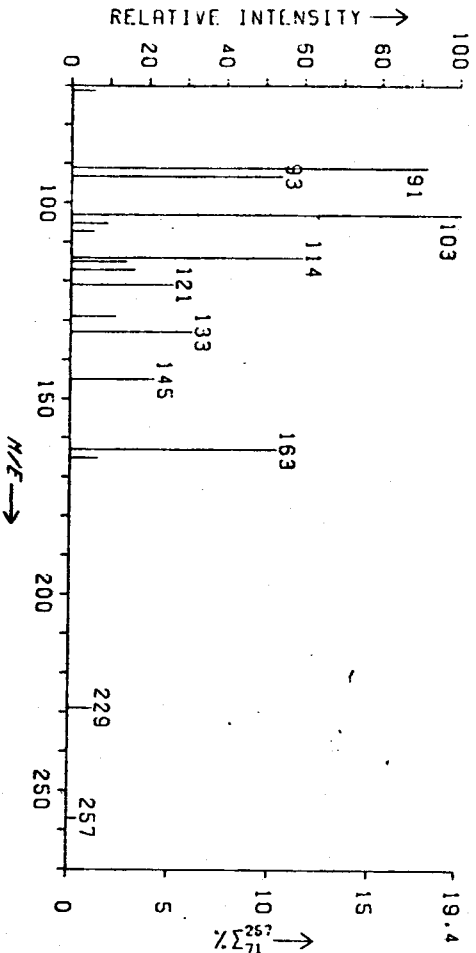
Biflage 4

ULTRAFILTRATE, AVL., UREA OMITTED  
DD. 07-10-77



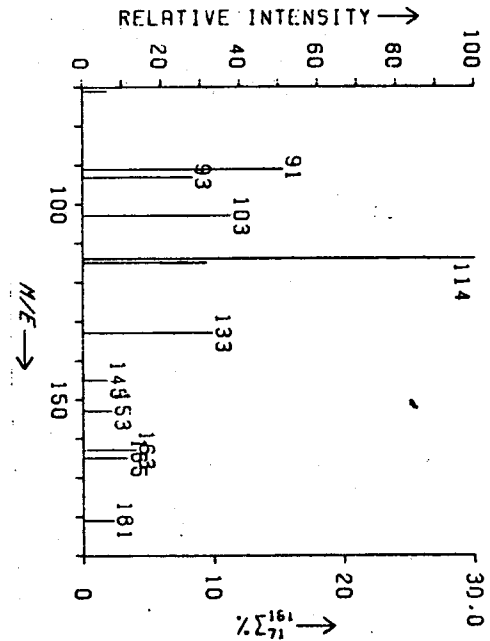
MOLWEIGHT PROFILE.  
C1 (ISOBUTANE), PRESSURE: 0.24 TORR.  
FIN 4000. 1 SEC/SCAN  
EL. EN.: 25.5 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
SOURCETEMP.: 160. PROBETEMP.: 130  
AD SCHCOTS - 780209

ULTRAFILTRATE, AVL., UREA OMITTED  
DD. 07-10-77



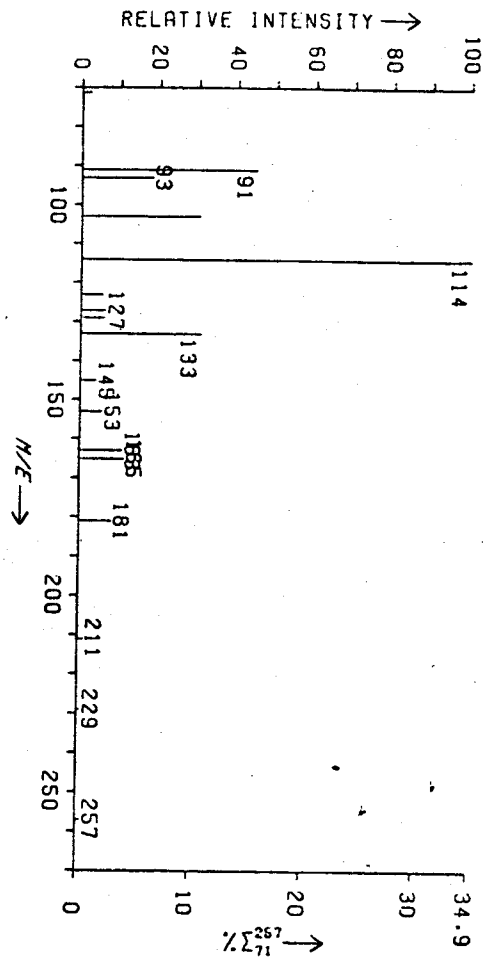
MOLWEIGHT PROFILE.  
C1 (ISOBUTANE), PRESSURE: 0.24 TORR.  
FIN 4000. 1 SEC/SCAN  
EL. EN.: 25.5 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
SOURCETEMP.: 160. PROBETEMP.: 140  
AD SCHCOTS - 780209

ULTRAFILTRATE, AVL., UREA OMITTED  
DD. 07-10-77



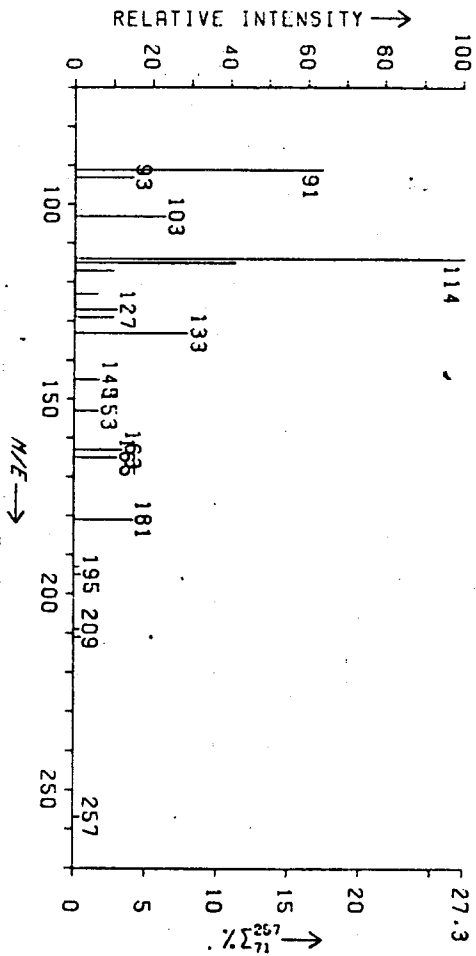
MOLWEIGHT PROFILE.  
 CI (ISOBUTANE), PRESSURE: 0.24 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 25.5 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 160, PROBETEMP.: 212  
 AD SCHOOTS - 780209

ULTRAFILTRATE, AVL., UREA OMITTED  
DD. 07-10-77



MOLWEIGHT PROFILE.  
 CI (ISOBUTANE), PRESSURE: 0.24 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 25.5 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 160, PROBETEMP.: 232  
 AD SCHOOTS - 780209

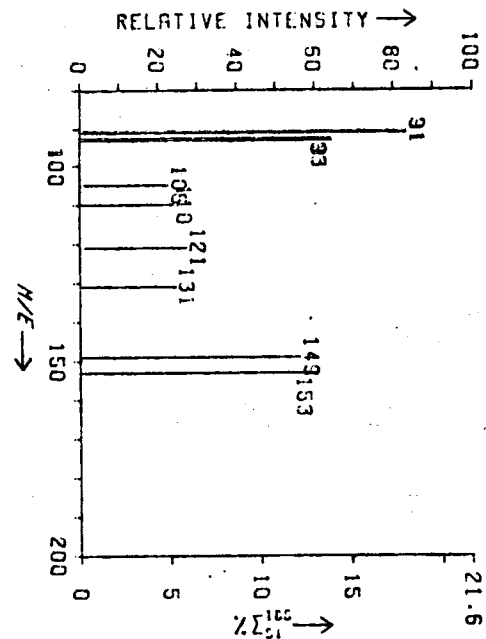
ULTRAFILTRATE, AVL., UREA OMITTED  
DD. 07-10-77



MOLWEIGHT PROFILE.  
 CI (ISOBUTANE), PRESSURE: 0.24 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 25.5 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 160, PROBETEMP.: 255  
 AD SCHOOTS - 780209

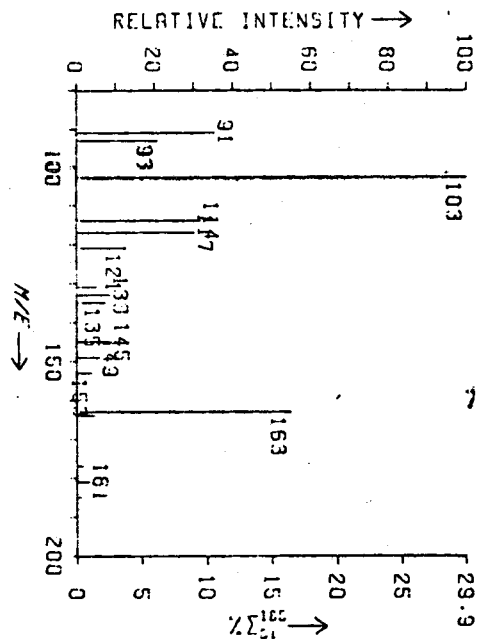
ULTRAFILTRRAT, POOL VOOR KN.

DD. --



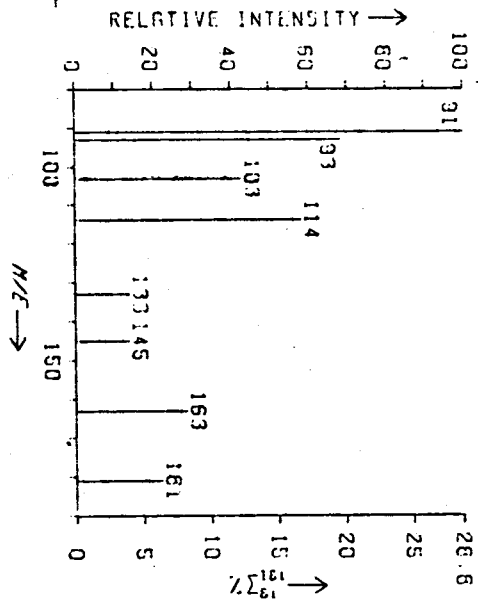
MOLWEIGHT PROFILE.  
 CII (ISOBUTAN), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN. 41 EV., EL. CURR. 0.2 MA  
 SOURCE TEMP. 200, PROBE TEMP. 49  
 AD SCHOOTS - 780530

ULTRAFILTRRAT, POOL VOOR KN.  
 DD. --

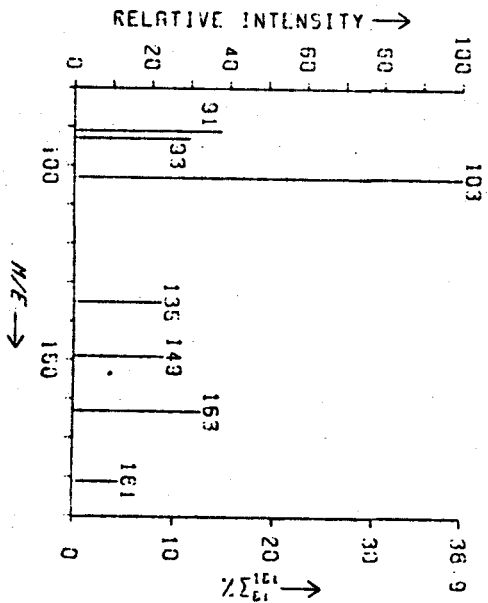


MOLWEIGHT PROFILE.  
 CII (ISOBUTAN), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN. 41 EV., EL. CURR. 0.2 MA  
 SOURCE TEMP. 200, PROBE TEMP. 217  
 AD SCHOOTS - 780530

ULTRAFILTRRAT, POOL VOOR KN.  
 DD. --

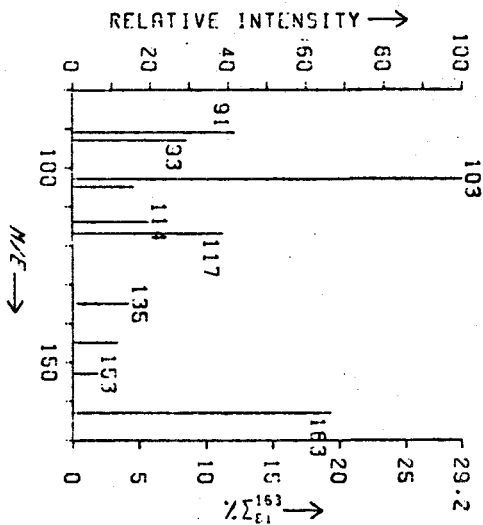


MOLWEIGHT PROFILE.  
 CII (ISOBUTAN), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN. 41 EV., EL. CURR. 0.2 MA  
 SOURCE TEMP. 200, PROBE TEMP. 283  
 AD SCHOOTS - 780530



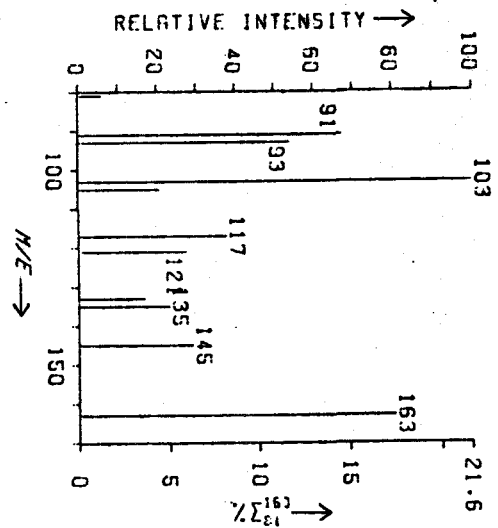
MOLWEIGHT PROFILE.  
 C1 (ISOBUTAN), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 41 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCE TEMP.: 200, PROBE TEMP.: 212  
 AD SCHCOTS - 780530

ULTRAFILTRANT, POOL NR KN.



MOLWEIGHT PROFILE.  
 C1 (ISOBUTAN), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 41 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCE TEMP.: 200, PROBE TEMP.: 168  
 AD SCHCOTS - 780530

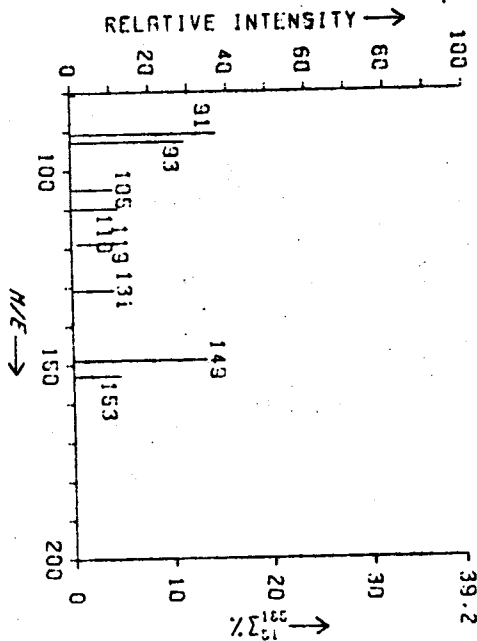
ULTRAFILTRANT, POOL NR KN.



MOLWEIGHT PROFILE.  
 C1 (ISOBUTAN), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 41 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCE TEMP.: 200, PROBE TEMP.: 155  
 AD SCHCOTS - 780530

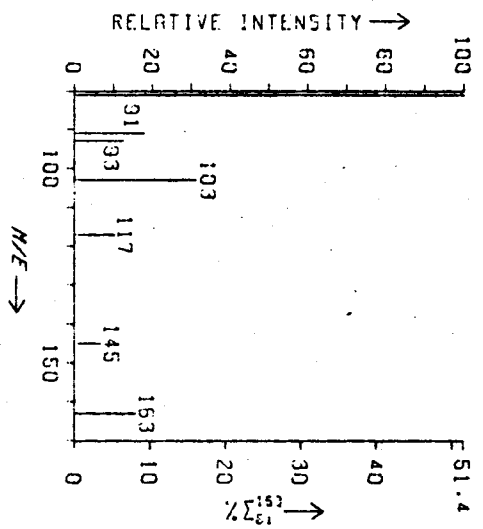
ULTRAFILTRANT, POOL NR KN.

ULTRAFILTRRRT, POOL GEZOND,  
90. --



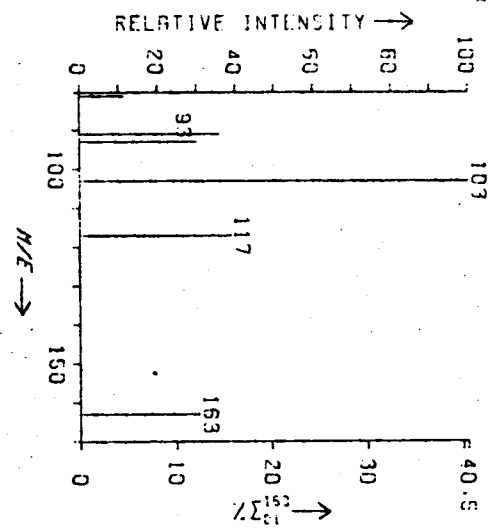
MOLWEICHT PROFILE.  
 C11(SOBUTAN). PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 41 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCE TEMP.: 200, PROBE TEMP.: 57  
 AD SCHOOTS - 780530

ULTRAFILTRRRT, POOL GEZOND,  
90. --

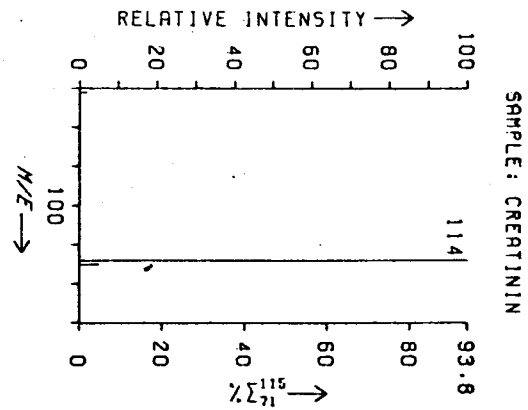


MOLWEICHT PROFILE.  
 C11(SOBUTAN). PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 41 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCE TEMP.: 200, PROBE TEMP.: 140  
 AD SCHOOTS - 780530

ULTRAFILTRRRT, POOL GEZOND,  
90. --

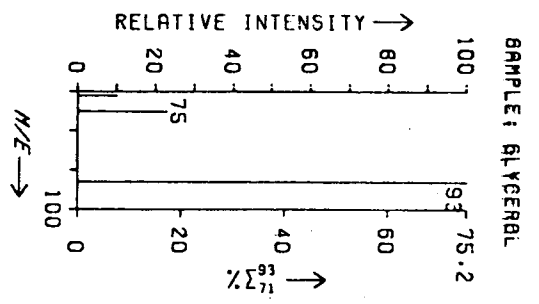


MOLWEICHT PROFILE.  
 C11(SOBUTAN). PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1 SEC/SCAN  
 EL. EN.: 41 EV., EL. CURR.: 0.2 MA  
 SOURCE TEMP.: 200, PROBE TEMP.: 199  
 AD SCHOOTS - 780530



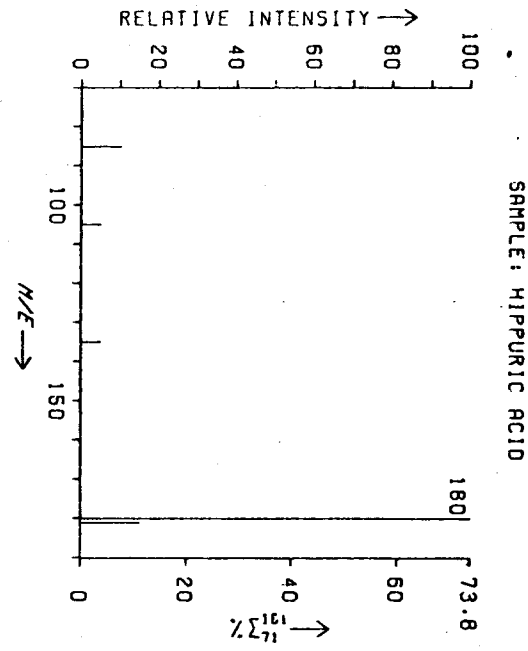
SAMPLE: CREATININ

MOLWEIGHT: 113  
 CI( ISOBUTAN), PRESSURE: 0.24 TORR.  
 FIN 4000. 1SEC/SCAN  
 EL.ENERGY: 25 EV, EL.CURRENT: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 200 PROBETEMP.: 150  
 AD SCHOOTS - 771110



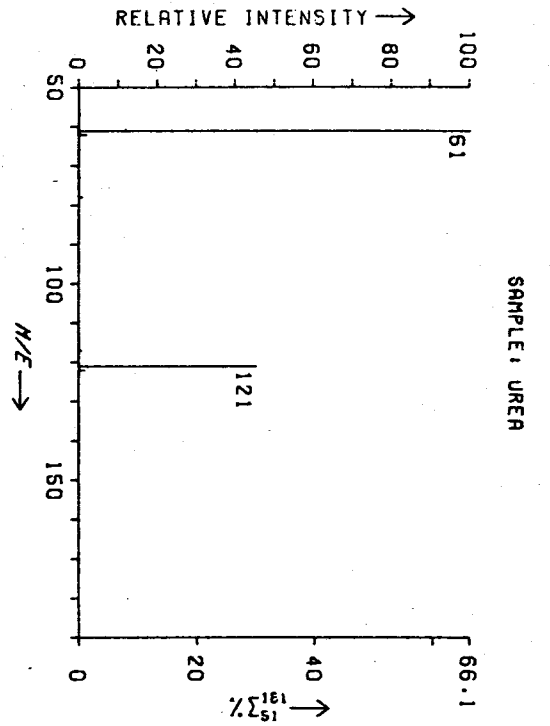
SAMPLE: GLYZEROL

MOLWT.: 92  
 FIN 4000. MODE: CI, ISOBUTANE, 0.25 TORR  
 EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSF.: 1 SEC/SCAN  
 SOURCETEMP.: 200, PROBETEMP.: 110  
 INLET: PROBE, INLET CONDIT.: -  
 AD SCHOOTS - 780208



SAMPLE: HIPPURIC ACID

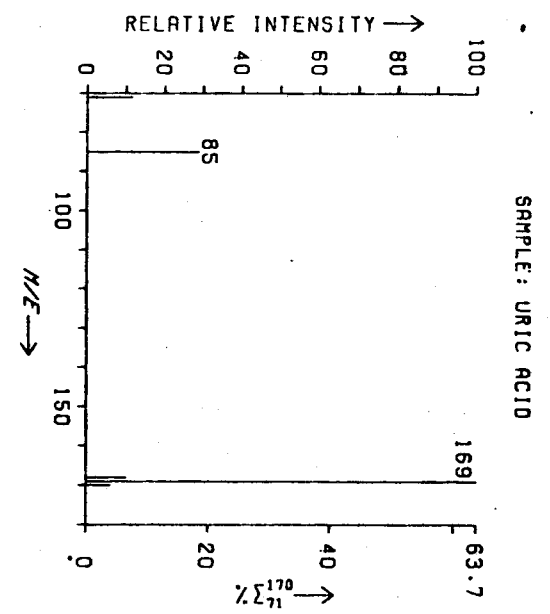
MOLWEIGHT: 179  
 CI( ISOBUTAN), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000. 1SEC/SCAN  
 EL.ENERGY: 15 EV, EL.CURRENT: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 220 PROBETEMP.: 160  
 AD SCHOOTS - 771110



SAMPLE: UREA

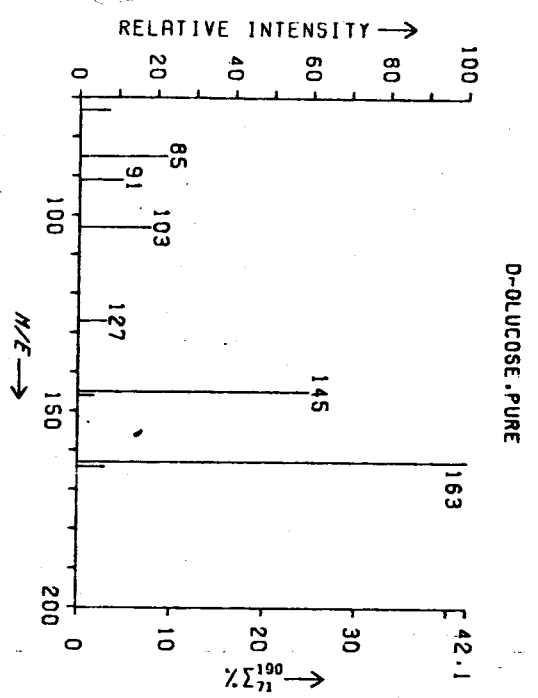
MOLWT.: 60  
 FIN 4000. MODE: CI, ISOBUTANE, 0.20 TORR  
 EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSF.: 1 SEC/SCAN  
 SOURCETEMP.: 160, PROBETEMP.: 130  
 INLET: PROBE, INLET CONDIT.: -  
 AD SCHOOTS - 780208  
 EL. EN.: 25 EV





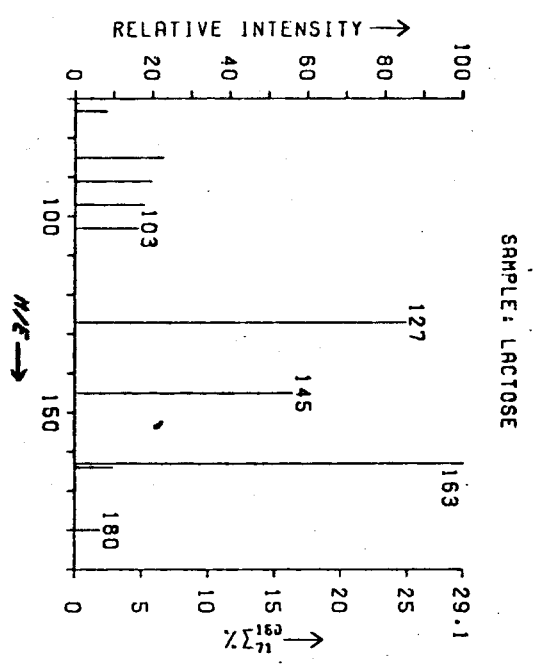
SAMPLE: URIC ACID

MOLWEIGHT: 168  
 C1( ISOBUTAN), PRESSURE: 0.24 TORR.  
 FIN 4000, 1SEC/SCAN  
 EL-ENERGY: 14 EV, EL-CURRENT: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 220 PROBETEMP.: 307  
 AD SCHOOTS - 771110



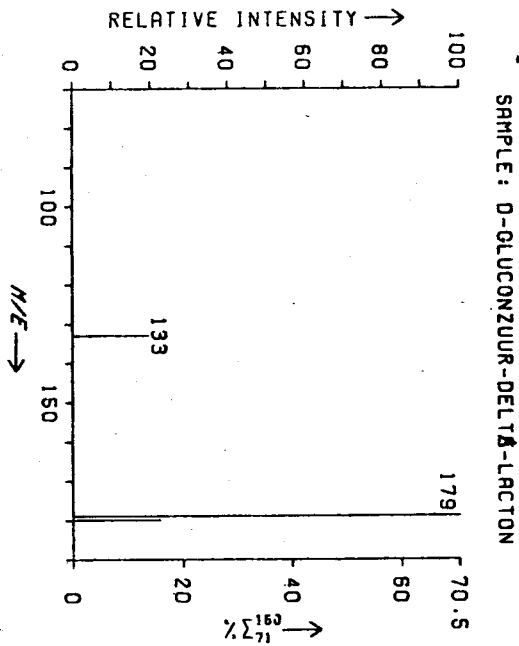
D-GLUCOSE PURE

C-6 H-12 O-6 - MW 180  
 FIN 4000 C1( ISOBUTAN)  
 IONIZER PRESSURE: 0.15 TORR.  
 15 EV, 0.2 MA, 1 S/SCAN.  
 PROBETEMP. 150, SOURCETEMP. 220.  
 AD SCHOOTS, 771107

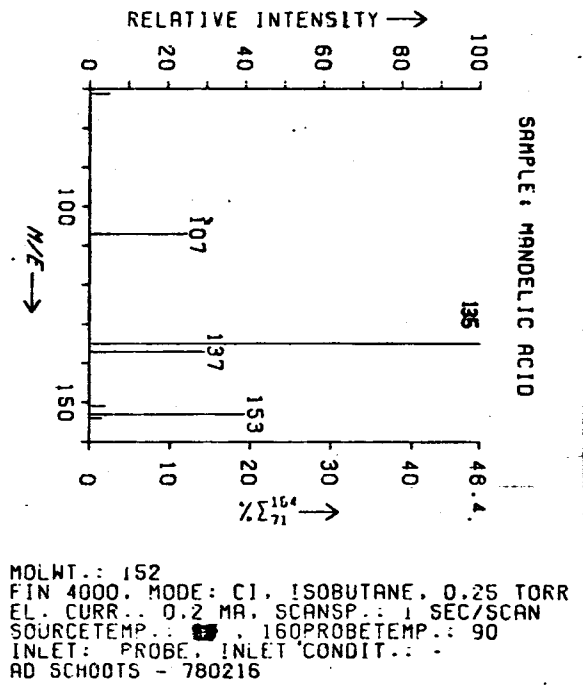
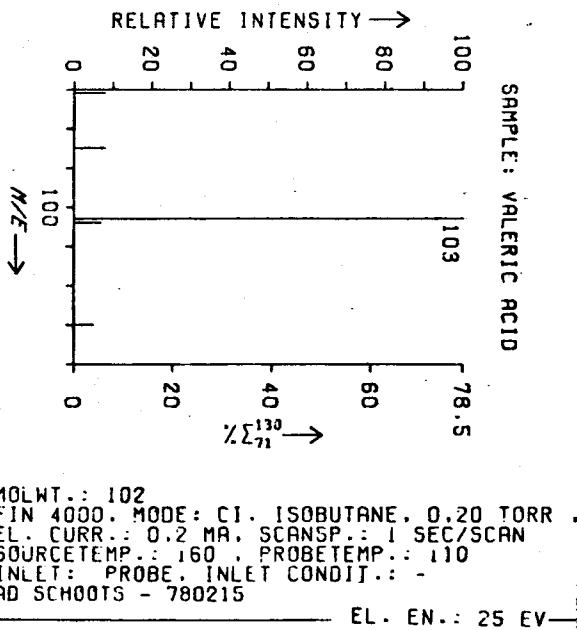


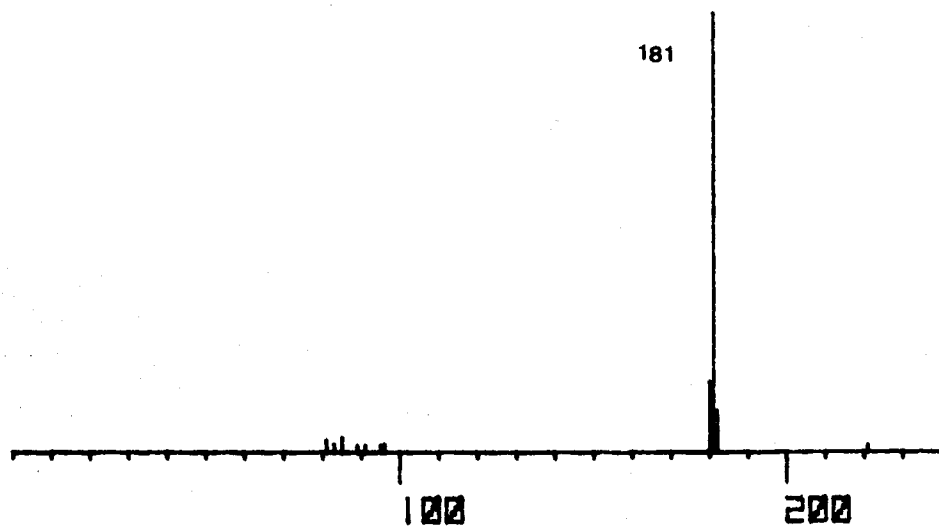
SAMPLE: LACTOSE

MOLWEIGHT: 342  
 C1( ISOBUTANE), PRESSURE: 0.15 TORR.  
 FIN 4000, 1SEC/SCAN  
 EL-ENERGY: 15 EV, EL-CURRENT: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 220 PROBETEMP.: 285  
 AD SCHOOTS - 771110



MOLWEIGHT: 178  
 C1 (ISOBUTAN). PRESSURE: 0.14 TORR.  
 FIN 4000. 1SEC/SCAN  
 EL.ENERGY: 15 EV. EL.CURRENT: 0.2 MA  
 SOURCETEMP.: 220 PROBETEMP.: 160  
 AD SCHOOTS - 771110





CI(isobutaan) mass spectrum van  
THEOPHYLLINE (41 eV, 200°C, 0,17 torr.)

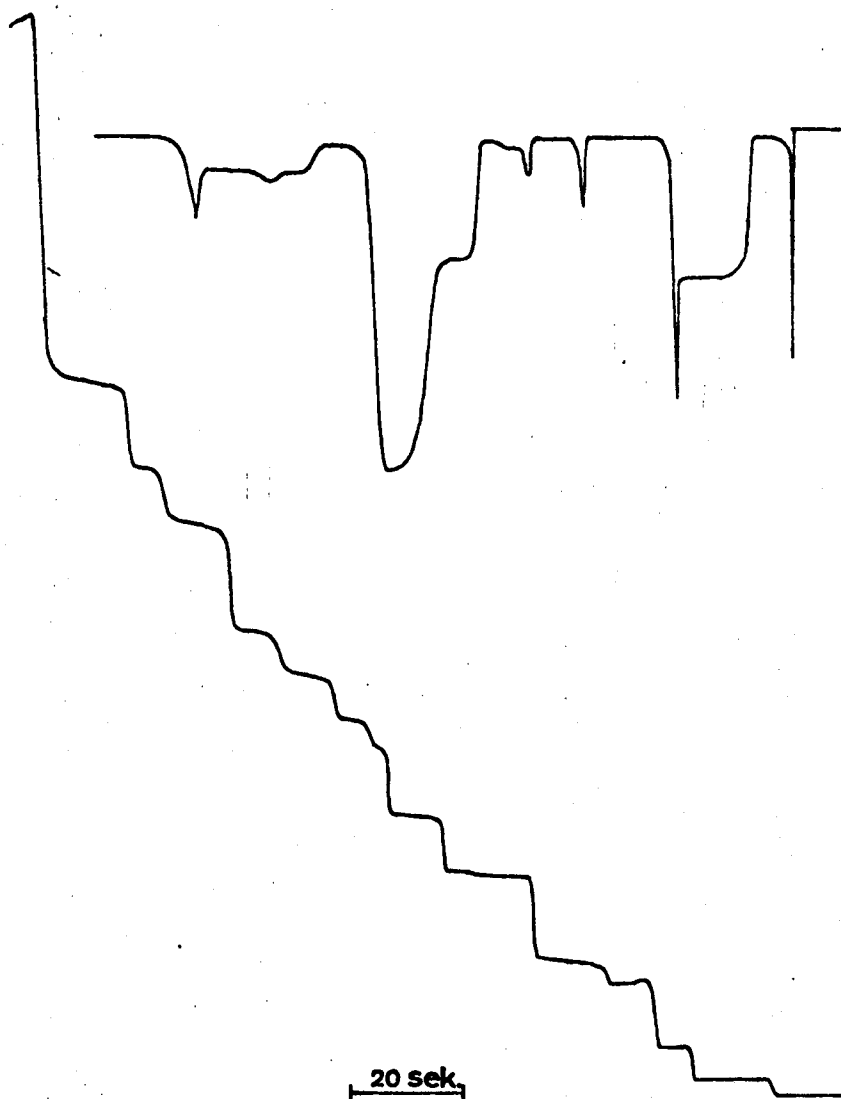
Monocarbonsäuren [Salze]	Dicarbonsäuren [Salze]	Hydroxy- bzw. Ketosäuren [Salze]
$\text{H}-\text{COOH}$ <p>Ameisensäure [Formiat]</p>	$\text{HOOC}-\text{COOH}$ <p>Oxalsäure [Oxalat]</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Milchsäure [Lactat]</p>
$\text{H}_3\text{C}-\text{COOH}$ <p>Essigsäure [Acetat]</p>	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ <p>Malonsäure [Malonat]</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\    \\ \text{O} \end{array}$ <p>Brenztraubensäure [Pyruvat]</p>
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ <p>Propionsäure [Propionat]</p>	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ <p>Bernsteinsäure [Succinat]</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$ <p>Glycerinsäure [Glycerat]</p>
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ <p>Buttersäure [Butyrat]</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{COOH} \\ \quad \quad \diagdown \quad / \\ \quad \quad \text{C}=\text{C} \\ \quad \quad / \quad \quad \diagdown \\ \text{HOOC} \quad \quad \text{H} \end{array}$ <p>Fumarsäure [Fumarat]</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{HOOC} \quad \text{OH} \end{array}$ <p>Äpfelsäure [Malat]</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \quad / \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$ <p>Isovaleriansäure [Isovalerianat]</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad   \\ \text{HOOC} \quad \quad \text{COOH} \end{array}$ <p>Glutarsäure [Glutarat]</p>	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{HOOC} \quad \text{OH} \end{array}$ <p>Weinsäure [Tartrat]</p>



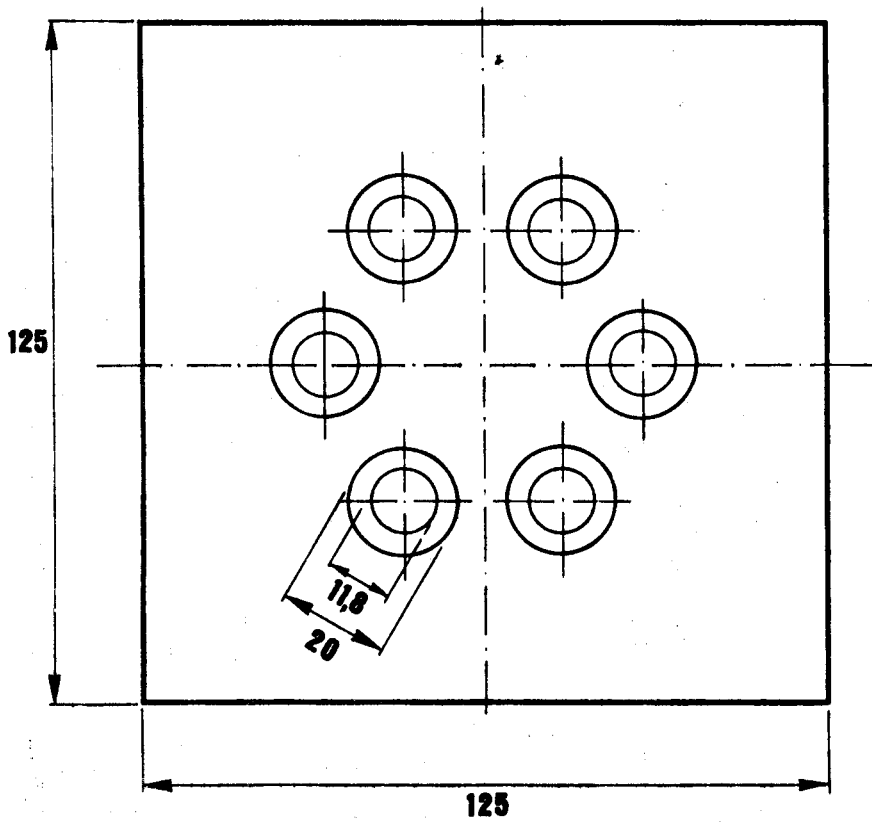
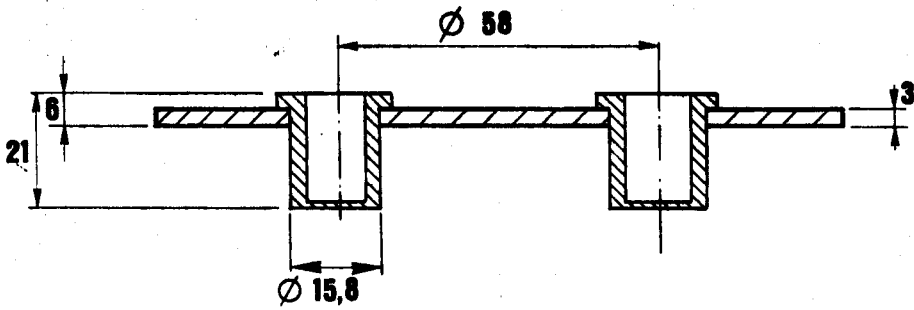
Ultrafiltraat

Serum, na  
dialyse.

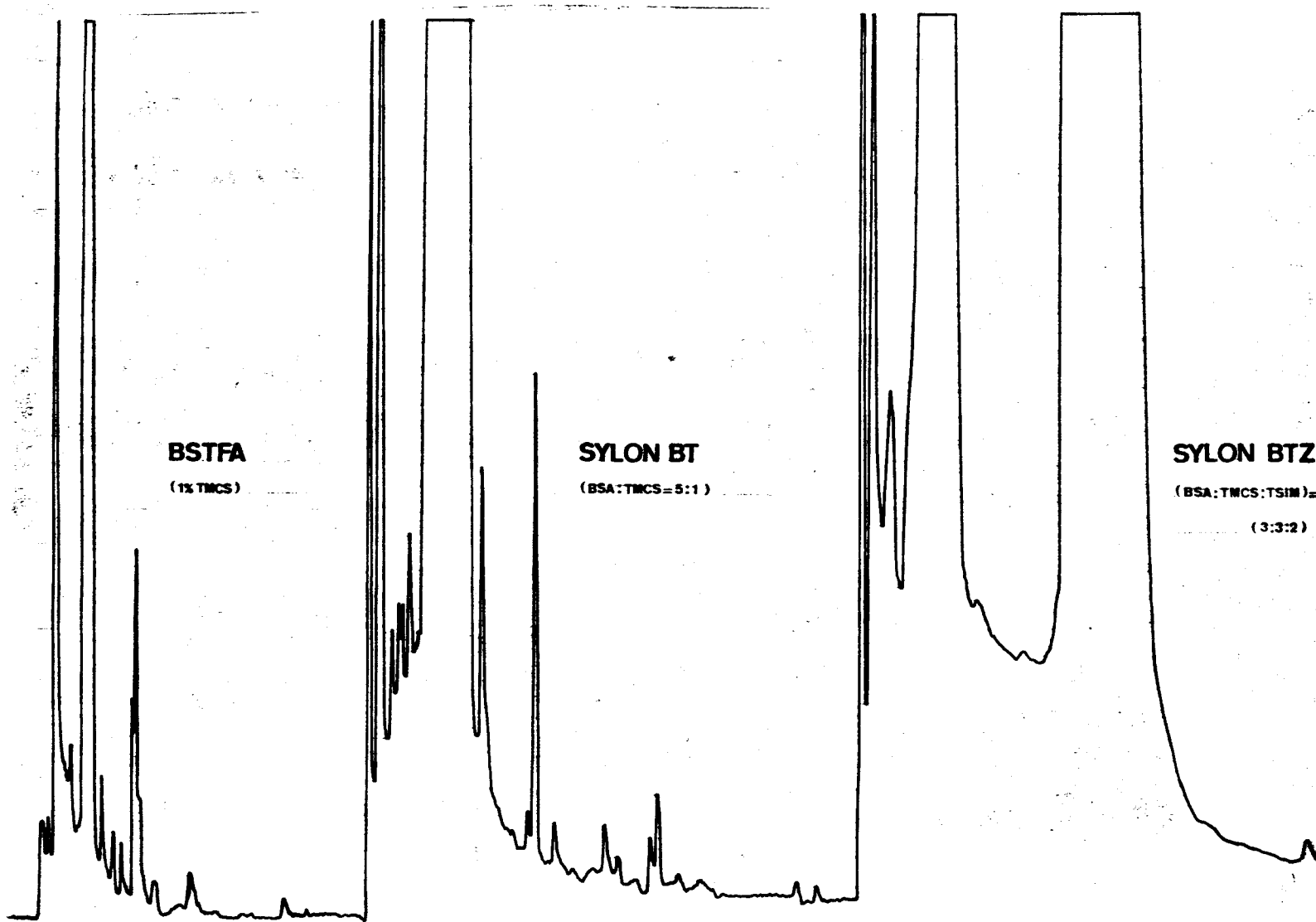
Serum, vóór  
dialyse



standaardanionen-  $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_2\text{OH}/\text{HCl} \\ \text{MES}/\text{TRIS} \end{array} \right.$   
mengsel op het systeem



Gemodificeerde  
vriesdroog koelplaat.



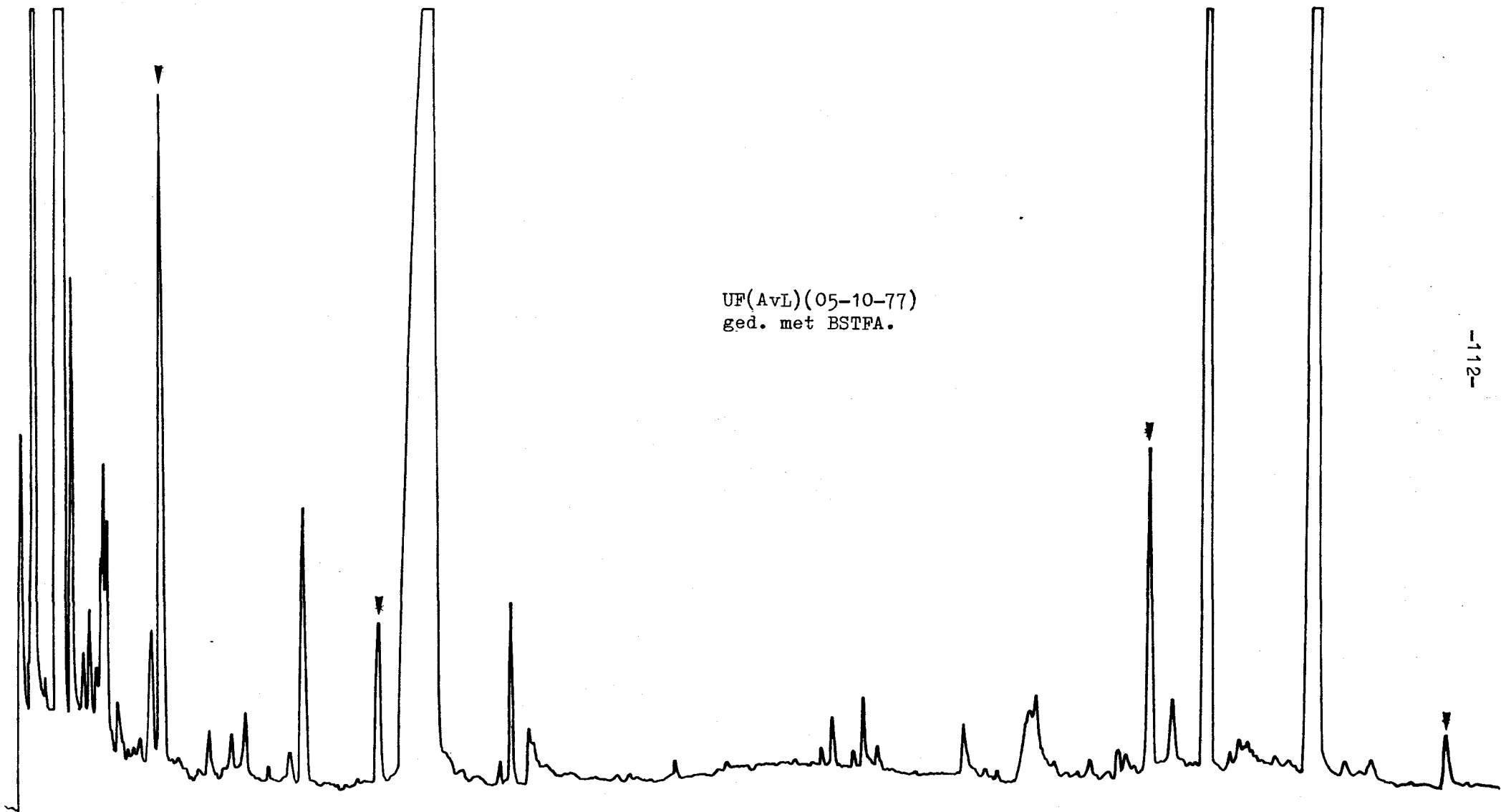
**BSTFA**  
(1% TMCS)

**SYLON BT**  
(BSA:TMCS=5:1)

**SYLON BTZ**  
(BSA:TMCS:TSIM)=  
(3:3:2)

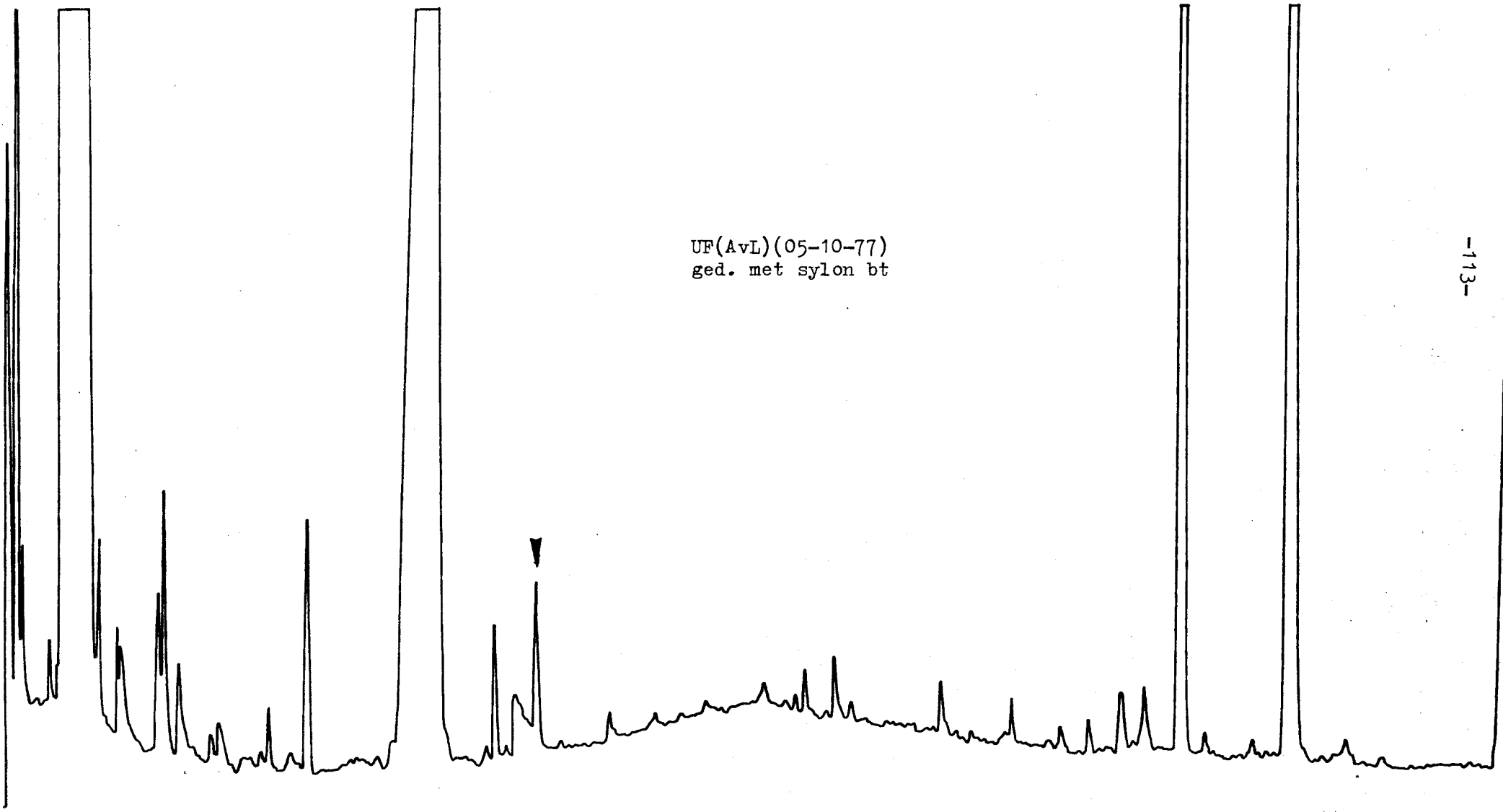
blanko injectie van verschillende  
silylerings-reagentia.



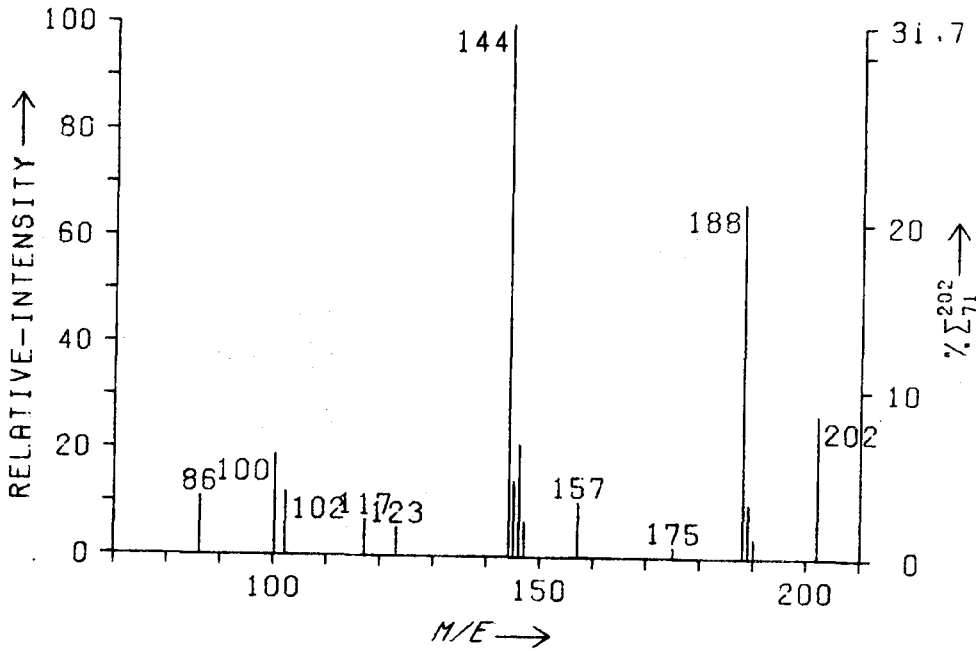


UF(AvL)(05-10-77)  
ged. met BSTFA.

UF(AvL)(05-10-77)  
ged. met sylon bt

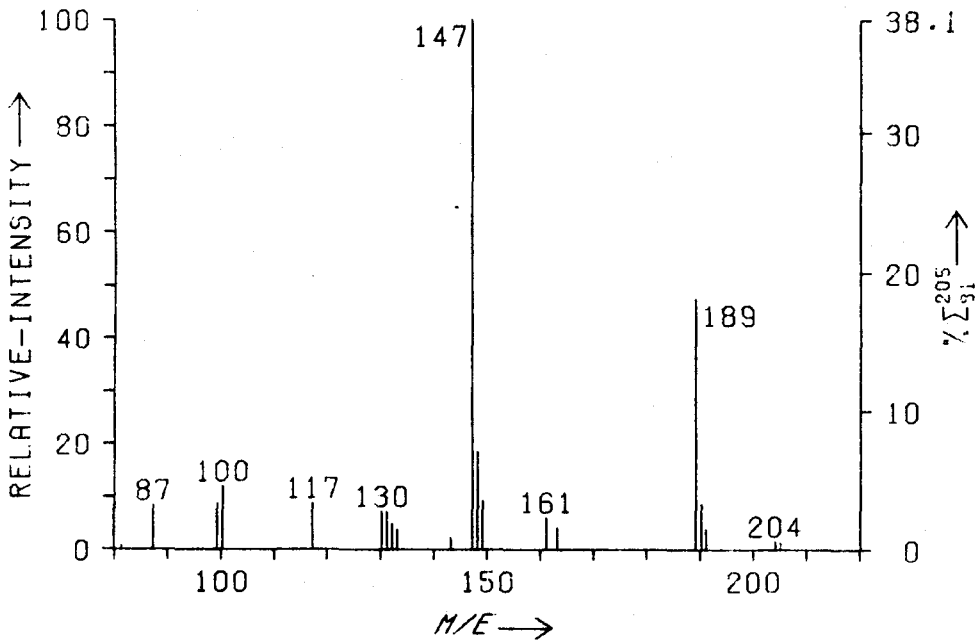


ULTRAFILTRAAT-TMS, AR.K, PIEK 2



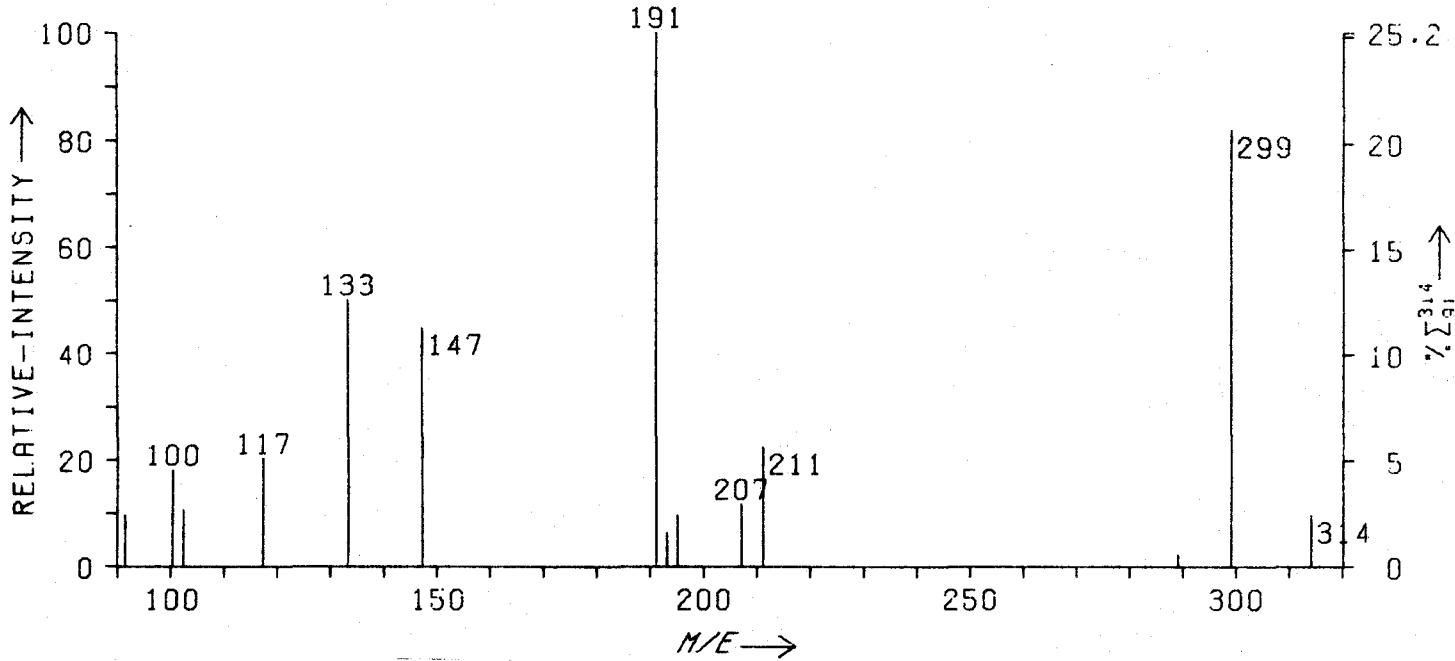
FIN 4000. MODE: EI . EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA. SCANS: 1 SEC/SCAN  
SOURCE TEMP.: 250 . PROBETEMP.: -  
INLET: GC. INLET CONDIT.: SE-30. 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

ULTRAFILTRAAT-TMS, AR.K, PIEK 3



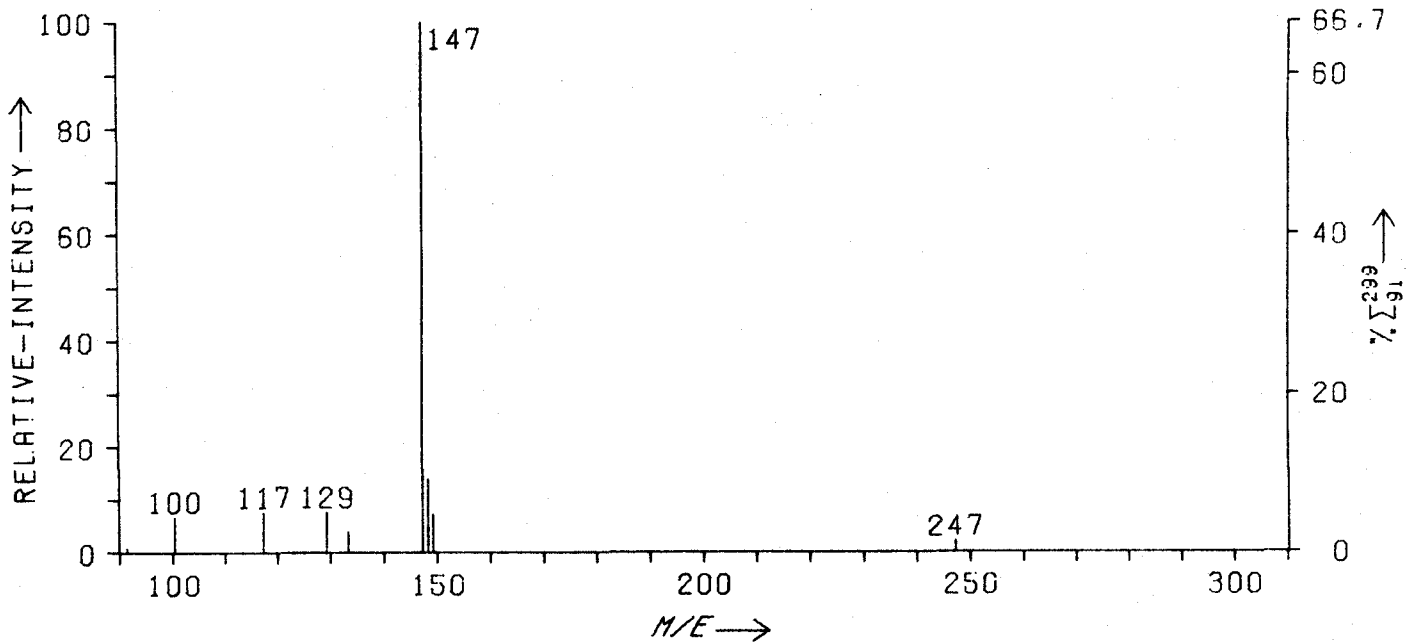
FIN 4000. MODE: EI . EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA. SCANS: 1 SEC/SCAN  
SOURCE TEMP.: 250 . PROBETEMP.: -  
INLET: GC. INLET CONDIT.: SE-30. 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

ULTRAFILTRAAT-TMS, AR.K, PIEK 4

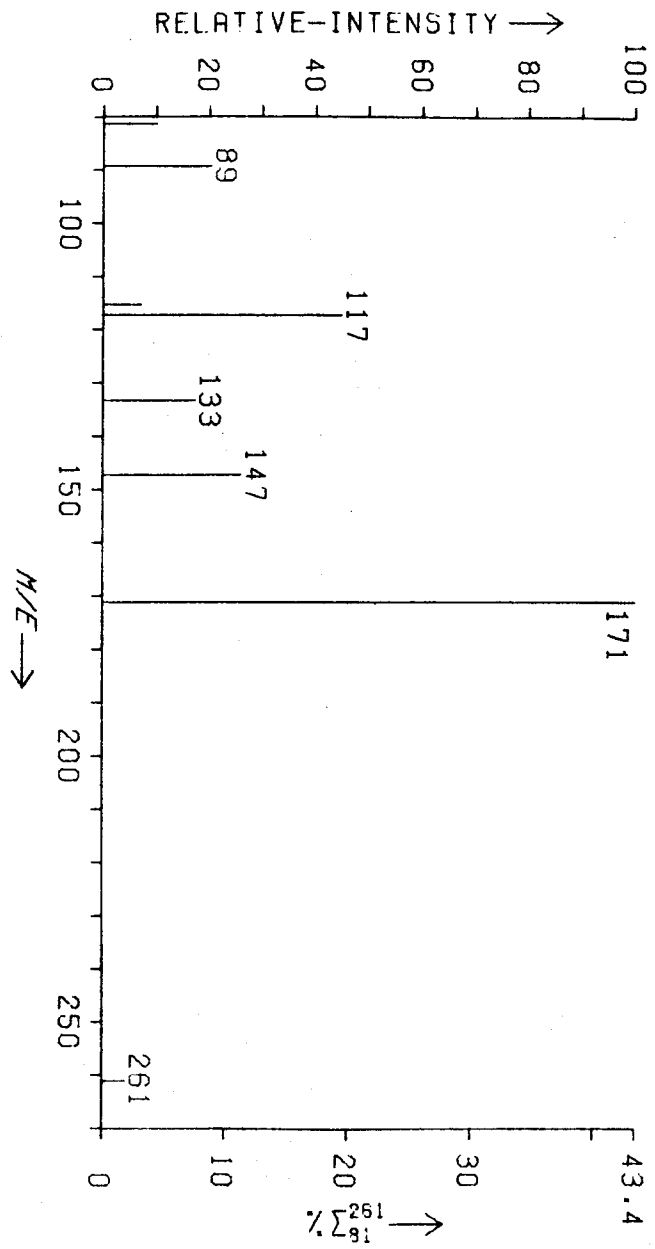


FIN 4000, MODE: EI, EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCETEMP.: 250, PROBETEMP.: -  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

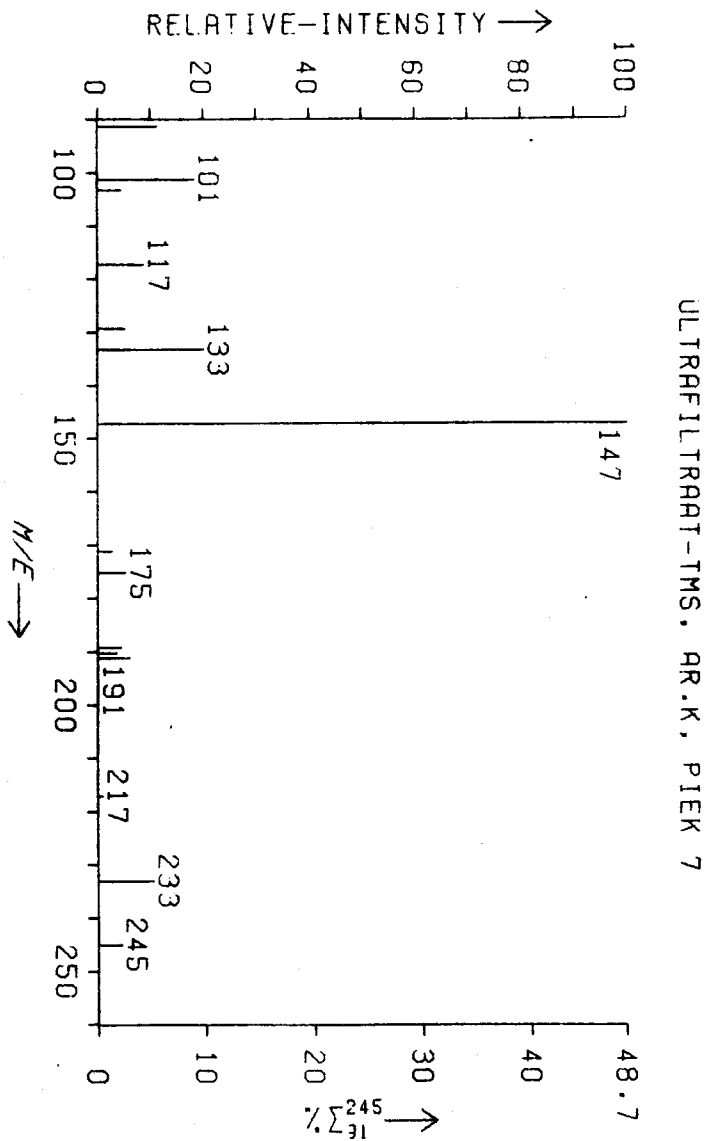
ULTRAFILTRAAT-TMS, AR.K, PIEK 5



FIN 4000, MODE: EI, EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCETEMP.: 250, PROBETEMP.: -  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

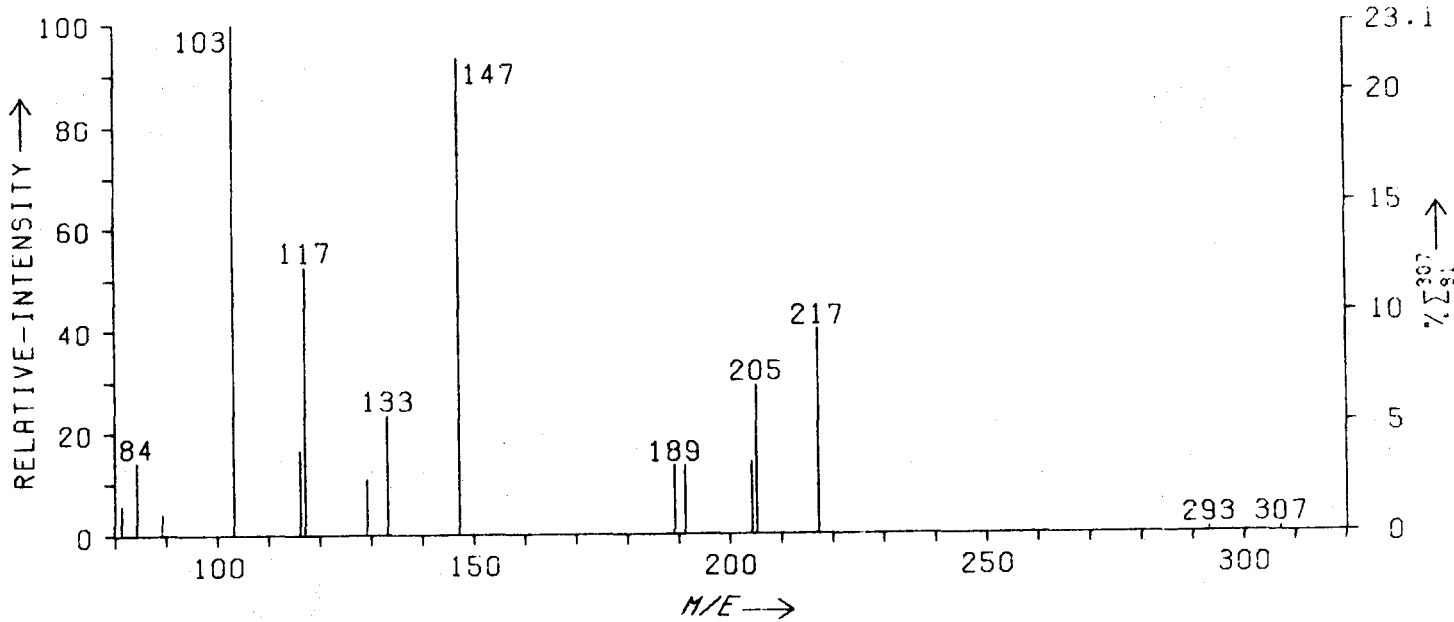


FIN 4000, MODE: EI , EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCETEMP.: 250 , PROBETEMP.: -  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316



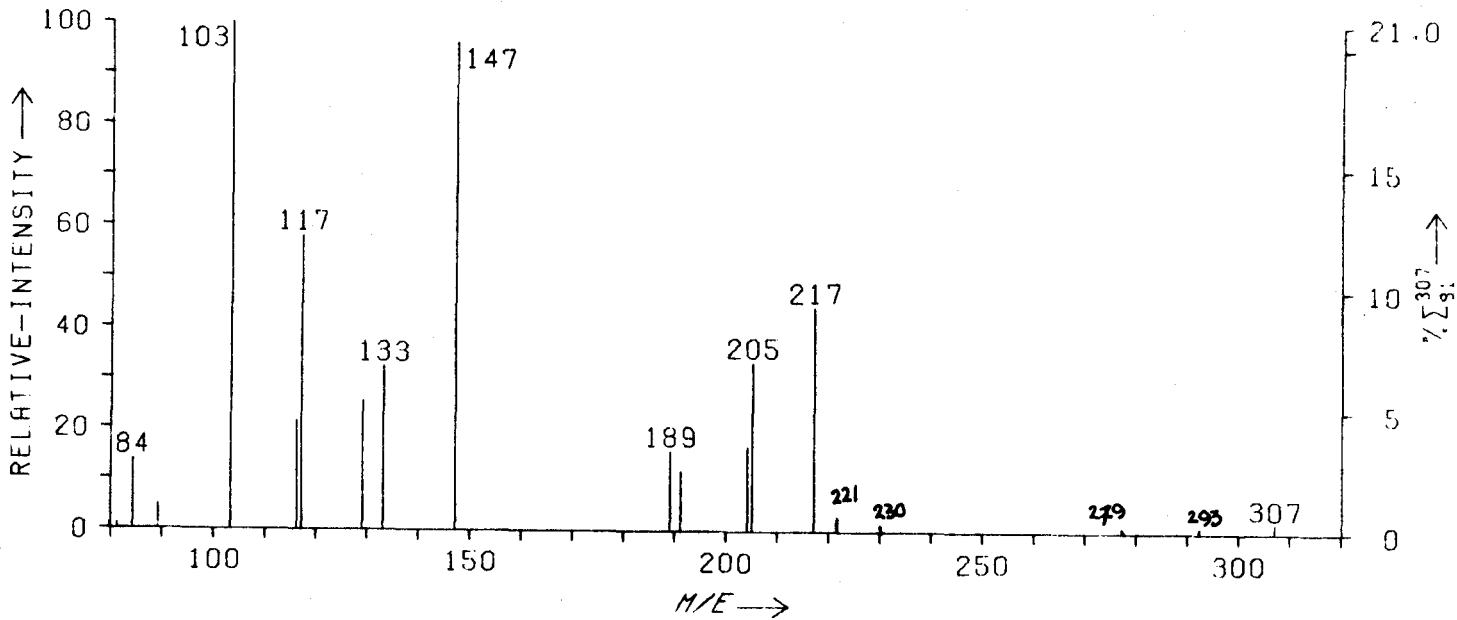
FIN 4000, MODE: EI , EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCETEMP.: 250 , PROBETEMP.: -  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

ULTRAFILTRAAT-TMS, AR.K, PIEK 8



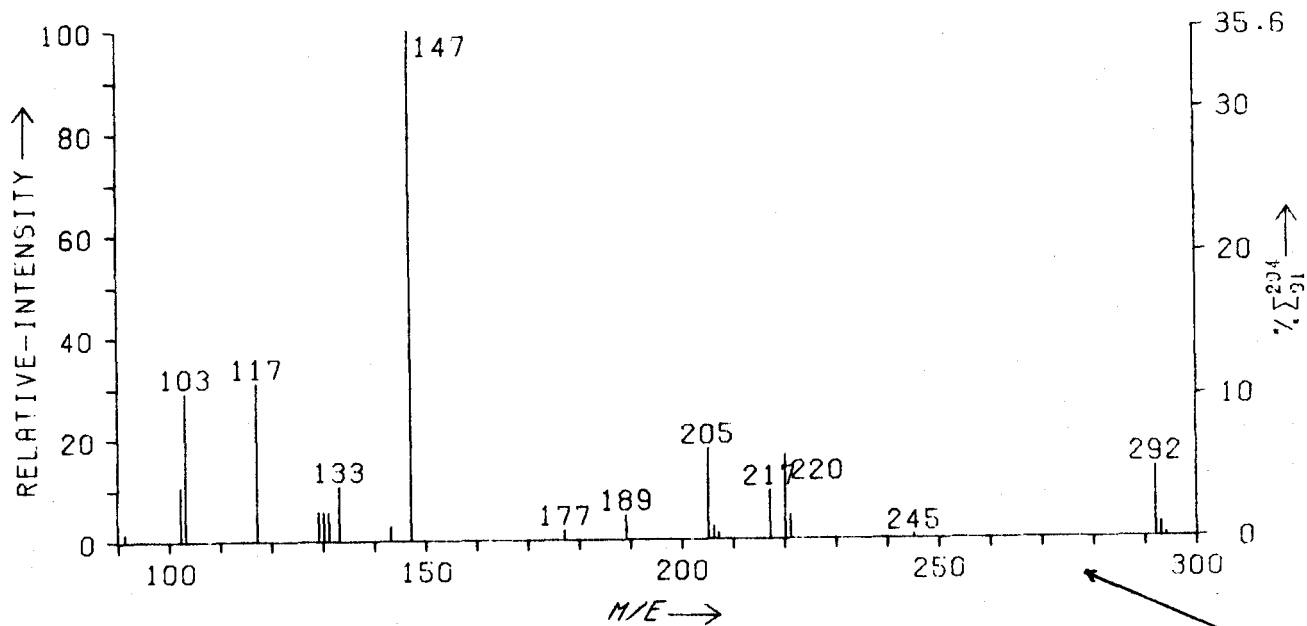
FIN 4000, MODE: EI, EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCETEMP.: 250, PROBETEMP.: -  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

ULTRAFILTRAAT-TMS, AR.K, PIEK 9



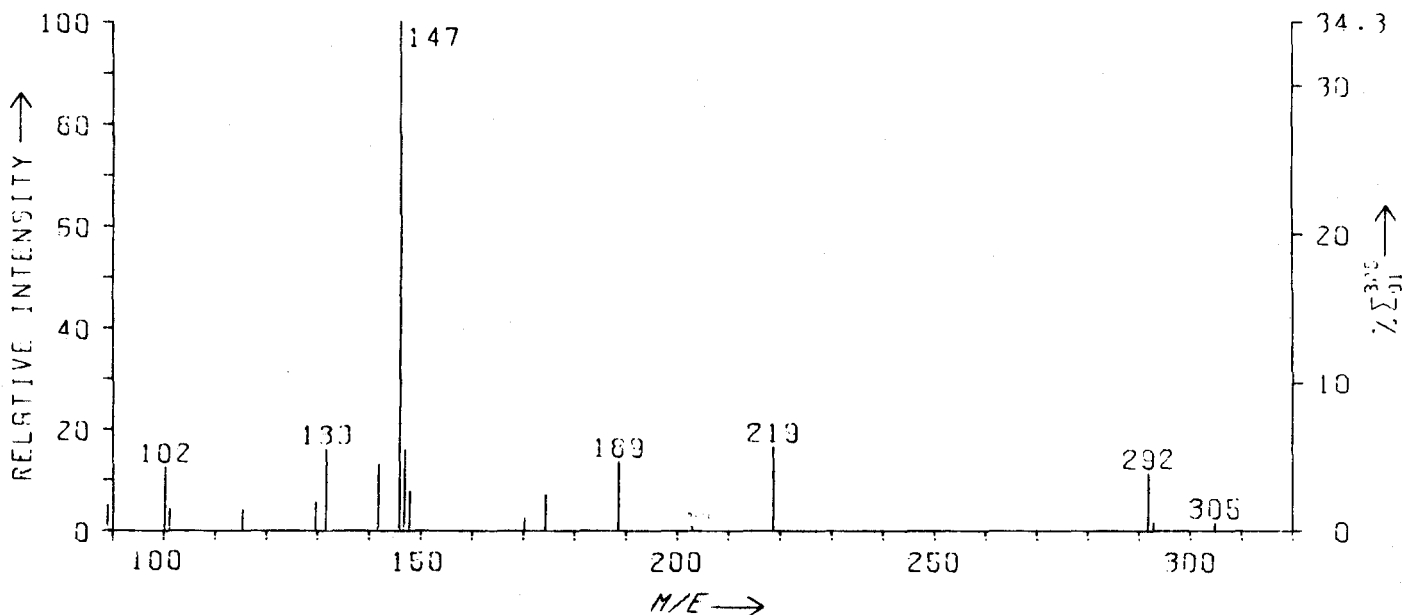
FIN 4000, MODE: EI, EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCETEMP.: 250, PROBETEMP.: -  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

ULTRAFILTRAAT-TMS. AR.K. PIEK 10

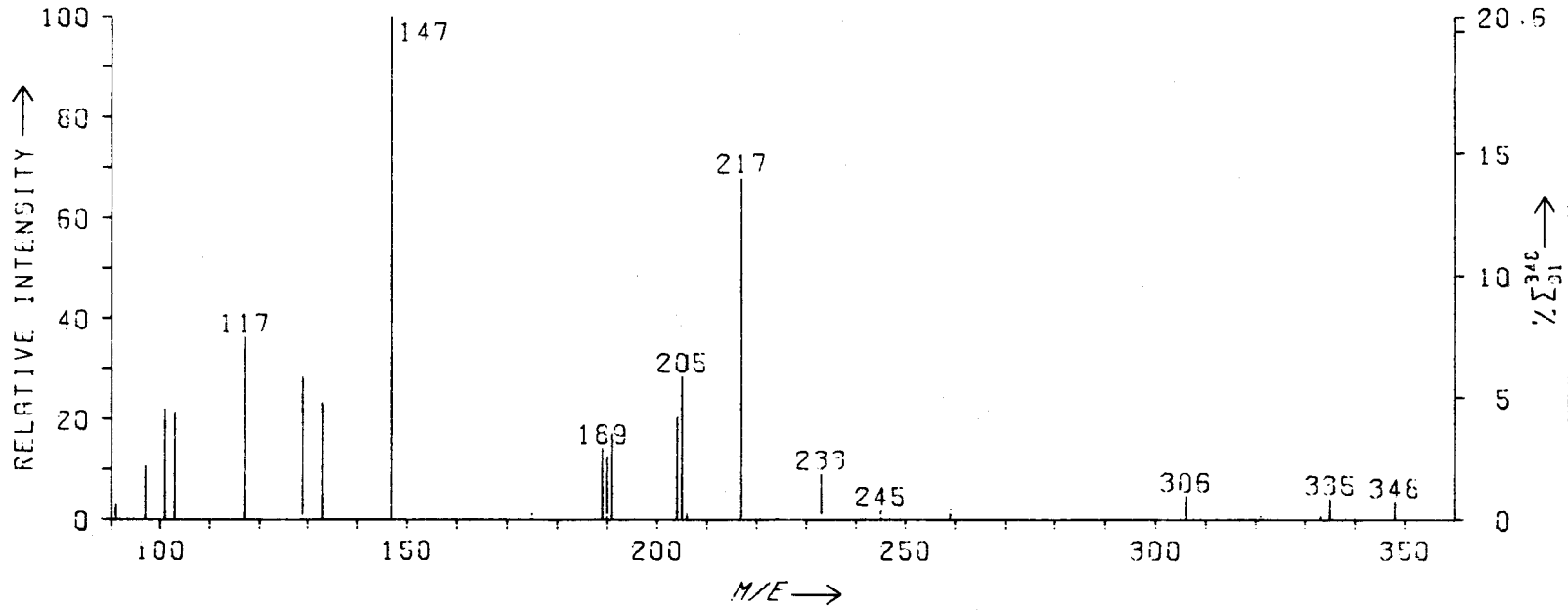


FIN 4000, MODE: EI, EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCE TEMP.: 250, PROBETEMP.: -  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780316

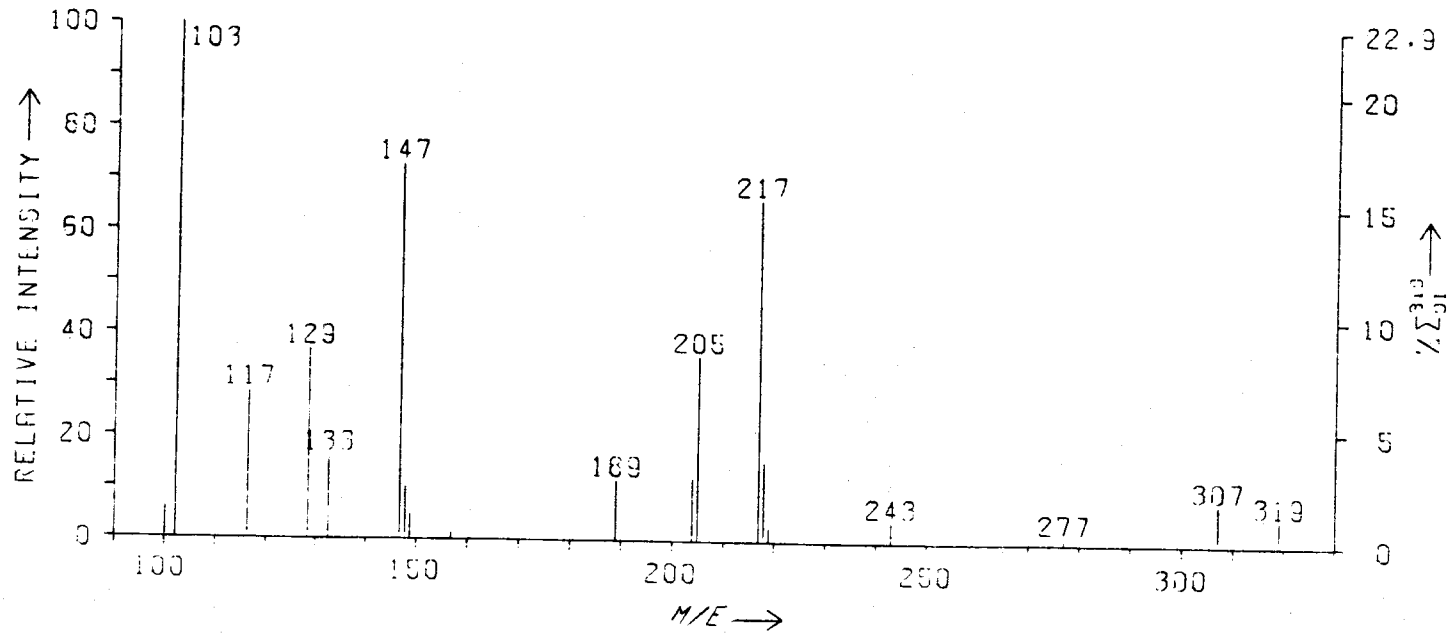
ULTRAFILTRAAT-TMS. AR.K. PIEK 12



ULTRAFILTRAT-TMS. AR.K. PEK 13



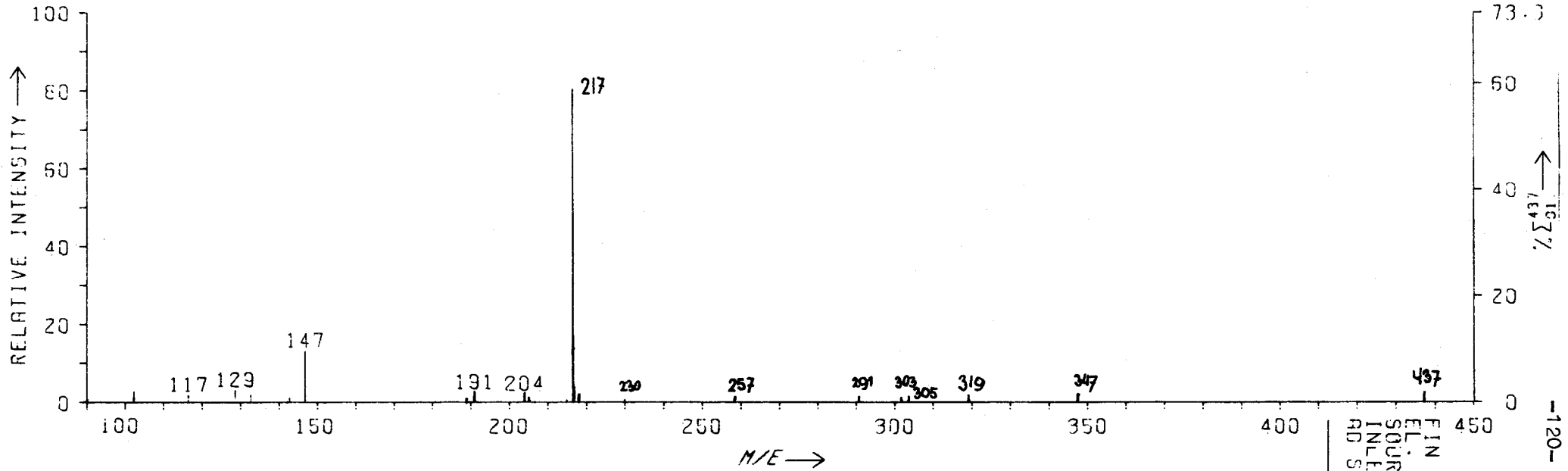
ULTRAFILTRAT-TMS. AR.K. PEK 14



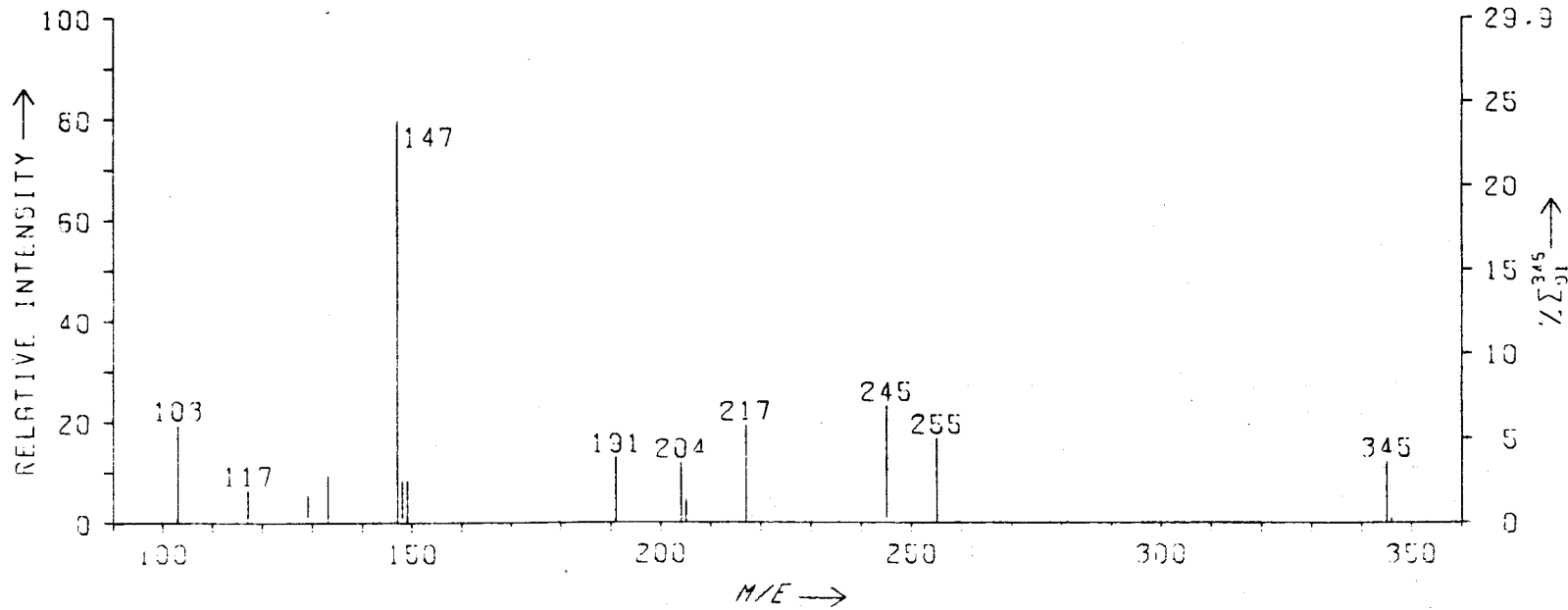
FIN 4000, MODE: EI, EL: EN, 70 EV  
 EL: CURR.: 0.2 MA, SCANS/SEC: 1 SEC/SCRN  
 SOURCE TEMP.: 250, PROBE TEMP.:  
 INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
 AD SCHMIDT - 780315



ULTRAFILTRAT-TMS, AR.K, PIEK 15

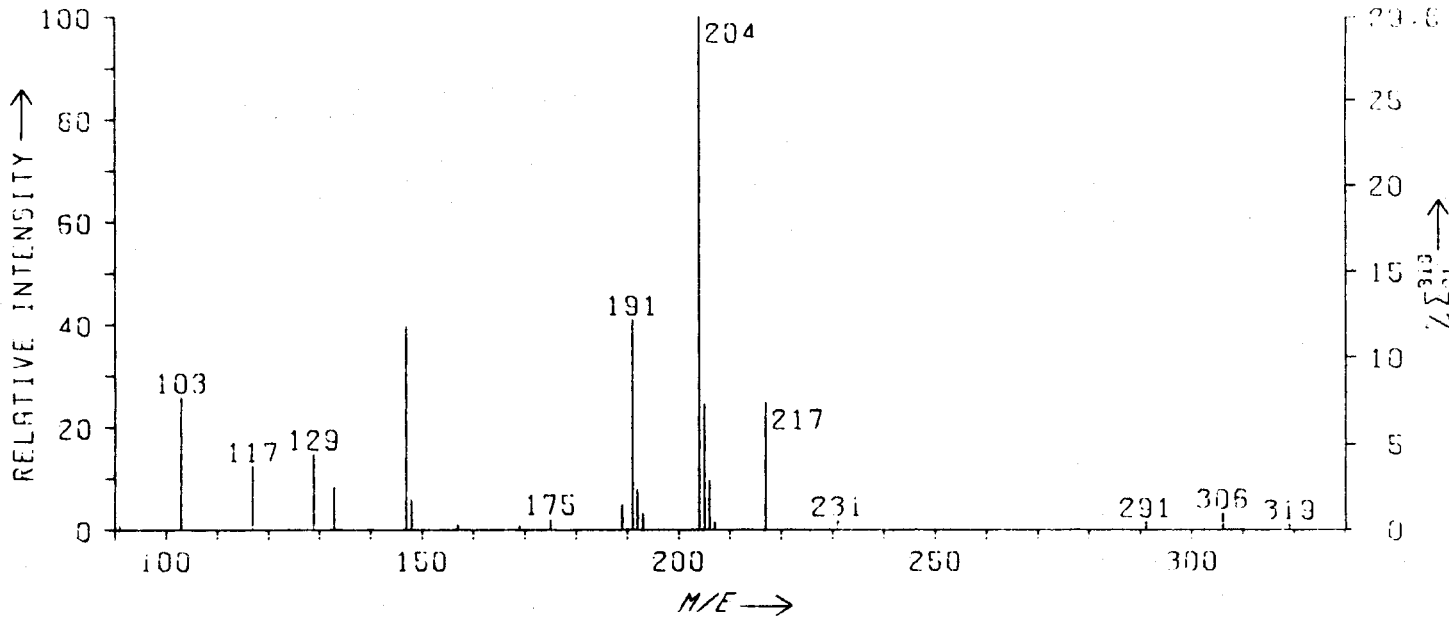


ULTRAFILTRAT-TMS, AR.K, PIEK 17

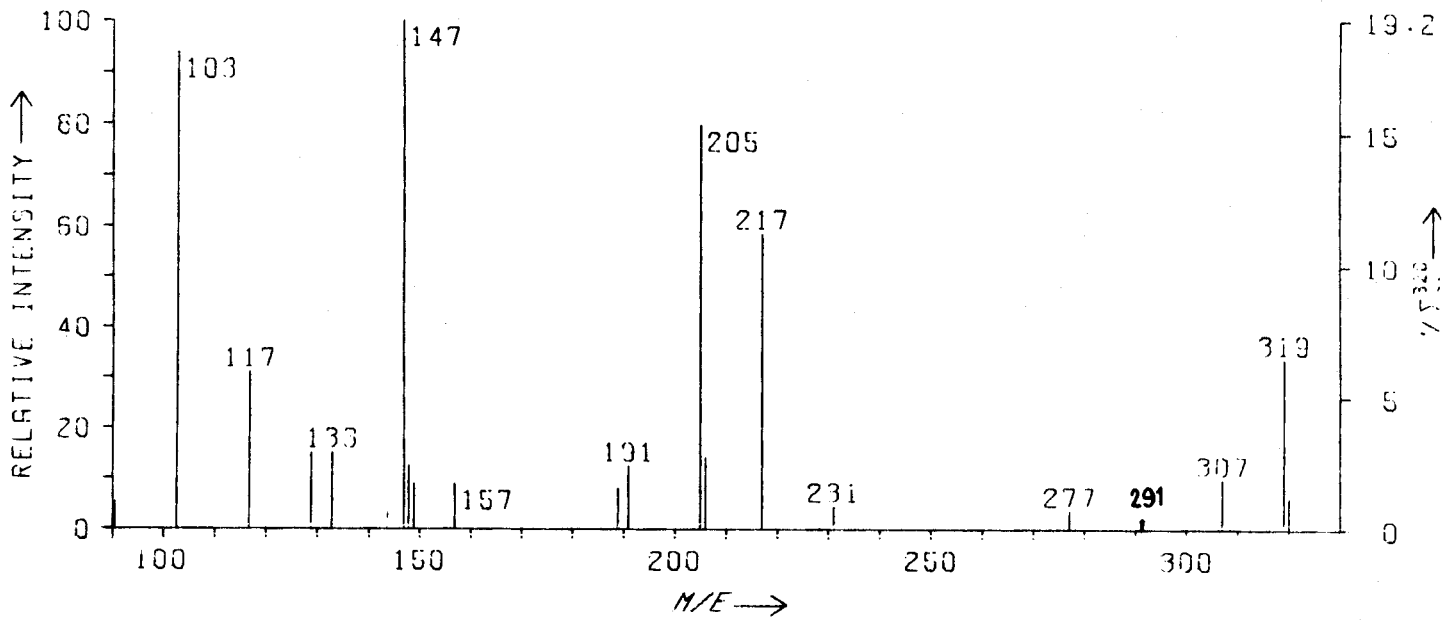


FIN 4000, MODE: EI ; EL: EN. 70 EV  
 EL CURR.: 0.2 MA, SCANS/SEC: 1 SEC/SCAN  
 SOURCE TEMP.: 250, PROBE TEMP.:  
 INLET: GC, INLET CONDIT.: SL-30, 10 CC/MIN  
 RD SCHOOIS - 780316

ULTRAFILTRAT-TMS. AR.K. PEAK 16

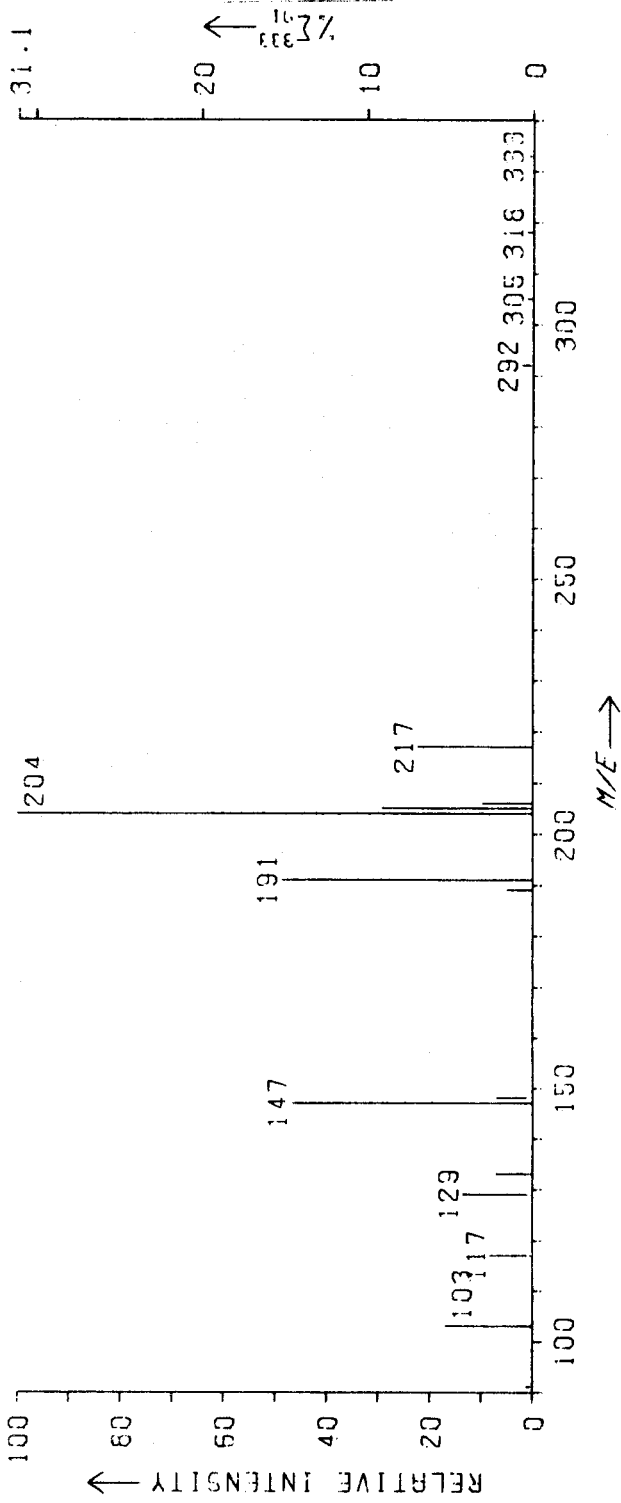


ULTRAFILTRAT-TMS. AR.K. PEAK 20

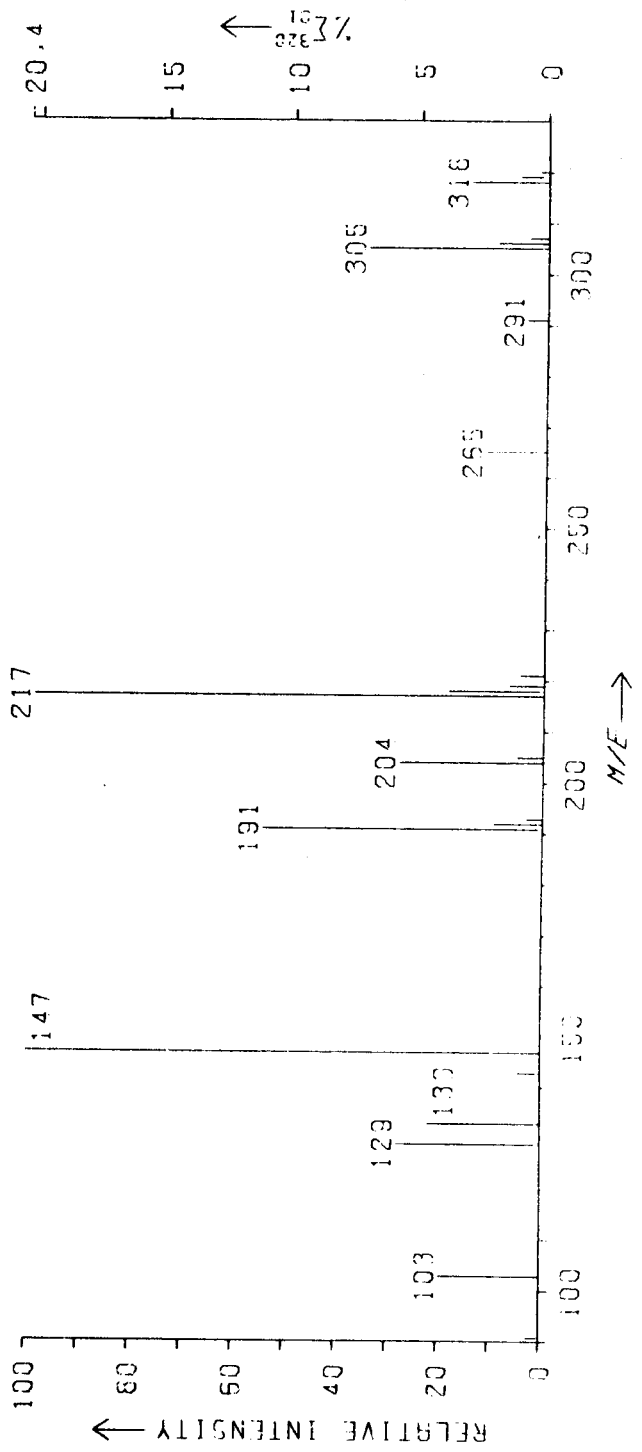


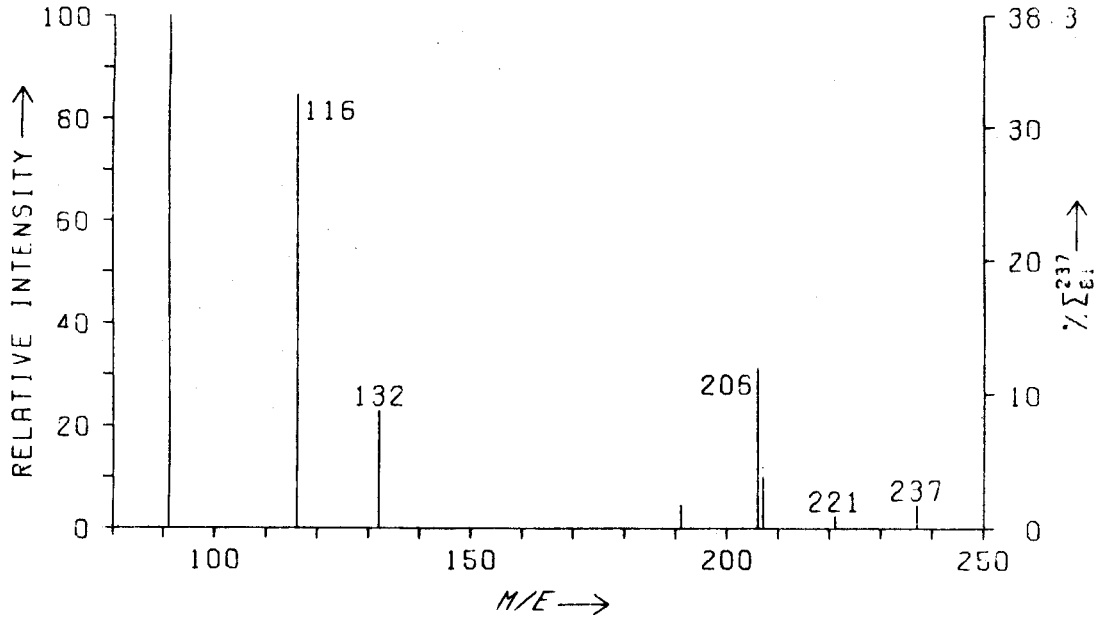
FIN 4000, MODE: E1, EL. EN.: 70 EV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCE TEMP.: 250, PROBETEMP.:  
INLET: GC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN  
AD SCHOOTS - 780315

ULTRAFILTRAT-TMS. GR.K. PICK 21

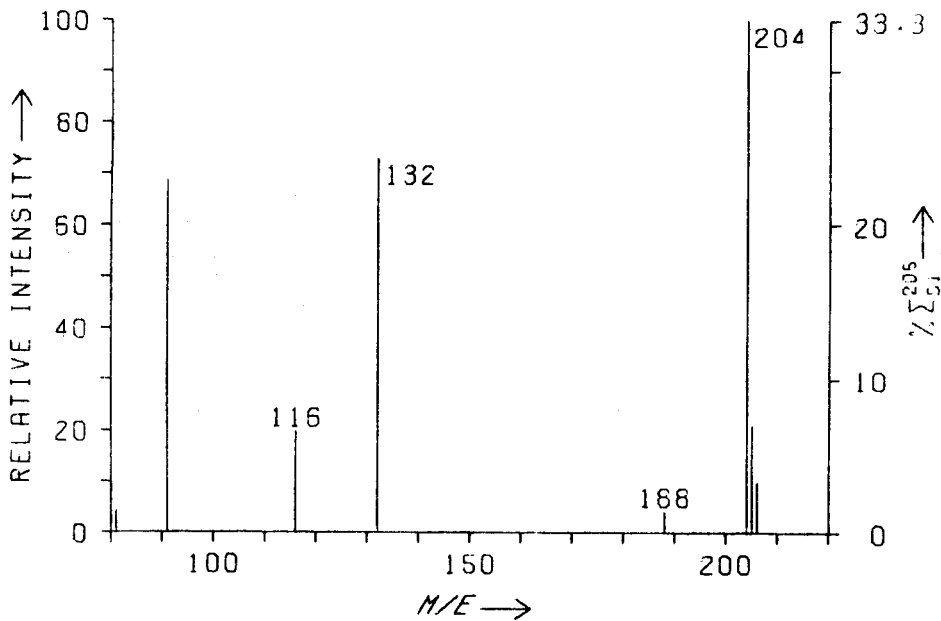


ULTRAFILTRAT-TMS. GR.K. PICK 23

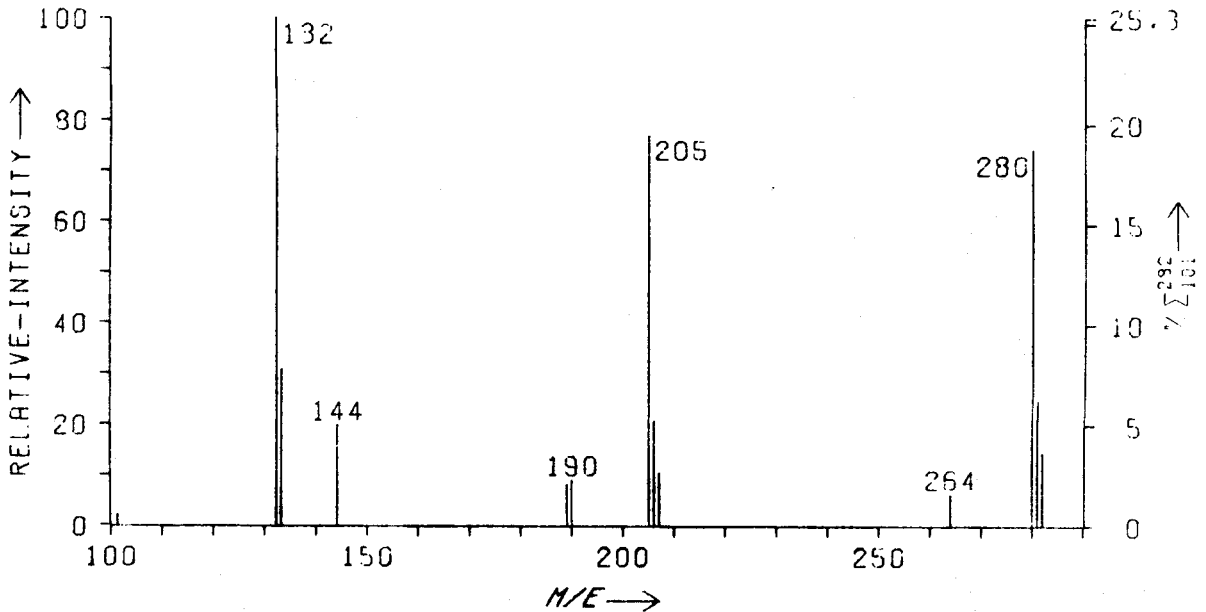




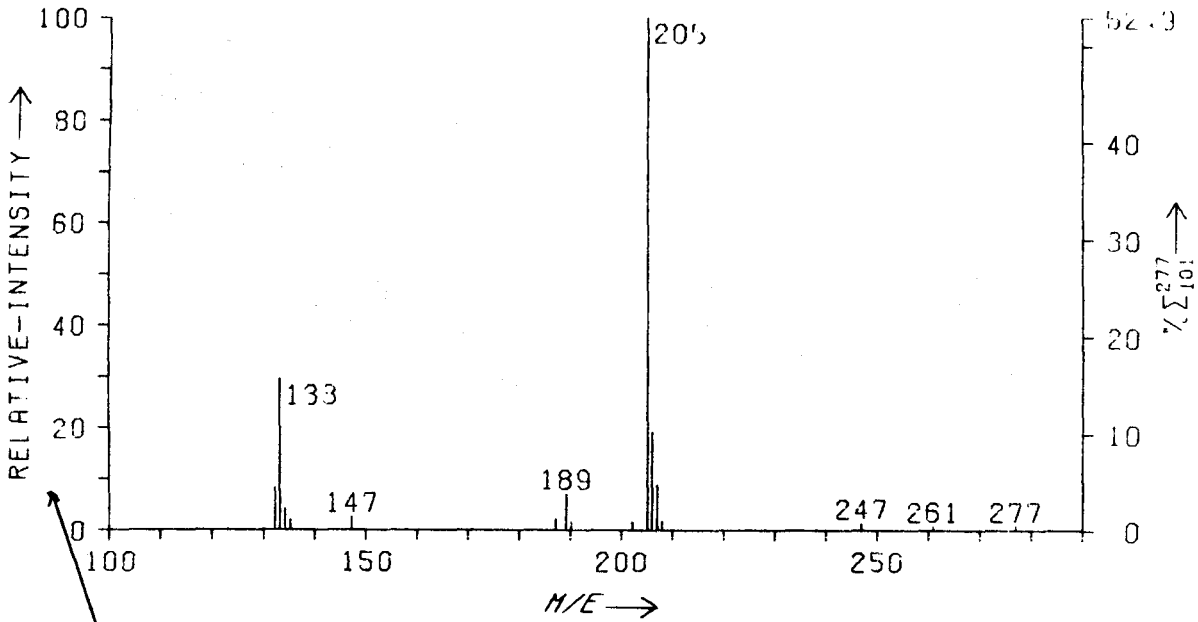
ULTRAFILTRAAT-TMS. BW. PIEK 9



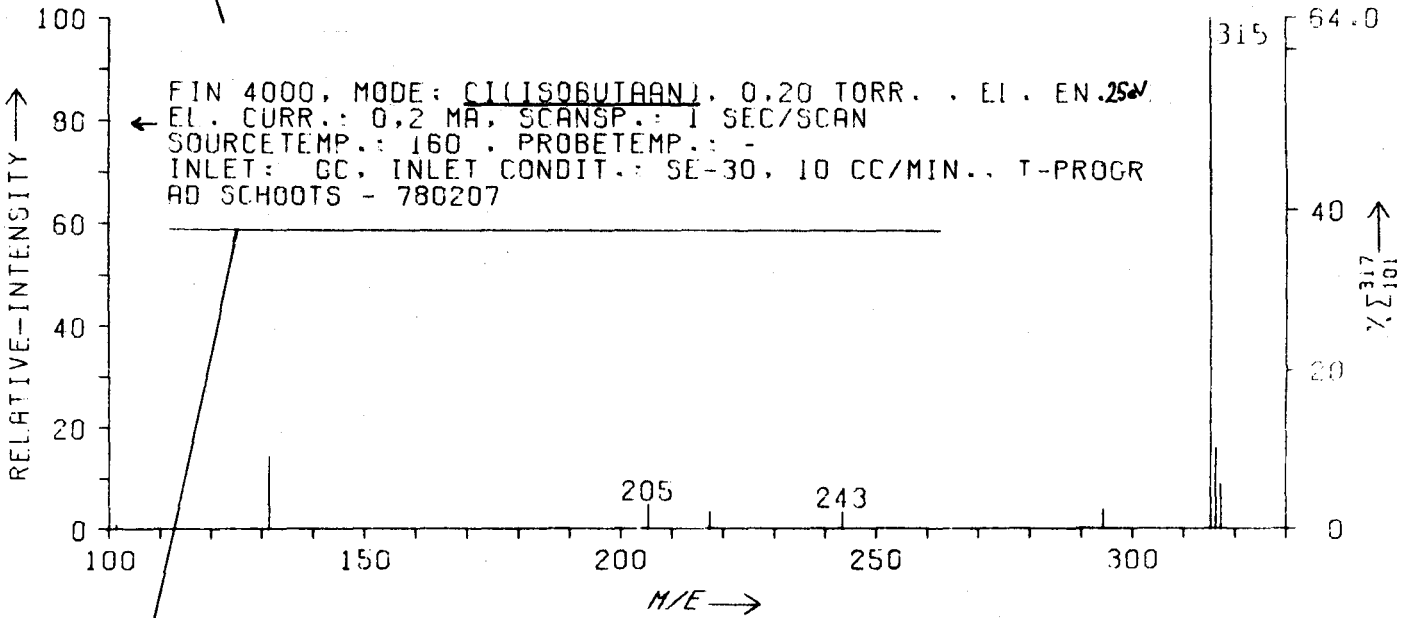
ULTRAFILTRAAT-TMS. BW. PIEK 10



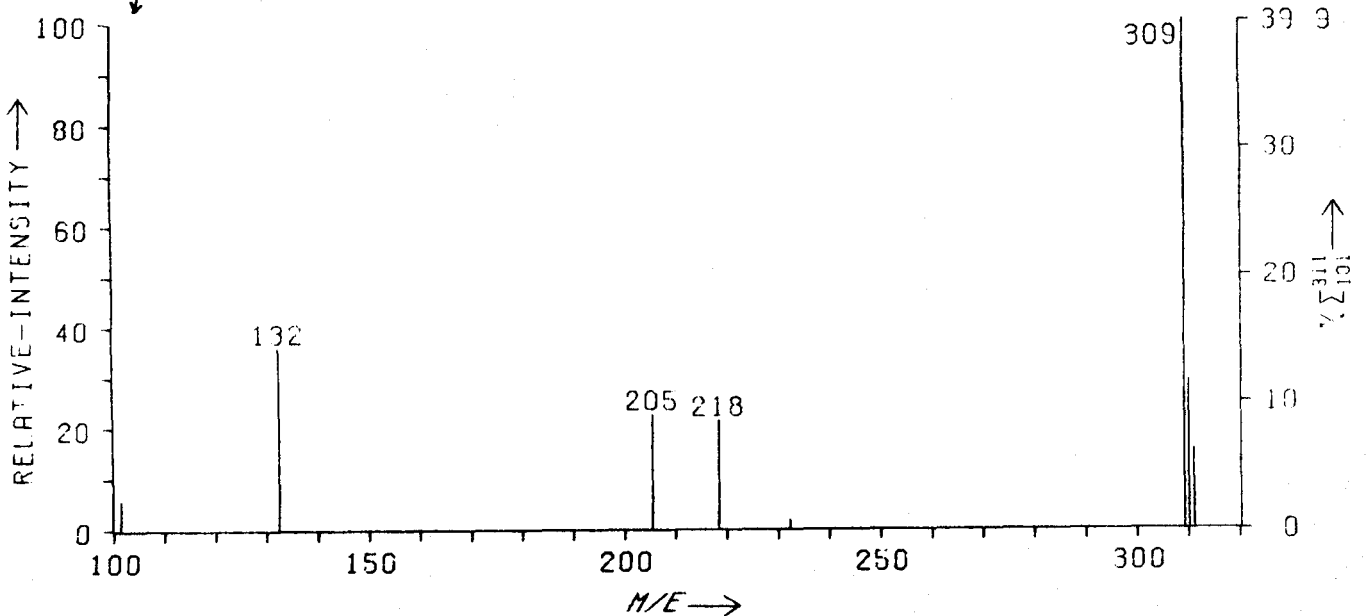
MOLWT. 4000. MODE: C1 (ISOBUTAN) 0.20 TORR. EL. EN.: 25EV  
 FIN. CURR.: 0.2 MA. SCANS/SEC: 1 SEC/SCAN  
 SOURCE TEMP.: 150. PROBETEMP.:  
 INLET: CC. INLET CONDIT.: SE-30. 10 CC/MIN., T-PROCR.  
 AD SCHROETS - 789207

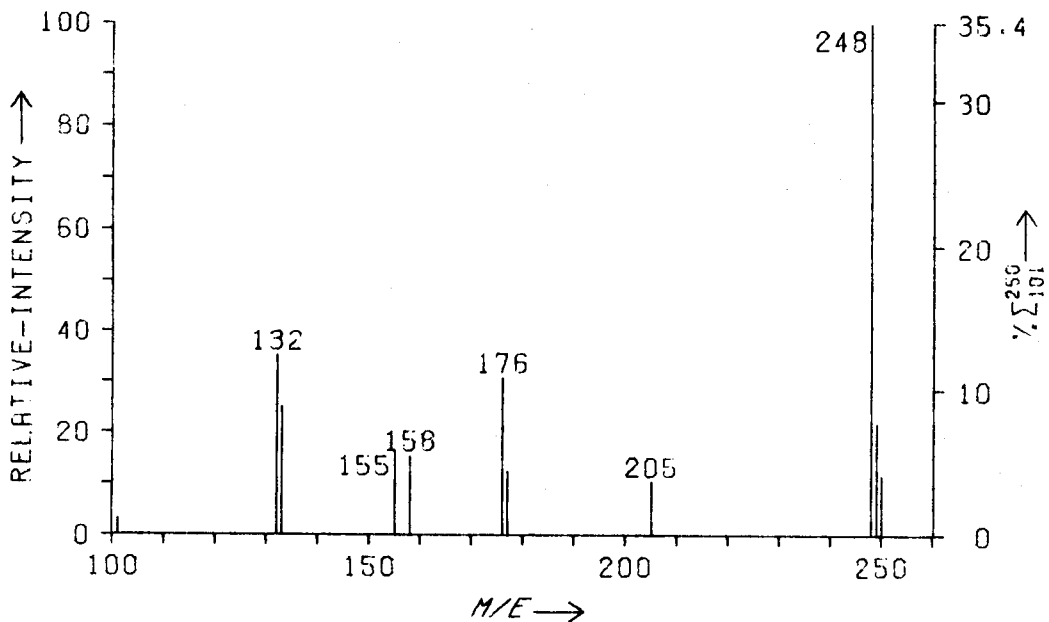


ULTRAFILTRAAT-TMS. BW. PIEK 13 (CI)

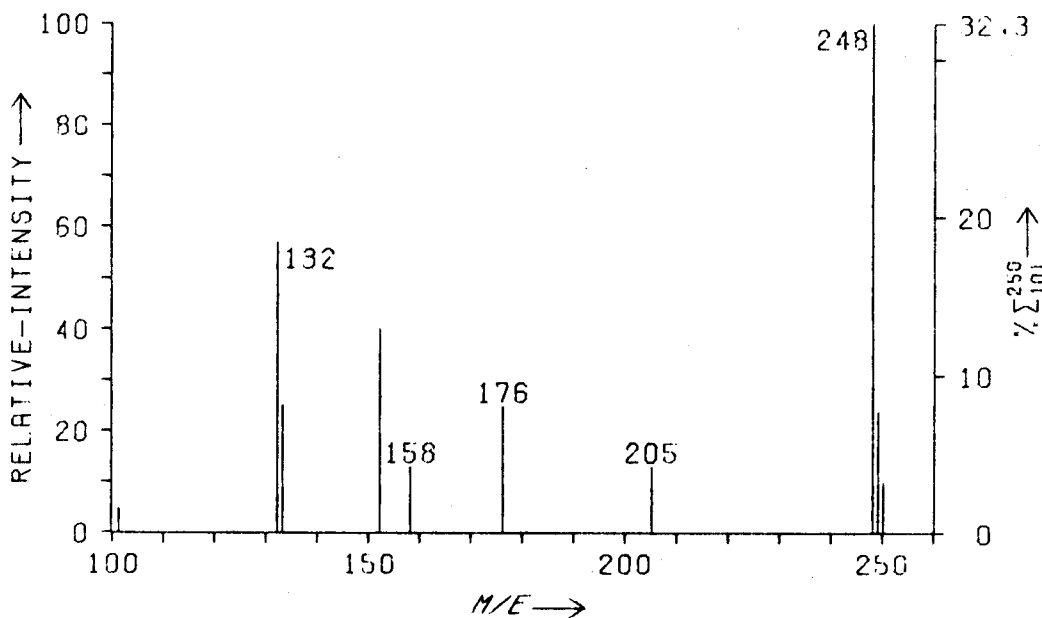


ULTRAFILTRAAT-TMS. BW. PIEK 14 (CI)

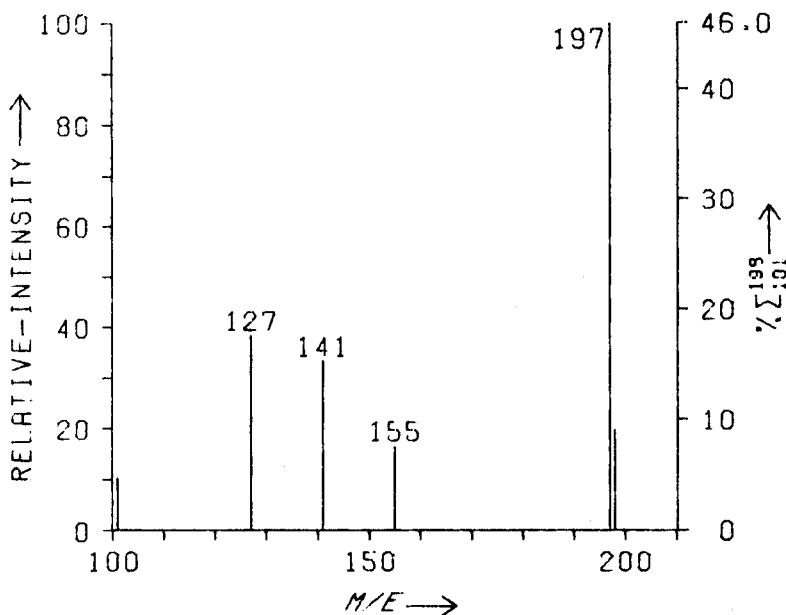




ULTRAFILTRAAT-TMS, BW, PIEK 16

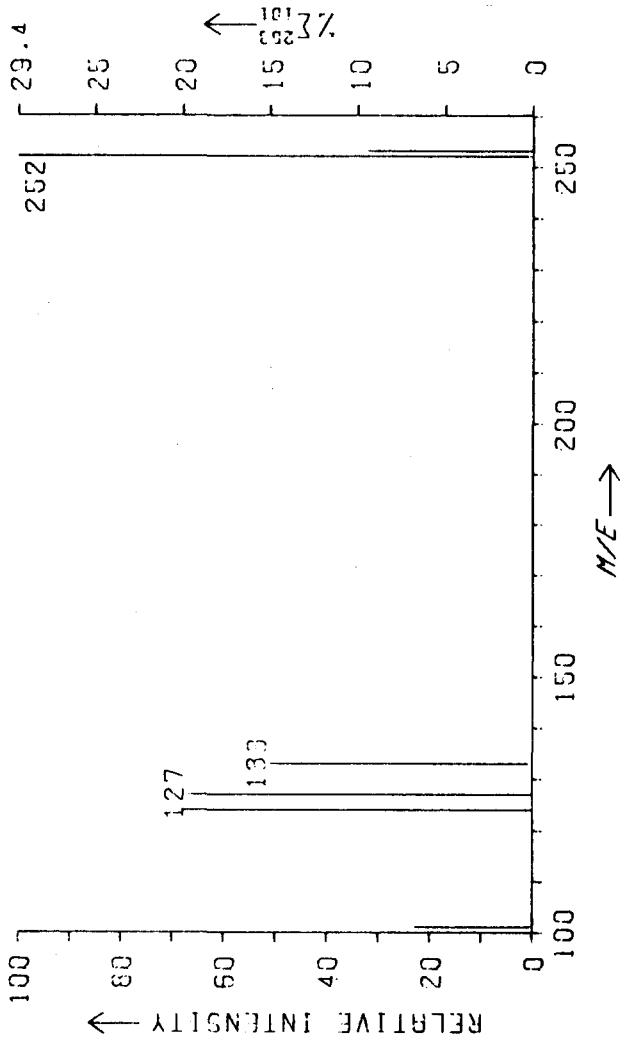


ULTRAFILTRAAT-TMS, BW, PIEK 17

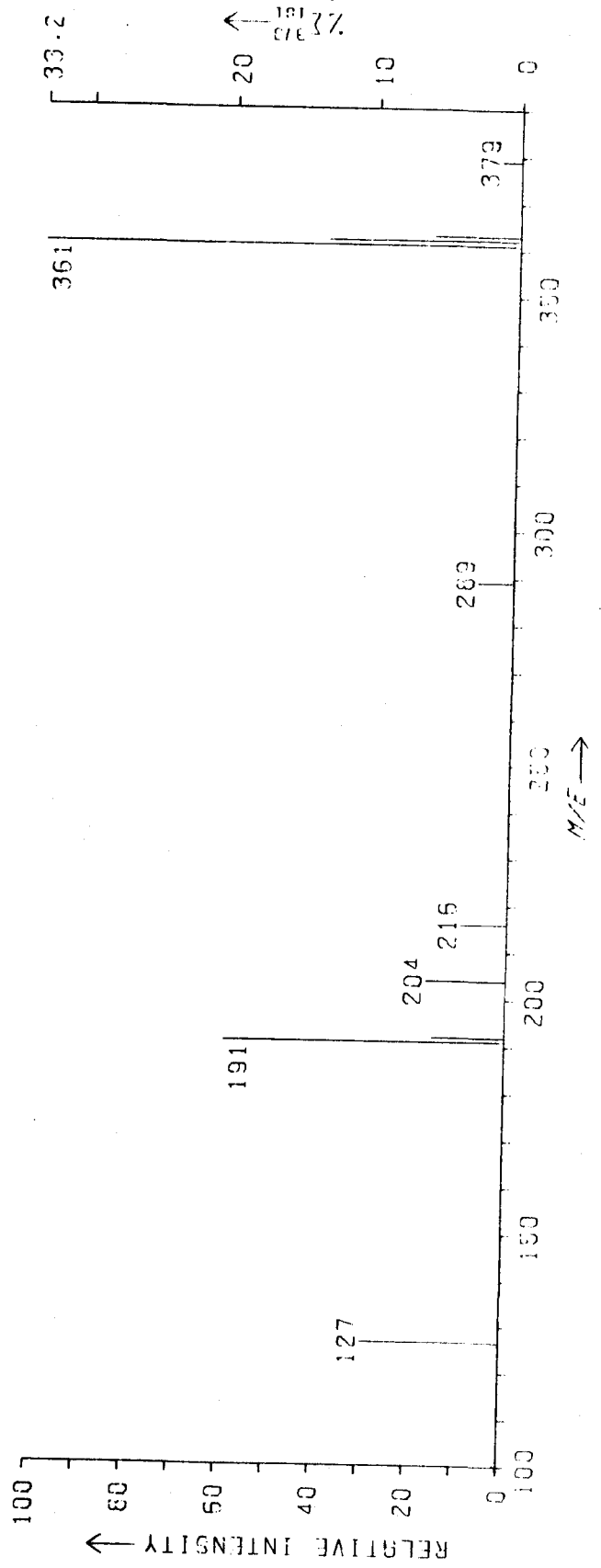


FIN 4000, MODE: CI (ISOBUTAN) 0.20 TORR, EL. EN.: 25  
 EL. CURR.: 0.2 MA, SCANS/SEC: 1 SEC/SCAN  
 SOURCE TEMP.: 150, PROB. TEMP.:  
 INLET: CC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN., T-PROGR.  
 AD SCHOOTS - 780207

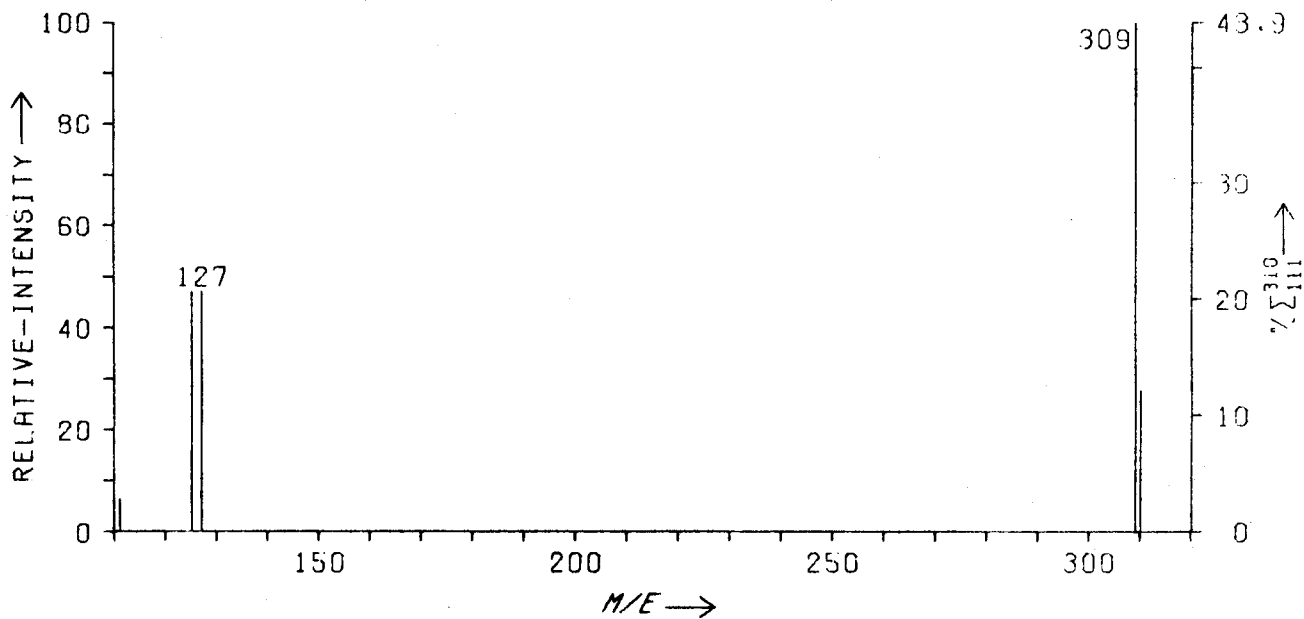
ULTRAFILTRAT-TMS. BW, PIEK 18



ULTRAFILTRAT-TMS. BW, PIEK 19



ULTRAFILTRAAT-TMS, BW, PIEK 23



FIN 4000, MODE: CI (ISOBUTAAN) 0.20 TORR. , EL. EN.: 25 eV  
EL. CURR.: 0.2 MA, SCANSP.: 1 SEC/SCAN  
SOURCETEMP.: 160 , PROBETEMP.: -  
INLET: CC, INLET CONDIT.: SE-30, 10 CC/MIN., T-PROCR.  
AD SCHOOTS - 780207

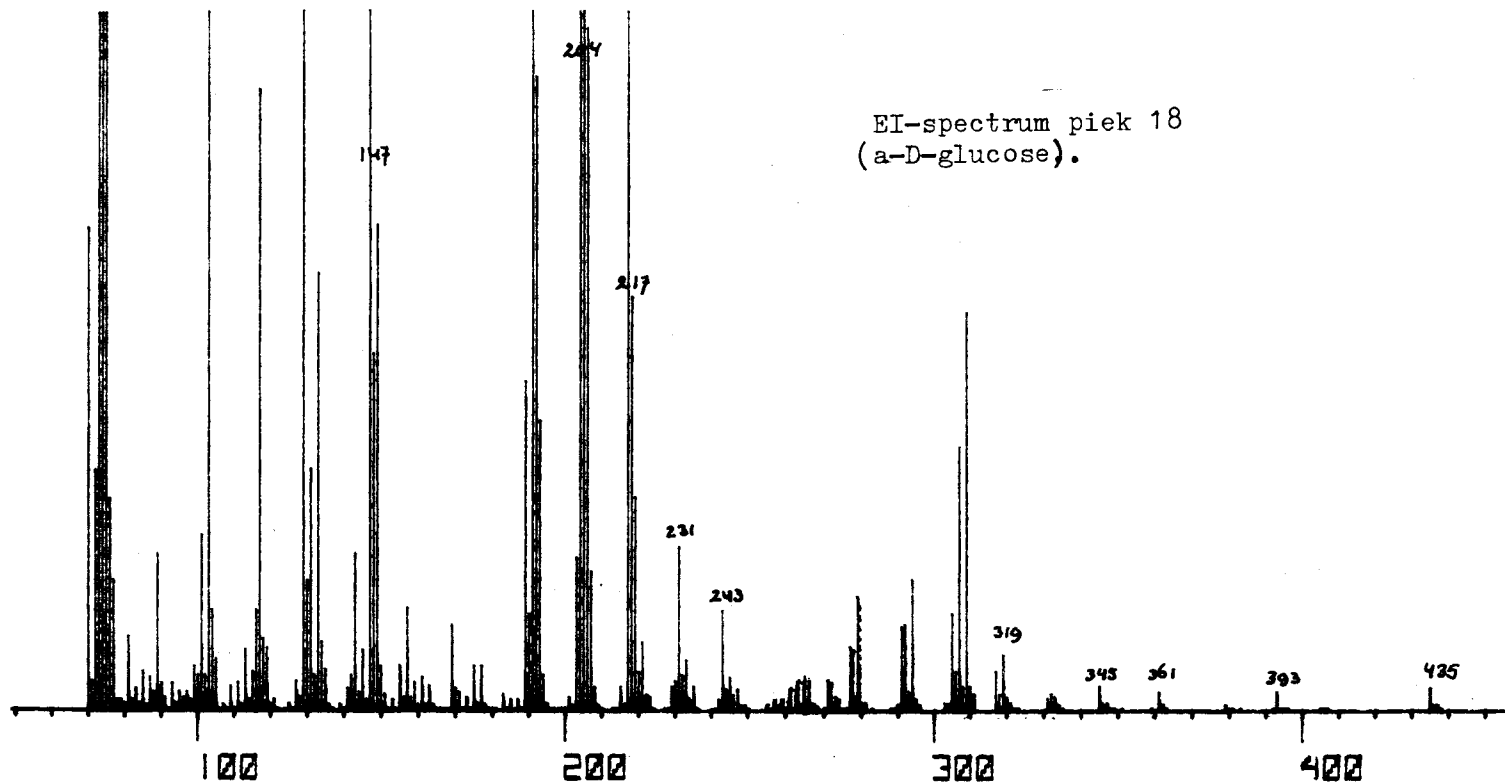
---



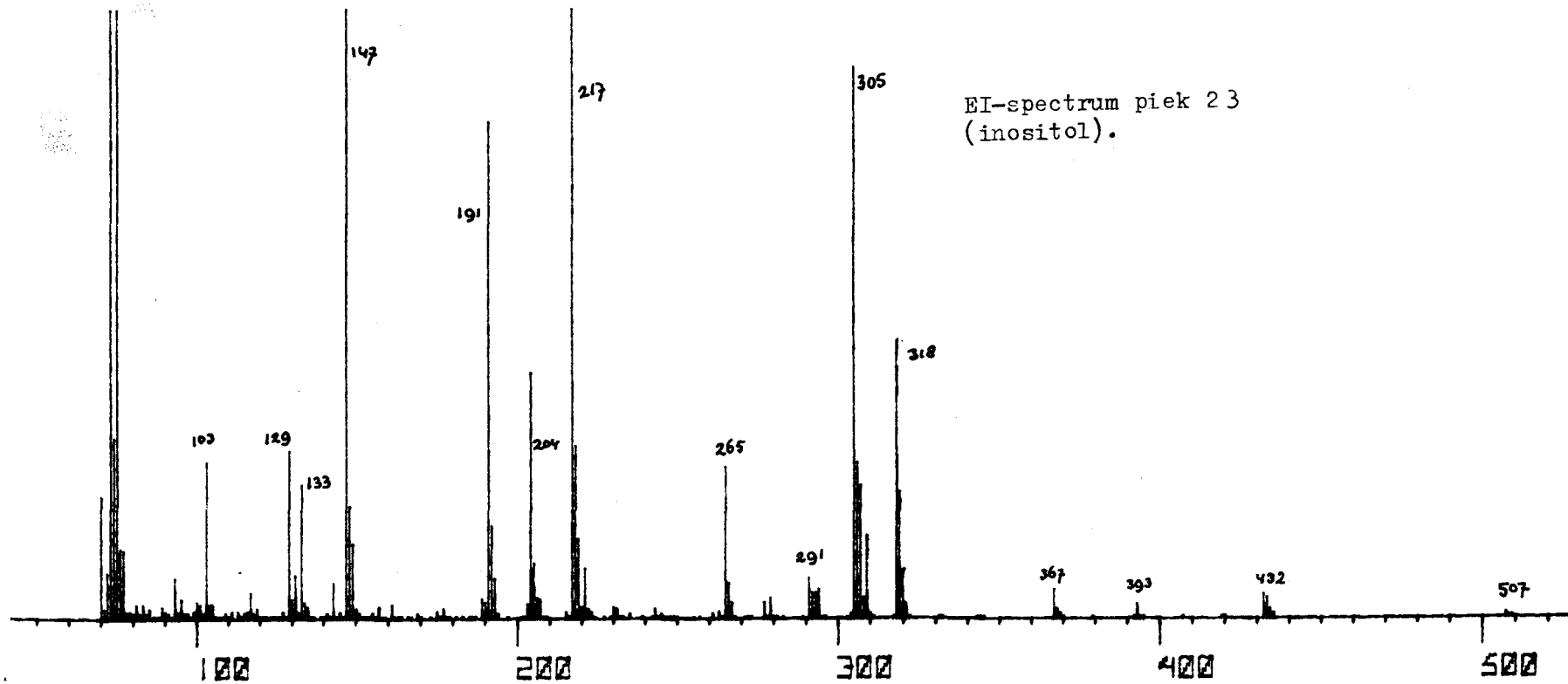
## Physiologic normals\*

<i>Blood</i>	
Volume	7-9% body
Hydrogen ion concentration (pH)	7.38-7.44 { 7.27-7.39 v. 7.39-7.41 a.
Specific gravity	1.053-1.064
Viscosity (18° C.)	0.0496 dyne sec./cm. <sup>2</sup> (men) 0.0464 dyne sec./cm. <sup>2</sup> (women)
Erythrocytes	4,500,000-5,000,000/mm. <sup>3</sup>
Reticulocytes	0.8-1.0%
Leukocytes	5,000-10,000/mm. <sup>3</sup>
Platelets	200,000-400,000/mm. <sup>3</sup>
Hemoglobin	14-16 gm./100 ml.
Hematocrit	47% ± 7% (men) 42% ± 5% (women)
Glucose	80-120 mg./100 ml.
Total serum protein	6.0-8.0 gm./100 ml.
Albumin	3.5-5.5 gm./100 ml.
Globulin	2.5-3.0 gm./100 ml.
Fibrinogen	0.25-0.5 gm./100 ml.
Nonprotein nitrogen	25-38 mg./100 ml.
Urea nitrogen	8-20 mg./100 ml.
Creatinine	0.5-1.5 mg./100 ml.
Uric acid	3.6-6.5 mg./100 ml.
Calcium	9-11 mg./100 ml. or 4.5-6.0 mEq./L.
Phosphorus	2.5-3.5 mg./100 ml.
Sodium	315-340 mg./100 ml. or 136-145 mEq./L.
Potassium	14-20 mg./100 ml. or 3.6-5.0 mEq./L.
Chlorides	355-376 mg./100 ml. or 98-106 mEq./L.
Cholesterol	150-250 mg./100 ml.
Cholesterol esters	60-80% of total cholesterol
Total lipids	570-820 mg./100 ml.
Acid phosphatase	0.1-0.8 Bodansky units
Alkaline phosphatase	3-13 King-Armstrong units
Ammonia	40-70 µg./100 ml.
<i>Urine</i>	
Volume	0.5-1.5 L./day
Specific gravity	1.008-1.030
Hydrogen ion concentration (pH)	4.8-7.5
Color	pale straw to amber
Urea	10-40 gm./day
Uric acid	0.2-1.0 gm./day
Total nitrogen	10-18 gm./day
Ammonia	0.5-15.0 gm./day
Creatinine	1.0-1.5 gm./day
Chlorides (as NaCl)	10-15 gm./day
Phosphorus	0.8-2.0 gm./day
Total sulfates	0.6-1.0 gm./day
17-ketosteroids	6.0-21.0 mg./day (men) 3.0-12.0 mg./day (women)
Total solids	20-60 gm./day

\*Mainly from Cleveland Clinic normal laboratory values.



EI-spectrum peak 18  
( $\alpha$ -D-glucose).



EI-spectrum peak 23  
(inositol).