UMC Utrecht

Matrix effecten: de achilleshiel van kwantitatieve LC-MS?

Ing. Klaas Stienstra* en Dr. Erik van Maarseveen*

Apotheek Laboratorium, Universitair Medisch Centrum Utrecht

**beide sprekers hebben geen belangenverstrengeling te melden.*

PUOZ Labdag 2 onnecting U

UMC Utrecht

LCMS voor de (ziekenhuis)apothekers (?)

Fundamentals of Mass Spectrometry

https://www.youtube.com/watch?v=EzvQzImBuq8&app=desktop

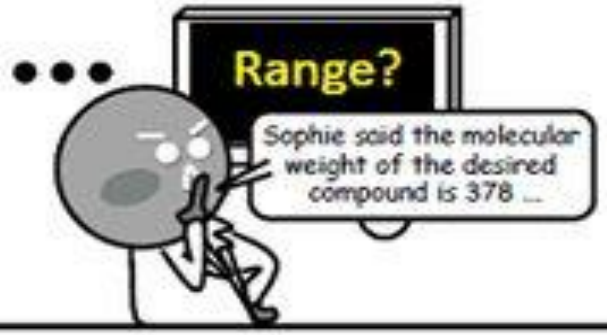
How does it work?

https://www.youtube.com/watch?v=YA5DDt6bMIw

UMC Utrecht

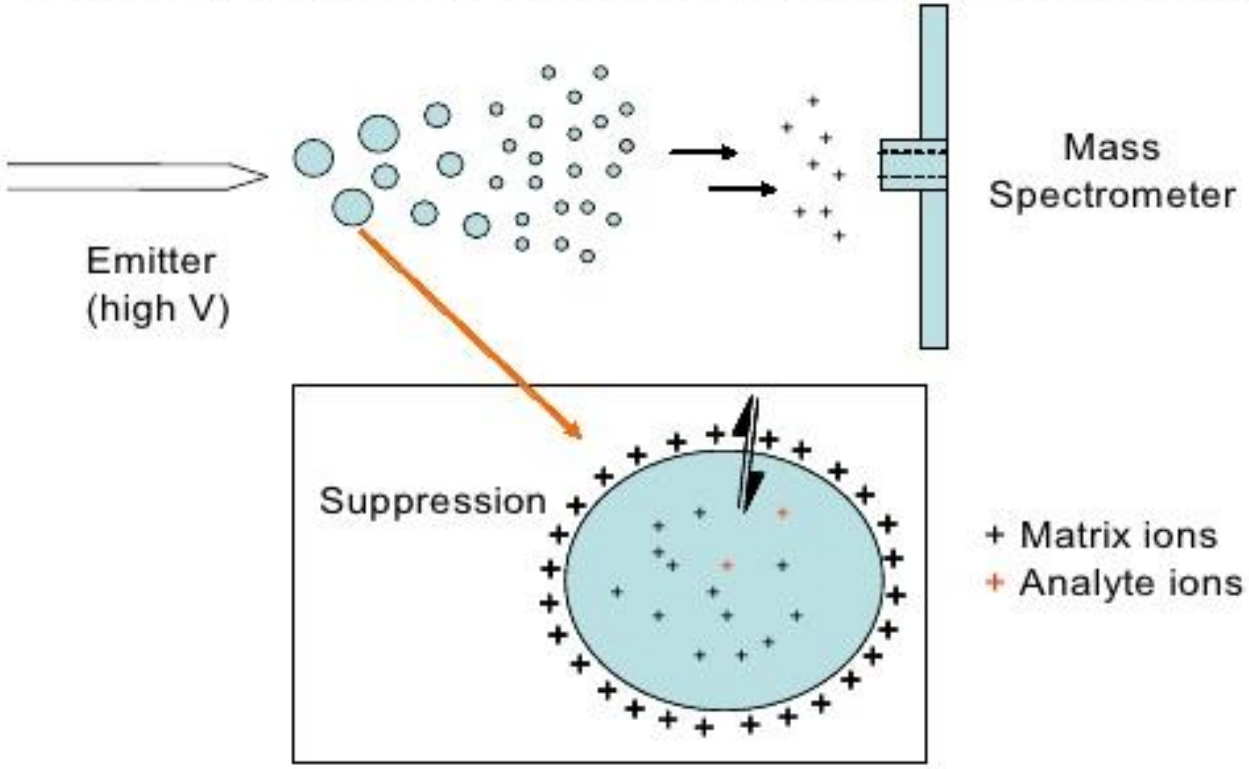
Wonderlab

– Mass Spectrometry



Matrix Effect in LC-ESI-MS

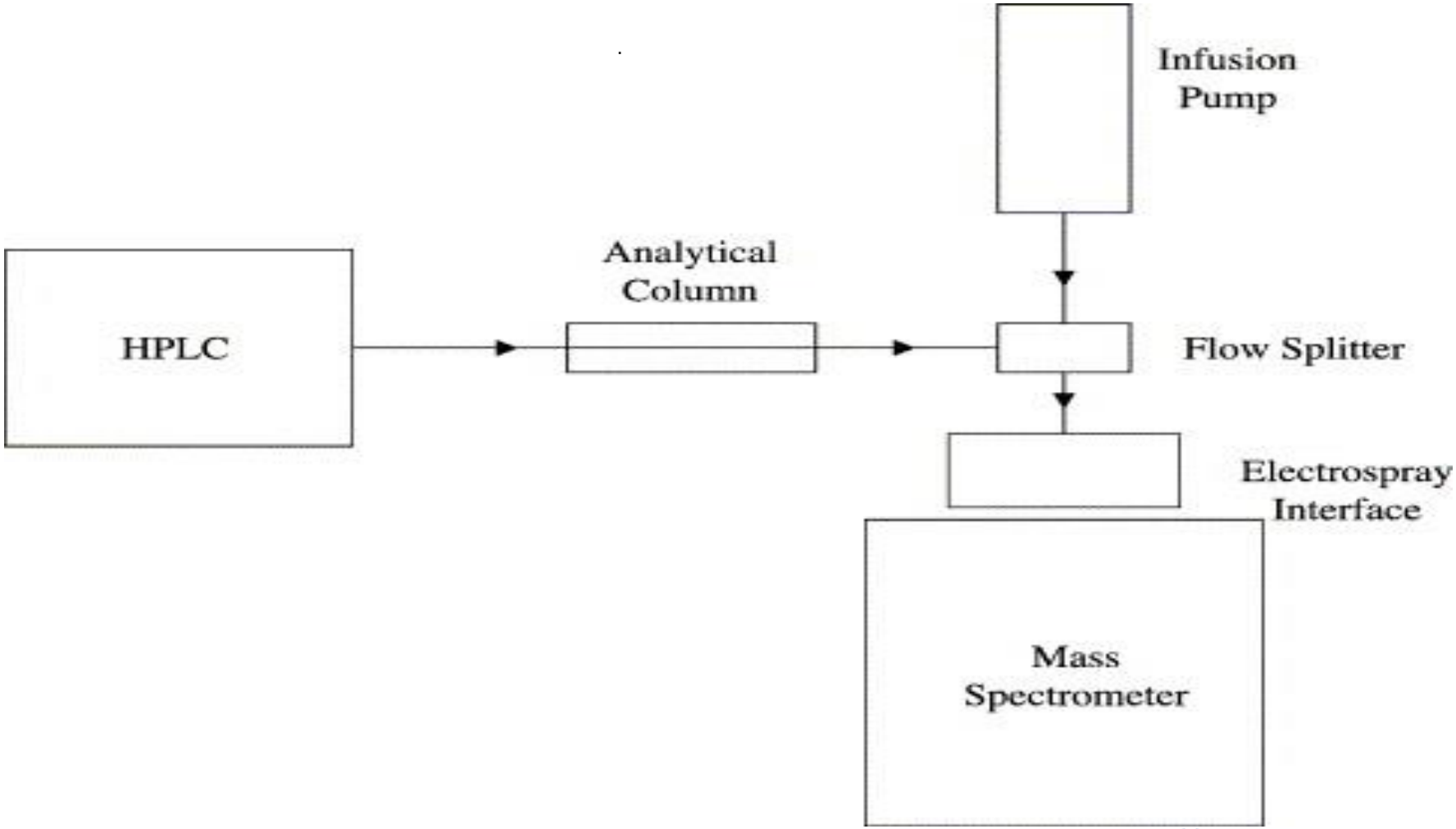
Matrix effects are the result of competition between nonvolatile matrix components and analyte ions for access to the droplet surface for transfer to the gas phase.



Depending on the environment in which the ionization and ion evaporation processes take place, this competition may effectively decrease (**ion suppression**) or increase (**ion enhancement**) the efficiency of formation of the desired analyte ions.

De Matrix-detective….

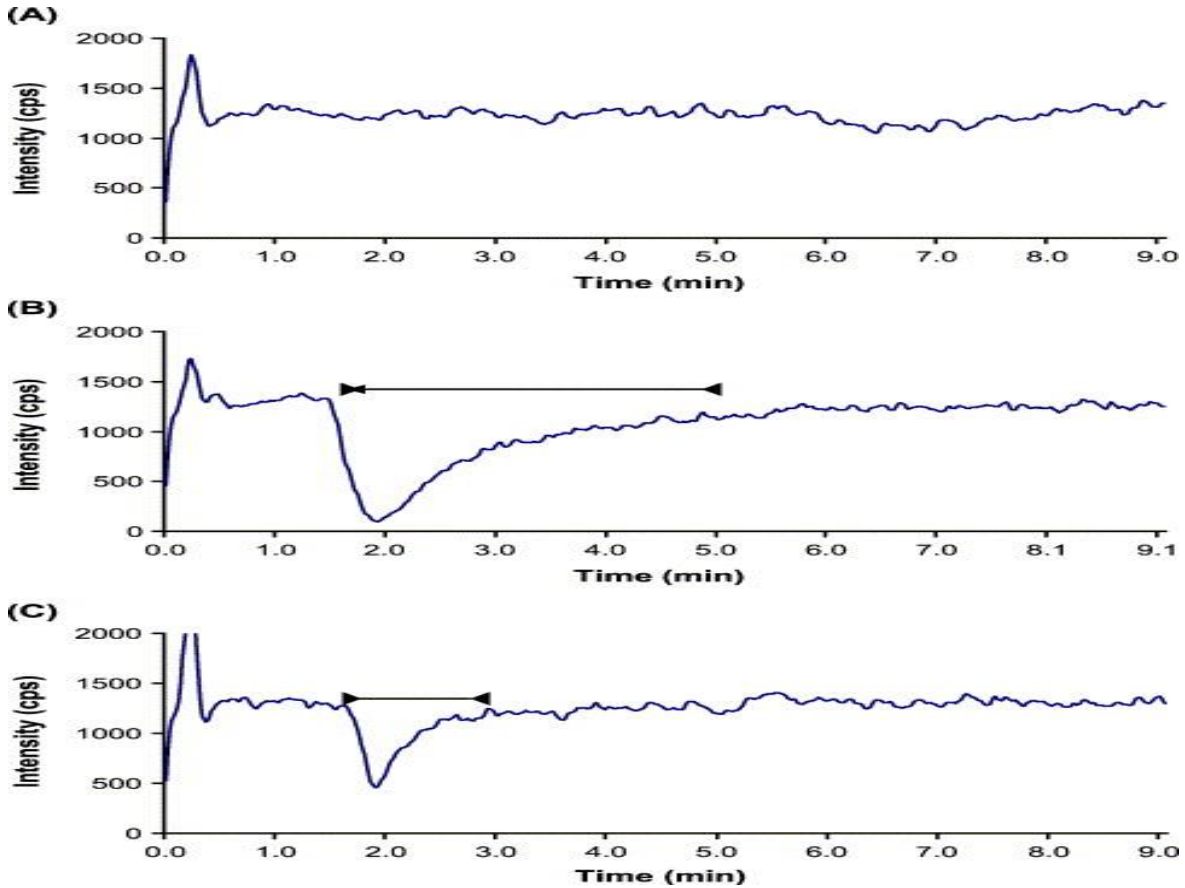
Schematic of the postcolumn



UMC Utrecht

Paul J. Taylor
Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry
Clinical Biochemistry, Volume 38, Issue 4, 2005, 328–334

het Waarom van de Postkolom



Comparison of (A) mobile phase, (B) whole blood sample prepared by protein precipitation, and (C) a whole sample prepared by solid phase extraction [33] by the postcolumn infusion method.

UMC Utrecht

Paul J. Taylor, Clinical Biochemistry, Volume 38, Issue 4, 2005, 328–334

Process efficiency is key!

Table 2.
Validation data of an HPLC–ESI–MS/MS method, for the measurement of cyclosporin, using the pre- and postextraction technique

	Cyclosporin concentration (µg/L)			
Parameter ± standard deviation	30	400	1500	Internal standard (300 µg/L)
Matrix effect (%)	−7.5 ± 3.6	−7.8 ± 6.1	−3.6 ± 4.1	−7.3 ± 7.5
Absolute recovery (%)	75.7 ± 3.3	82.2 ± 4.6	83.7 ± 5.0	79.3 ± 6.7
Process efficiency (%)	69.8 ± 5.1	75.6 ± 2.8	80.7 ± 5.6	73.6 ± 9.3
Intersubject variability[a] (%)	2.4	2.3	1.0	[b]

Cyclosporin parameters are calculated on five measurements and internal standard parameters on 15 measurements. Methodology reported in Taylor et al. [40].

a Expressed as coefficient of variation ($n = 5$).

b Not applicable.

UMC Utrecht

Matrix problemen: een voorbeeld

Casus: combi-run anti-epileptica in plasma m.b.v. LC-MS/MS

UMC Utrecht

Methode 1

- 17 anti-epileptica in plasma
- Opwerking: eiwit precipitatie

- LC-MS Ultimate 3000 UHPLC met TSQ Acces MAX Triple quadrupole MS (Thermo Scientific)
- Ion source ESI in pos/neg mode
- Kolom Acquity UPLC BEH C18 (50x2.1 mm; 1.7 µm)
- Column temp 50°C
- Eluens A: Water + 0.1% ammoniumacetaat
  B: Methanol
- Analysetijd 9 min
- 3 isotoop gelabelde interne standaarden

UMC Utrecht

Validatie volgens FDA guidelines

	Felbamaat	*Fenobarbital*	*Fenytoïne*
Lineariteit	14,3 – 130 mg/L	7,38 – 60,1 mg/L	3,49 – 23,3 mg/L
Nauwkeurigheid LLQ	WR: 2,2 % BR: 9,0 %	WR: 4,5 % BR: 0,0 %	WR: 2,4% BR: 3,3 %
Nauwkeurigheid MED	WR: 2,8% BR: 4,9 %	WR: 2,1 % BR: 0,0 %	WR: 1,9 % BR: 2,5 %
Vries/ dooi effect	WR: 2,8% BR: 4,9 %	WR: 2,1 % BR: 0,0 %	WR: 1,9 % BR: 2,5 %
Autosamplerstabiliteit, t =	20 uur	20 uur	20 uur
Matrix effect	8,0 %	4,5 %	0,7 %
Specificiteit	Acc		

Alle componenten voldoen aan de vooraf gestelde validatie eisen

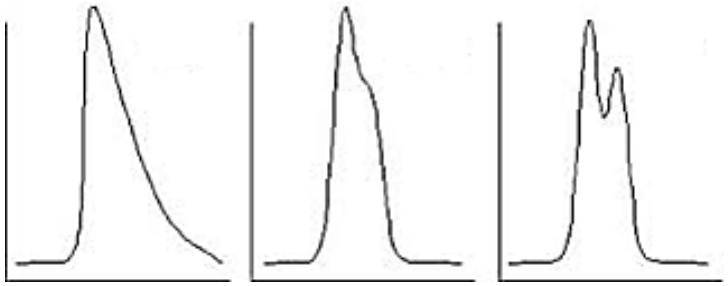
Methode gevalideerd

UMC Utrecht

Problemen

Na verloop van tijd ontstonden er problemen

- **Verhoging van druk**
- **Slechte piekvorm**
- **Afwijking van de QC's**



UMC Utrecht

Oorzaken en Oplossingen

Mogelijke oorzaken van de problemen

- Verstopping van de kolom
- Kolom degradatie
- Schimmelgroei in leidingen UHPLC systeem en de kolom

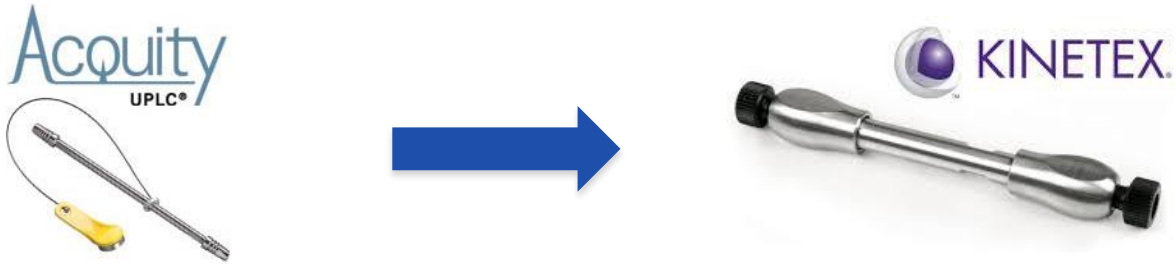
Oplossingen van de problemen

- Vervangen kolom
- Gebruik maken van een voorkolom
- Monsters opwerken met protein precipitation plate
- Spoelen systeem volgens procedure leverancier

UMC Utrecht

Optimalisatie methode 2

- **Overstap naar andere kolom leverancier (Kinetex XB-C18 75x2,1 mm; 2,6 µm)**

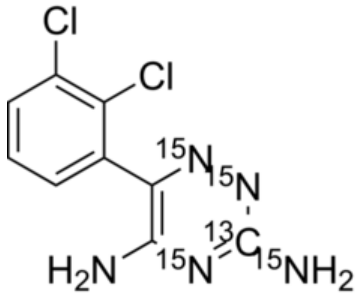


- **Gradient aanpassen**

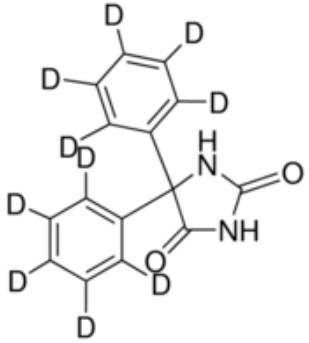
UMC Utrecht

Optimalisatie methode 2

- **Isotoop gelabelde interne standaard voor alle componenten**



Lamotrigine-13C,15N4



Fenytoine-d10

UMC Utrecht

Resultaten hervalidatie

	Felbamaat *POS*	*Fenobarbital* *NEG*	*Fenytoïne* *NEG*
Lineariteit	14,0 – 129 mg/L	6,91 – 58,4 mg/L	3,47 – 24,4 mg/L
Nauwkeurigheid LLQ	WR: 10,3 % BR: 3,8 %	WR: 7,5 % BR: 8,3 %	WR: 9,0% BR: 12,1 %
Nauwkeurigheid MED	WR: 4,9% BR: 11,3 %	WR: 3,9 % BR: 0,6 %	WR: 4,0 % BR: 4,2 %
Matrix effect %	0,4 %	-3,5 %	-2,8 %
Recovery %	97 %	100 %	100 %
Specificiteit	Akk	Akk	Akk

Alle componenten voldoen aan de vooraf gestelde validatie eisen

Methode gevalideerd

UMC Utrecht

Methode 1 vs Methode 2

Analyseren patient plasma met methode 1 en methode 2 maar met isotoop gelabelde ISTD

Component
10-OH-Carbamazepine
Gabapentine
Lamotrigine
Levetiracetam
Topiramaat
Lacosamide
Ethosuximide
Fenobarbital
Fenytoine
Valproinezuur

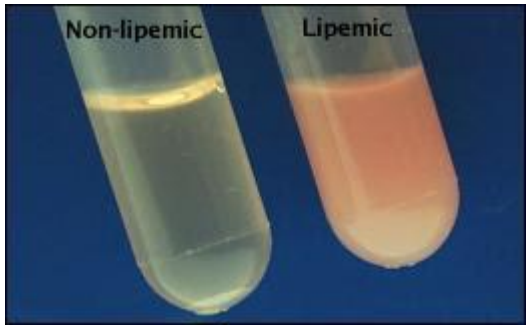
UMC Utrecht

Samenvatting

- **Tijdens validatie verschillende matrices getest zoals Kalfsserum, KKGT serum, Biorad plasma en Patienten plasma. Hierbij geen matrix effect aangetoond!**

- **Leerpunt 1: Stabiele isotoop gelabelde interne standaard bood goede correctie voor hele proces**

- **Leerpunt 2: Gebruik van representatief patientenmateriaal**



UMC Utrecht

Hoe het matrix monster te temmen?

Questions?