



Right Dose, Right Now Autokinetics

Methodeontwikkeling en validatie van een LC-MS/MS methode

Inhoud presentatie

- Aanvraag researchproject
- Methodeontwikkeling
- Validatie
- Resultaten
- Discussie
- Conclusie

Aanvraag researchproject

Right dose, Right Now: gepersonaliseerd doseren aan het bed door gebruik van big data

- Behandeling sepsis verbeteren
- Optimale dosering antibiotica
- Daling van het aantal sterfgevallen en sneller herstel

<http://www.autokinetics.eu/>

Aanvraag researchproject

Kwantitatieve bepaling van meropenem, ceftriaxon, cefotaxim, desacetylcefotaxim, ciprofloxacin en vancomycine in plasma en vrije fractie m.b.v. LC-MS/MS TSQ Quantiva

- Meetmethode: LC-MS/MS
- Per afnamemoment 250 uL plasma en zo nodig vrije fractie
- Enkele honderden patiënten, enkele duizenden samples
- Gevalideerd volgens de EMA richtlijn

Methodeontwikkeling

- Literatuur
- MS-methode
- LC-methode
- Monstervoorbewerking: plasma vs vrije fractie

Methodeontwikkeling

Literatuur:

β -lactam antibiotica

HPLC-UV vs LC-MS/MS

Eiwitprecipitatie vs SPE

Luik UMC 2008:	Simultaneous determination of 5 β -lactam antibiotics in plasma SPE en HPLC-UV
Gifu UMC 2010:	Simultaneous determination of 8 β -lactam antibiotics in serum SPE en LC-MS/MS
Erasmus 2017:	Simultaneous determination of 9 β -lactam antibiotics in plasma Precipitatie en LC-MS/MS (HILIC)

Methodeontwikkeling

MS-Methode:

- Directe infusie en optimalisatie
- Minimaal 2 massaovergangen per component
- Twee gedeutereerde interne standaarden

Compound	Retention Time (min)	RT Window (min)	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
Ciprofloxacin-332	3.25	6.5	Positive	332	202.897	42.107	85
Ciprofloxacin-332	3.25	6.5	Positive	332	314.165	19.556	85
Ciprofloxacin-D8	3.25	6.5	Positive	340.15	235.058	39.124	85
Meropenem	3.25	6.5	Positive	384.183	68	20	70
Meropenem	3.25	6.5	Positive	384.183	206.04	25.522	70
Meropenem-D6	3.25	6.5	Positive	390.16	147.472	14.854	70
Meropenem-D6	3.25	6.5	Positive	390.16	346.222	10.253	70
DA-Cefotaxim-414	3.25	6.5	Positive	414.04	241	16.067	72
DA-Cefotaxim-414	3.25	6.5	Positive	414.04	284.929	17.028	72
Cefotaxim-456	3.25	6.5	Positive	456.06	324	14.652	69
Cefotaxim-456	3.25	6.5	Positive	456.06	396	10.253	69
Ceftriaxon_555	3.25	6.5	Positive	555.03	167	25.169	55
Ceftriaxon_555	3.25	6.5	Positive	555.03	323.986	16.927	55
Ceftriaxon_555	3.25	6.5	Positive	555.03	396	12.528	55
Vancomycin_725	3.25	6.5	Positive	725.176	100.097	27.039	71
Vancomycin_725	3.25	6.5	Positive	725.176	144.111	14.5	71

Methodeontwikkeling

LC-Methode:

- Mobile Fase A: MilliQ, 2mMol Ammoniumacetaat en 0.1% Mierenzuur.
- Mobile Fase B: Methanol, 2mMol Ammoniumacetaat en 0.1% Mierenzuur.
- Kolom: Thermo Accucore C18+ 100x2.1

No	Time	Flow [ml/min]	%B	Curve
1	0.000		Run	
2	0.000	0.300	5.0	5
3	1.000	0.300	5.0	5
4	2.000	0.300	40.0	5
5	2.500	0.300	45.0	5
6	3.000	0.300	50.0	5
7	3.800	0.300	55.0	5
8	3.900	0.300	95.0	5
9	4.900	0.300	95.0	5
10	5.000	0.300	5.0	5
11	New Row			
12	5.500		Stop Run	



Methodeontwikkeling

Monstervoorbewerking:

Precipitatie of SPE?

- Voor- en nadelen voorbereidingstechnieken
- Zelfde opwerkmethode voor beide matrices

Plasma en vrije fractie als matrix

- Verschillen in matrix
- Standaarden en controlemonsters

Methodeontwikkeling

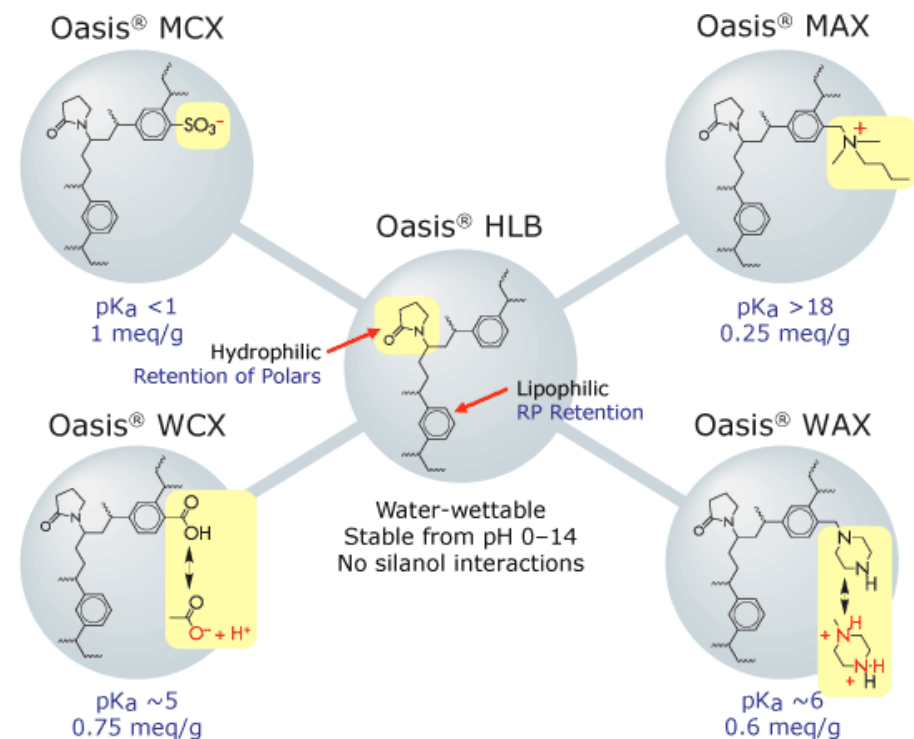
Monstervoorbewerking:

Precipitatie of SPE?

- SPE m.b.v. Oasis HLB

Plasma en vrije fractie als matrix

- Standaarden in plasma
- Buffer in plaats van echte vrije fractie
- Controlemonsters in plasma en buffer



Methodeontwikkeling

Monstervoorbewerking m.b.v. SPE

- Conditioneer met 2 ml MeOH en 2 ml MilliQ
- Breng 0.28 mL 10mM Ammoniumformaatbuffer op
- Voeg 20 uL Interne standaard oplossing toe
- Breng 100 uL sample op de kolom en laat langzaam doorlopen
- Was met 2 mL 10mM Ammoniumformaatbuffer
- Droog de uitlopen goed af en plaats de vials eronder
- Elueer 2 keer met 500 uL MeOH en damp droog tot ± 200 uL (30 min voor volle bak)
- Verdun met 200 uL MF 50/50 V/V en homogeniseer

Injectievolume: 1 μ L

Autosampler temp: 10 ° C

Kolomoven temp: 40 ° C



Validatie

Validatie parameters:

- Selectiviteit en specificiteit
- Carry-over
- Kalibratie curve
- Juistheid en Precisie
- Lineair bereik
- Matrix effect
- Stabiliteit

Resultaten

- Selectiviteit en specificiteit

De methode onderscheidt de te bepalen componenten van matrix, co-medicatie, ontledingsproducten etc. én alleen het component draagt bij aan het meetsignaal.

Eis: <20% signaal LLQ en <5% signaal interne standaard.

Results of the LLOQ for the tested drug							
Replicate	Area or height	Response drug	Response IS	Noise	s/n ratio	limit s/n	Test passed
1	Area	33145,00	1311342,0	681,00	48,67	5	YES
2		31768,00	1129087,0	387,00	82,09		YES
3		45952,00	1503914,0	519,00	88,54		YES
4		27525,00	1280684,0	549,00	50,14		YES
5		27806,00	1131903,0	547,00	50,83		YES
6		25917,00	950074,0	597,00	43,41		YES
Results of the zero blanks							
Matrix	Response at RT drug	Limit	Test passed	Response at RT IS	Limit	Test passed	
A	1581,00	6403,8	YES	516,0	60891,7	YES	
B	373,00		YES	293,0		YES	
C	1639,00		YES	338,0		YES	
D	803,00		YES	203,0		YES	
E	2482,00		YES	416,0		YES	
F	1515,00		YES	226,0		YES	

- Carry-over

Eis: <20% signaal LLQ en <5% signaal interne standaard.

Results of the LLOQ							
Replicate	Area or Height	Response tested drug	Response IS				
1	Height	45952,0	1503914,0				
2		33145,0	1129087,0				
3		33768,0	1311342,0				
Results of the zero blanks							
Replicate	Response at RT drug	Limit	Test passed	Response at RT IS	Limit	Test passed	
1	4226,00	7524,3	YES	206,00	262956,2	YES	
2	981,00			286,00			
3	1570,00			234,00			

Resultaten

- Kalibratiecurve**

Rechtlijnig verband tussen respons en concentratie (Lineariteit)

Eis: <15% nominale waarde en <20% nominale waarde LLQ

75% van de standaarden moet voldoen

Goodness of Fit: significant (F-calc > F-tabel)

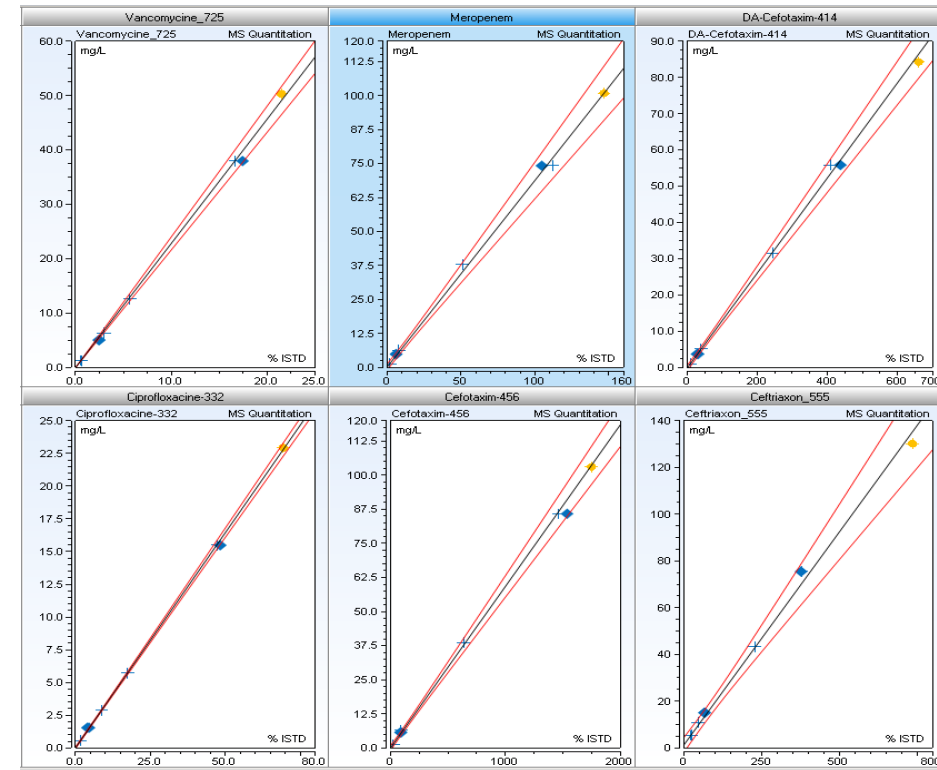
Lack of Fit: niet significant (F-calc < F-tabel)

- Juistheid en precisie**

Juistheid (accuracy): het verschil tussen de gemeten waarde en nominale waarde (Bias)

Precisie (precision): de mate van spreiding binnen de gemeten waarden (CV%)

Eis: Bias en CV% <15% en <20% voor LLQ



Withinrun accuracy - precision														
QC Level	Th. Conc.	SI Unit	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	Repl. 6	Low or High Outlier	Accuracy	Limit	Precision	Limit	Test passed
LLOQ	0,13	mg/L	0,12	0,13	0,13	0,13	0,12	0,13	No	99,05	± 20%	4,78	± 20%	YES
Low	0,40		0,42	0,35	0,49	0,38	0,37	0,39	No	98,65	± 15%	12,30	± 15%	YES
Medium	66,41		61,63	67,75	64,02	64,81	67,26	64,08	No	98,76		3,47		YES
High	106,26		122,18	107,43	111,22	118,27	116,93	118,19	No	107,67	4,70	YES		
Betweenrun accuracy - precision														
QC Level	Th. Conc.	SI Unit	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	Repl. 6	Low or High Outlier	Accuracy	Limit	Precision	Limit	Test passed
LLOQ	0,13	mg/L	0,15	0,12	0,12	0,13	0,14	0,14	No	102,82	± 20%	8,79	± 20%	YES
Low	0,40		0,46	0,45	0,37	0,38	0,39	0,38	No	101,29	± 15%	9,98	± 15%	YES
Medium	66,41		69,33	69,11	75,97	66,41	64,09	63,82	No	102,58		6,62		YES
High	106,26		121,45	116,38	120,49	113,40	120,71	120,20	No	111,77	2,68	YES		

Bias: (gevonden waarde – nominale waarde) / nominale waarde * 100%

CV%: (StDev/gem.) * 100% (Within en between)

Uitbijters (Outlier) worden berekend m.b.v. Grubbs test: $G = (\text{vermoedelijke uitbijter-gemiddelde}) / \text{StDev totale dataset}$

Resultaten

- Matrix effect

Eventuele invloed op het signaal door de matrix bij MS-methodes.

Wordt bepaald voor zowel de te analyseren componenten als de interne standaard.

Eis: CV% < 15%

Results of the matrix effect - Plasma						
Matrix factor (MF) for the QC Low						
Matrix	MF tested drug	MF internal standard	IS corrected MF	V.C. corrected MF	Limit	Test passed
A	0,88	0,92	0,96	6,9%	15%	YES
B	0,70	0,82	0,85			
C	0,76	0,88	0,87			
D	1,03	1,04	0,99			
E	0,95	0,96	0,99			
F	0,94	0,94	1,00			
Matrix factor (MF) for the QC High						
Matrix	MF tested drug	MF internal standard	IS corrected MF	V.C. corrected MF	Limit	Test passed
A	1,01	1,08	0,93	1,1%	15%	YES
B	0,94	0,99	0,96			
C	0,90	0,95	0,94			
D	1,04	1,12	0,93			
E	1,03	1,09	0,94			
F	1,03	1,11	0,93			

Results of the matrix effect – Vrije fractie						
Matrix factor (MF) for the QC Low						
Matrix	MF tested drug	MF internal Standard	IS corrected MF	V.C. corrected MF	Limit	Test passed
A	0,91	0,92	0,99	4,0%	15%	YES
B	0,74	0,82	0,89			
C	0,82	0,88	0,94			
D	1,02	1,04	0,99			
E	0,93	0,96	0,96			
F	0,92	0,94	0,99			
Matrix factor (MF) for the QC High						
Matrix	MF tested drug	MF internal standard	IS corrected MF	V.C. corrected MF	Limit	Test passed
A	1,10	1,08	1,02	1,6%	15%	YES
B	1,03	0,99	1,04			
C	1,00	0,95	1,05			
D	1,13	1,12	1,00			
E	1,13	1,09	1,03			
F	1,14	1,11	1,03			

Results of the matrix effect - Buffer						
Matrix factor (MF) for the QC Low						
Matrix	MF tested drug	MF internal standard	IS corrected MF	V.C. corrected MF	Limit	Test passed
A	1,00	0,92	1,09	4,0%	15%	YES
B	0,81	0,82	0,99			
C	0,86	0,88	0,98			
D	1,04	1,04	1,00			
E	0,99	0,96	1,02			
F	0,96	0,94	1,03			
Matrix factor (MF) for the QC High						
Matrix	MF tested drug	MF internal standard	IS corrected MF	V.C. corrected MF	Limit	Test passed
A	1,04	1,08	0,96	1,3%	15%	YES
B	0,94	0,99	0,96			
C	0,93	0,95	0,98			
D	1,06	1,12	0,94			
E	1,03	1,09	0,95			
F	1,06	1,11	0,96			

Matrixeffect: (PostExtraction : Neat) * 100%

Procesefficiëntie: (QC : Neat) * 100%

Recovery: (QC : PostExtraction) * 100%

Resultaten

- Lineair bereik in mg/L

Component:	Meropenem	Ceftriaxon	Cefotaxim	DA-Cefotaxim	Ciprofloxacin	Vancomycine
LLQ	0,12	5,0	0,13	0,13	0,06	0,10
Lineair tot	127,4	196,1	124,8	131,1	20,0	74,3

- Stabiliteit

Eis: Bias en CV% <15% en <20% voor LLQ

Vries/dooi stabiliteit: 3 cycli op Low en High Niveau

Autosamplerstabiliteit: 48 uur bij 10° C

Short term stability: 4 uur op opwerktafel (kamertemperatuur)

Long term stability: 2 maanden bij -80° C

Discussie

- Procesverbetering – automatiseren aanvraag
- Procesverbetering – voorbewerking met Aspec
- Houdbaarheidsonderzoek lange termijn

Conclusie

- Gevalideerde methode
- Wekelijkse analyse
- Optimalisatie doorlooptijd

Referenties

- M. Di Rocco, et al., Development and validation of a quantitative confirmatory method for 30 β -lactam antibiotics in bovine muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, 1500 (2017) 121-135
- H.E. Jin, et al., Recent bioanalytical methods for quantification of third generation cephalosporins using HPLC and LC-MS(/MS) and their applications in pharmacokinetic studies, *Biomedical chromatography* 28 (2014) 1565-1587
- A. Abdulla, et al., Simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography B*, 1060 (2017) 138-143
- M.J. Ahsman, et al., Microanalysis of β -lactam antibiotics and vancomycin in plasma for pharmacokinetic studies in neonates, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53 (2009) 75-80
- T. Ohmori, et al., Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography B*, 879 (2011) 1038-1042
- <http://www.autokinetics.eu/>

Vragen?

Hartelijk dank voor uw aandacht