



Haloperidol in serum m.b.v. Triple Quad LC-MS

Richard van Rossen / Henk Trumpie

Apotheek Haagse Ziekenhuizen

Email: r.vanrossen@ahz.nl

Inleiding

Sinds februari 2007 heeft het lab van de AHZ de beschikking over een Agilent 6410 Triple Quad LC-MS.

De eerste analyse die wij ontwikkeld hebben op de LC-MS is de analyse van haloperidol in serum. Voor de komst van de LC-MS werd deze analyse uitgevoerd m.b.v. HPLC-DAD na een vloeistof-vloeistof extractie. Dit was een behoorlijk tijdrovende analyse, waarbij het vaak erg lastig was om de gewenste onderste bepalingsgrens (1 µg/l) te halen. Bovendien was er voor een analyse in duplo 2 ml serum nodig.

Theorie

Een triple quad bestaat uit een interface, een "ion optics" gedeelte, 3 quadrupolen en een fotomultiplier. Het interface is de verbinding tussen de LC en de MS en zorgt ervoor dat het eluens verdampt en de analieten geïoniseerd in de gasfase komen. Er zijn 2 gangbare interfaces: een electrospray en een APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). De electrospray is de meest universele interface en zal in de meeste gevallen eerste keus zijn. Alleen voor zeer apolaire verbindingen is de APCI eventueel een alternatief. Het ion optics gedeelte (in figuur 1 is dit de octopool) zorgt er voor, dat de ionen gericht worden op de eerste quadrupool. De eerste quadrupool fungeert als een massafilter en kan zo worden ingesteld, dat alleen ionen met een bepaalde massa doorgelaten worden.

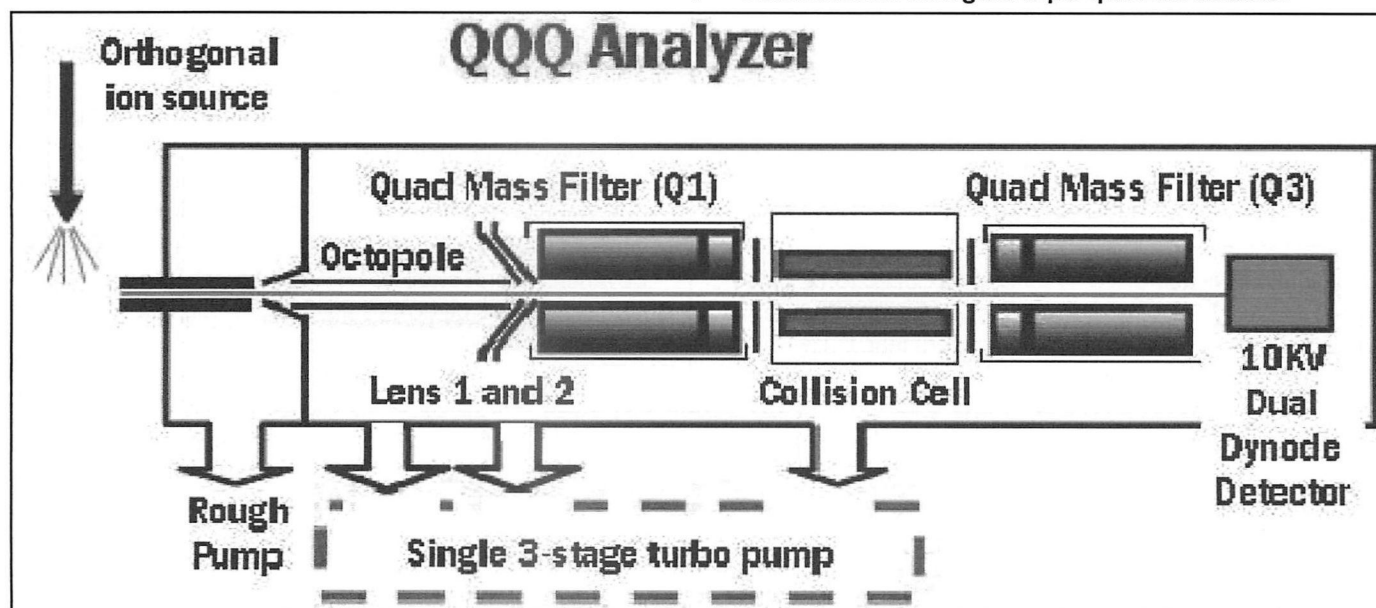
De tweede quadrupool fungeert als botsingscel. In deze quadrupool worden de ionen die de eerste quadrupool zijn gepasseerd gefragmenteerd tot één of meerdere specifieke fragmenten.

De derde quadrupool fungeert weer als massafilter.

De fotomultiplier (in figuur 1 is dit de Dual Dynode Detector) is de feitelijke detector en detecteert alle ionen die de derde quadrupool gepasseerd zijn.

Over het algemeen wordt er gewerkt in de MRM mode. MRM staat voor Multiple Reaction Mode. Dit houdt in dat de eerste quadrupool zo staat ingesteld dat alleen de ionen met de massa van het analiet (= precursor) worden doorgelaten. In de tweede quadrupool worden deze ionen gefragmenteerd tot bij voorkeur 2 karakteristieke fragmenten (= productionen). De derde quadrupool laat vervolgens alleen de ionen met de massa van die 2 fragmenten door. De enige ionen die dus uiteindelijk de fotomultiplier bereiken zijn de 2 productionen met een bepaalde massa en die zijn beiden afkomstig van één precursor met een bepaalde massa. Deze dubbele selectiviteit maakt de triple quad zo gevoelig, omdat er hierdoor bijna geen achtergrondsignaal overblijft. Van de twee productionen wordt degene met de hoogste intensiteit aangewezen als quantifier. Dit ion wordt gebruikt om te kwantificeren. Het tweede fragment wordt gebruikt als qualifier. De verhouding tussen het signaal van de qualifier en de quantifier wordt de ratio genoemd en heeft in principe altijd dezelfde waarde (binnen bepaalde grenzen). De ratio is dus een extra controle op de identiteit van de component.

Figuur 1:
Schematische weergave triple quad MS detector



Een bekend probleem van LC-MS-analyses is ionsuppressie. Dit houdt in dat het signaal van de analieten achterblijft bij wat verwacht mag worden. Dit verschijnsel kan zich voordoen wanneer er teveel ionen in het interface aanwezig zijn. Als bijvoorbeeld het analiet co-elueert met een enorme stoepiek, kan het signaal onderdrukt worden omdat er te weinig analiet-ionen het eerste massafilter bereiken. Dit is een gevaarlijk probleem omdat in de MRM-mode die enorme stoepiek niet wordt waargenomen. In de MRM-mode kijkt de MS namelijk heel specifiek naar de massa's van het analiet en zijn productionen. Co-eluerende pieken zullen in principe altijd een afwijkende massa en/of afwijkende productionen hebben, zodat zij niet gedetecteerd worden. Aan de ene kant is dit natuurlijk juist de kracht van een LC-MS, maar aan de andere kant dus ook een zwak punt.

Omdat ionsuppressie niet waargenomen wordt, moet er voor gezorgd worden dat het niet voor kan komen. Om te beginnen moet er voldoende scheiding zijn tussen het analiet en de meest voorkomende co-medicatie en storingen. Het verhaal dat er met een MS geen goede chromatografie meer nodig zou zijn is echt grote onzin. Daarnaast moet er kritisch gekeken worden naar de monstervoorbewerking. Een concentratiestap zal gelukkig in de meeste gevallen niet nodig zijn, maar schone extracten zijn nog steeds noodzakelijk. Een extractie vinden we te tijdrovend, dus onze eerste keus is een onteiwitstap met acetonitril. Nadeel hiervan is dat je eventuele co-medicatie en andere storingen niet kwijtraakt en het percentage acetonitril is vaak te hoog om direct op de LC te injecteren. Door het supernatant te verdunnen met water sla je daarom twee vliegen in één klap. De oplossing kan direct op de LC geïnjecteerd worden en de invloed van co-medicatie en andere storingen wordt verminderd (= minder kans op ionsuppressie). De verhouding tussen het analiet en de storende componenten blijft weliswaar gelijk, maar bij het voorkomen van ionsuppressie gaat het er om dat de totale concentratie ionen in het interface onder een bepaalde waarde blijft. Dat ook de concentratie van het analiet lager wordt is geen probleem, want over het algemeen is er gevoeligheid genoeg.

Chromatografie

Onze intentie is om bij de LC-MS-analyses zoveel mogelijk gebruik te maken van dezelfde (korte) kolom en hetzelfde eluens.

De kolom die wij gebruiken is een Zorbax SB-C18 (2.1 x 30 mm, 3.5 µm).

Eluens A bestaat uit 10 mM ammoniumformiaat, 0.1% mierzuur in 5% acetonitril.

Eluens B bestaat uit 0.1% mierzuur in acetonitril.

Voor de analyse van haloperidol wordt gebruik gemaakt van 30% eluens B met een flow van 0.3 ml/minuut bij een kolomtemperatuur van 40°C.

Onder deze omstandigheden elueert haloperidol op 1.2 minuut en de interne standaard chloorhaloperidol op 1.8 minuut.

Monstervoorbewerking

Ook bij de monstervoorbewerking willen we zoveel mogelijk gebruik maken van dezelfde werkwijze. Onze eerste keus is in principe een onteiwitstap met acetonitril. Om zo schoon mogelijke supernatanten te verkrijgen hebben we gekozen voor een serum/acetonitril verhouding van 1:3.

Aan 100 µl serum wordt 300 µl interne standaardoplossing (in acetonitril) toegevoegd. Hierna wordt er 10 seconden gevortext en 10 minuten gecentrifugeerd bij 14000 toeren. Het supernatant wordt 4 maal verdund met water en er wordt 10 µl geïnjecteerd op de LC.

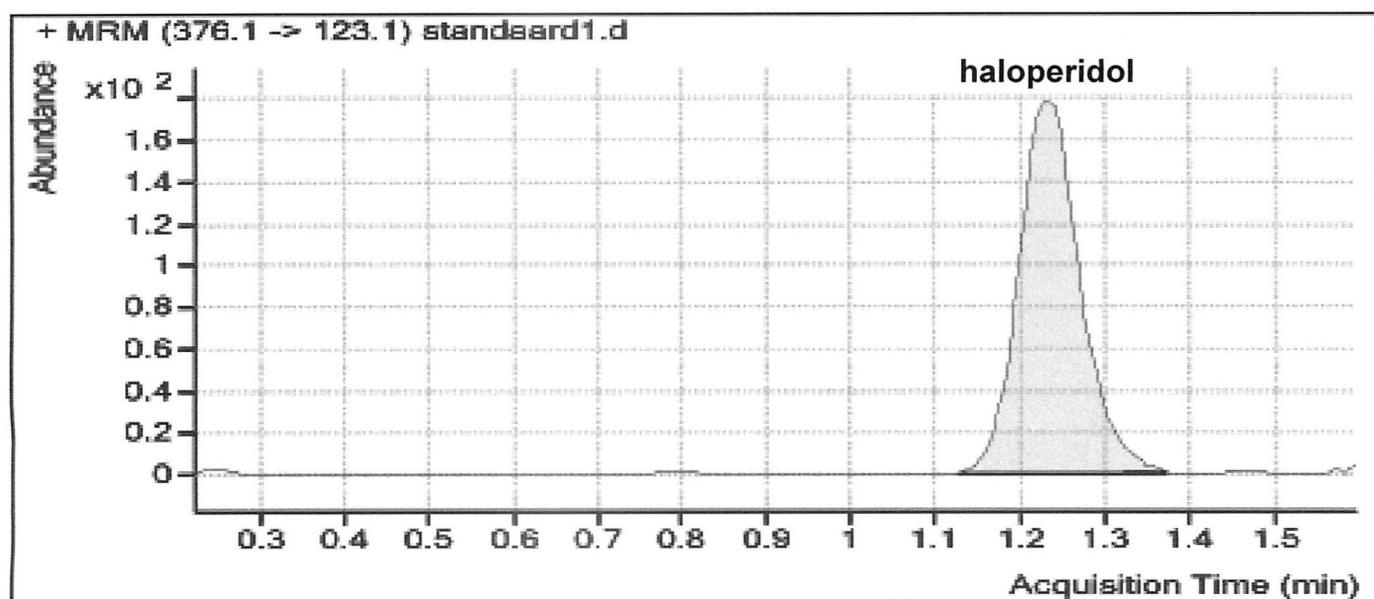
MS-instellingen

Precursor	: haloperidol 376.1 / chloorhaloperidol 392
Quantifier	: haloperidol 123.1 / chloorhaloperidol 138.9
Qualifier	: haloperidol 165.1 / chloorhaloperidol 181
Fragmentor	: 140 V
Collision Energy	: Product ion 165.1: 20 V Product ion 123.1: 45 V Product ion 181: 20 V Product ion 138.9: 40 V
Gas temp.	: 350 °C
Gas flow	: 7 l/min
Nebulizer	: 45 psi
Capillary	: 2000 V

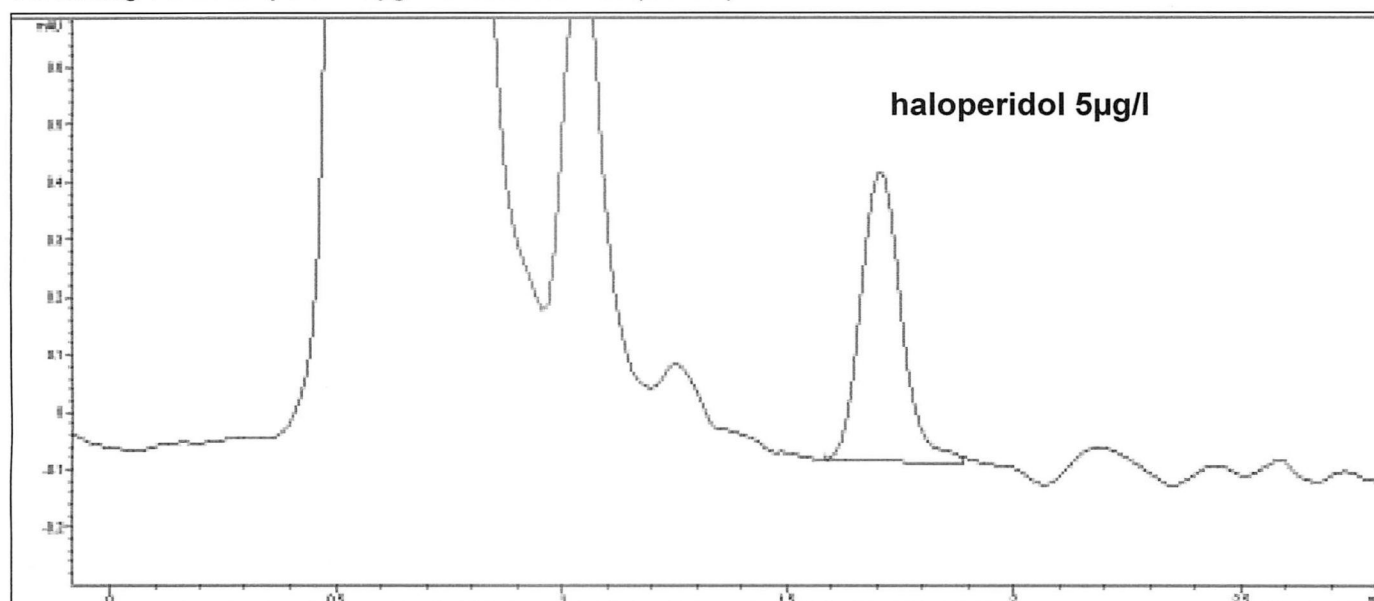
Twee praktijkvoorbeelden

1. Onderstaande chromatogrammen illustreren perfect het verschil in gevoeligheid tussen de traditionele HPLC-DAD en de LC-MS. Let vooral op het enorme verschil in ruis. Bedenk daarbij dat bij de LC-MS het serum 16 maal verdund wordt en bij HPLC-DAD 13 maal geconcentreerd. Bovendien wordt er bij HPLC-DAD 4 maal zoveel geïnjecteerd als bij LC-MS en nog is de signaal-ruis verhouding bij de LC-MS veel beter.

Chromatogram 1: Haloperidol 1 µg/l m.b.v. LC-MS (376,1→123,1)



Chromatogram 2: Haloperidol 5 µg/l m.b.v. HPLC-DAD (245 nm)

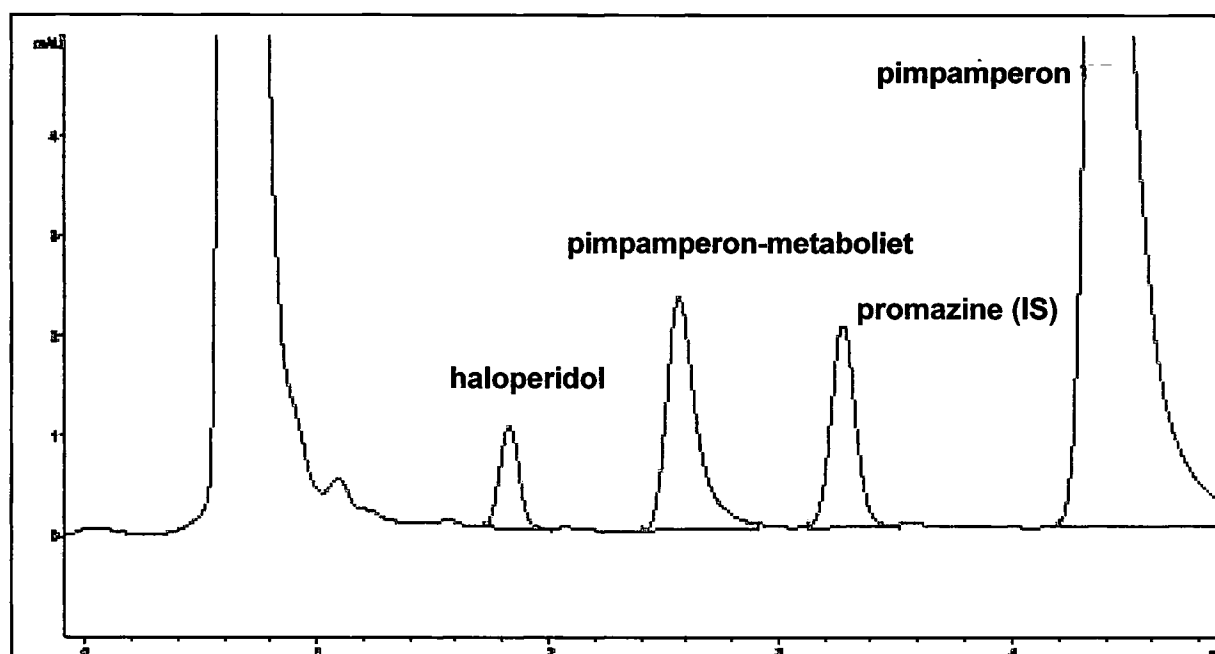


2. Een goed voorbeeld van de selectiviteit van de LC-MS blijkt uit de volgende casus (zie chromatogram 3 en figuur 2). Een serummonster leek na analyse met de HPLC-DAD methode 9 µg/l haloperidol te bevatten. De analyse met de LC-MS leverde echter een heel ander resultaat op: < 0.1 µg/l !!!

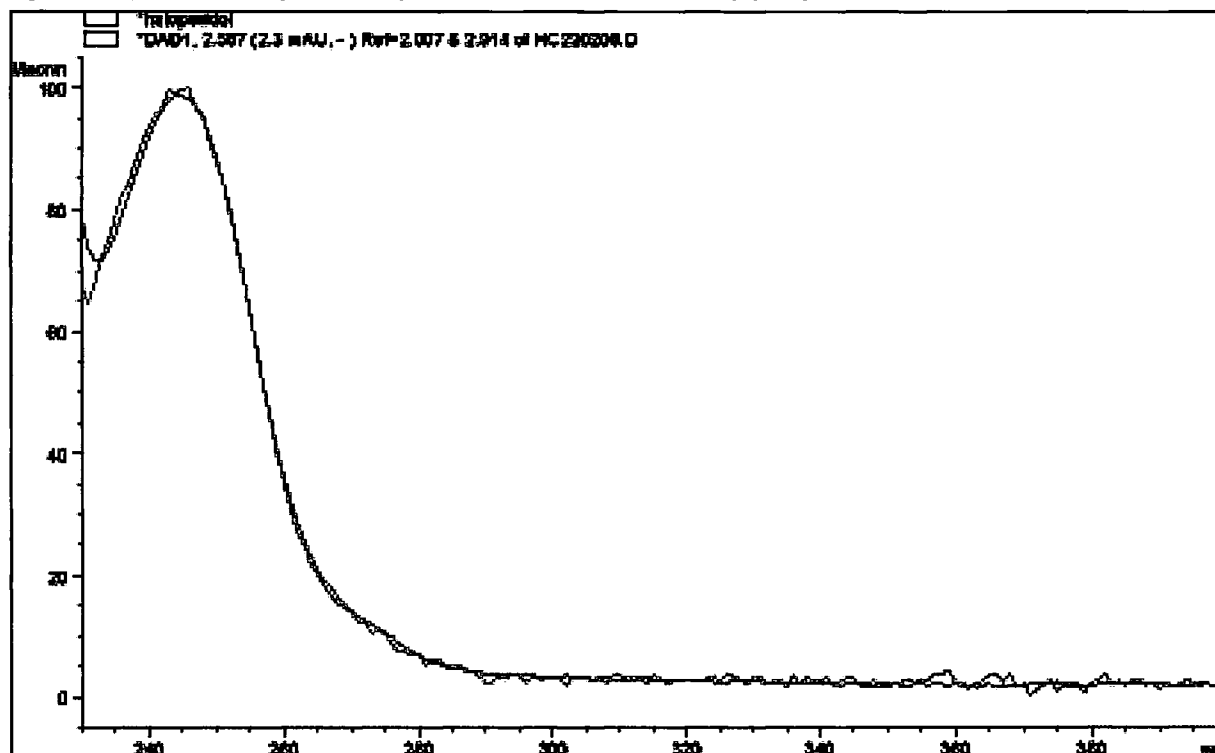
De haloperidolpiek in het HPLC-DAD chromatogram was echter 100% zuiver en had een 100% match met het UV-spectrum van haloperidol uit de bibliotheek. In het chromatogram is echter ook pipamperon plus een extra piek met hetzelfde UV-spectrum als pipamperon aanwezig. Deze extra piek is waarschijnlijk een metaboliet van pipamperon.

Wanneer het UV-spectrum van deze pipamperon-metaboliet vergeleken wordt met het UV-spectrum van haloperidol, blijkt dat ze bijna identiek zijn. Het is heel goed mogelijk dat er nog een pipamperon-metaboliet met hetzelfde UV-spectrum als haloperidol aanwezig is. In dit geval heeft deze metaboliet ook nog exact dezelfde retentietijd als haloperidol. Met de HPLC-DAD methode kan dus geen onderscheid gemaakt worden tussen haloperidol en een metaboliet van pipamperon. Voor de LC-MS is dit een fluitje van een cent.

Chromatogram 3: HPLC-DAD chromatogram van een patient met pipamperon co-medicatie



figuur 2: Spectra overlay van haloperidol en de metaboliet van pipamperon

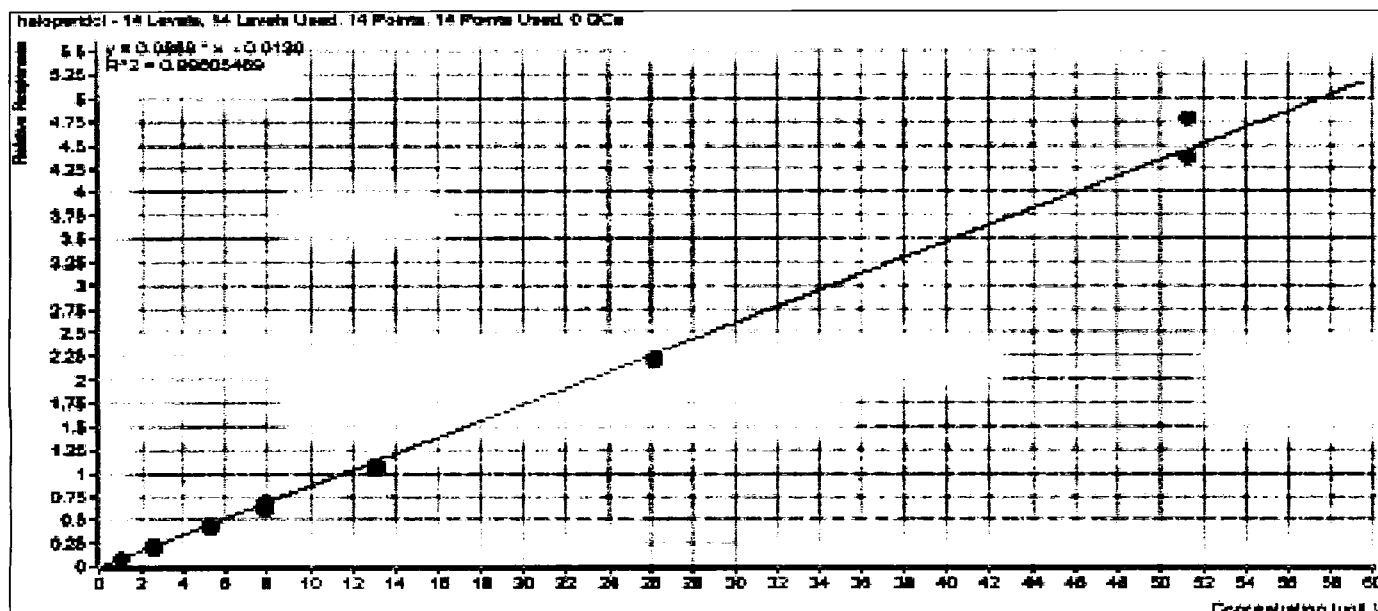


Validatie

1. lineariteit

De lineariteit werd bepaald door zeven concentraties in het gebied van 1 tot 50 µg/l in duplo te analyseren. Met het Anova schema werd de Lack of Fit (LOF) berekend. Het lineaire model voldoet wanneer de berekende LOF kleiner is dan de tabel LOF. Wanneer de oorsprong binnen het 95%-betrouwbaarheidsinterval van het intercept valt is er geen sprake van een systematische fout.

Figuur 3: Lineariteit



2. Detectiegrens en onderste bepalingsgrens

De detectiegrens werd berekend uit het intercept van de ijklijn en zijn standaarddeviatie met behulp van het programma Regress. De detectiegrens is het gemiddelde van zes ijklijnen.

De onderste bepalingsgrens (OBG) is de laagste spiegel, waarvan is aangetoond dat de concentratie juist en reproduceerbaar kan worden bepaald. Deze waarde komt overeen met de laagste standaard van het reproduceerbaarheidsonderzoek.

3. Precisie van het meetsysteem

De precisie van het meetsysteem werd bepaald door een standaard in 6-voud te injecteren en de variatiecoëfficiënt van de piekoppervlaktes te berekenen.

Eis (AHZ-norm): v.c. $\leq 2\%$.

4. Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid werd bepaald door op één dag drie verschillende serumstandaarden in 6-voud te analyseren en de variatiecoëfficiënt van de gevonden resultaten te berekenen. De standaarden die hiervoor gebruikt werden zijn de onderste bepalingsgrens, een standaard met een therapeutische concentratie en een standaard met een hoog-therapeutische concentratie.

Eis (AHZ-norm): - OBG: v.c. $\leq 10\%$
 - Overig: v.c. $\leq 5\%$

5. Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid werd bepaald door op zes dagen drie verschillende serumstandaarden in duplo te analyseren en de variatiecoëfficiënt van de gevonden resultaten te berekenen. De standaarden die hiervoor gebruikt werden zijn dezelfde als bij de herhaalbaarheid.

Eis (AHZ-norm): - OBG: v.c. $\leq 20\%$
 - Overig: v.c. $\leq 10\%$

6. Juistheid

Bij het bepalen van de juistheid wordt er gekeken naar eventuele verschillen tussen de matrix van de standaarden (blanco kalfsserum) en de matrix van de patiënten (humaan serum). Aan 12 "blanco" humane sera wordt een bekende hoeveelheid haloperidol toegevoegd, waarna bepaald wordt welke hoeveelheid haloperidol er wordt teruggevonden. Met "blanco" humaan serum wordt serum zonder haloperidol bedoeld. Voor het overige waren deze sera verre van blanco. Alle sera bevatten hoge concentraties van diverse geneesmiddelen zoals anti-HIV middelen, benzo's, anti-epileptica, pijnstillers en psychofarmaca. Op deze wijze wordt er niet alleen gekeken naar het verschil tussen blanco kalfsserum en humaan serum, maar ook naar eventuele ionsuppressie.

Eis (AHZ-norm): - Verschil kalfsserum – humaan serum $\leq 5\%$
 - v.c. humaan serum: $\leq 10\%$

7. Validatie resultaten

Haloperidol			
Lineariteit	1 – 50 µg/l		
Detectiegrens	0.1 µg/l		
Onderste bepalingsgrens	1 µg/l		
Precisie HPLC systeem (vc; n=6)	0.9% (5.236 µg/l)		
Herhaalbaarheid (vc; n= 6)	5.6% (1.03 µg/l) (20.51µg/l)	3.5% (5.128µg/l)	0.5%
Reproduceerbaarheid (vc; n= 6)	6.2% (1.03 µg/l) (20.51µg/l)	5.0% (5.128µg/l)	3.8%
Juistheid (Xgem ± v.c.; n=12)	96.7% ± 9.5% (1.544 µg/l)		
	99.2% ± 7.0% (4.595 µg/l)		

Conclusies

1. De analyse van haloperidol in serum met behulp van LC-MS voldoet aan onze validatie-eisen. Ten opzichte van de HPLC-DAD methode is de analyse betrouwbaarder en veel sneller.

2. De triple quad LC-MS is een enorme aanwinst voor ons lab. Er zijn nu detectielimieten haalbaar, die tot voor kort onmogelijk waren. Ook kan nu in veel gevallen worden volstaan met een veel eenvoudigere monstervoorbewerking (zonder concentratiestap), wat een aanzienlijke tijdswinst oplevert. Hierdoor is het bijvoorbeeld mogelijk om de service aan de ziekenhuizen te vergroten door bepaalde analyses vaker uit te voeren, waardoor de uitslagen sneller beschikbaar zijn voor de aanvrager. Bovendien kunnen deze analyses met veel minder serum uitgevoerd worden en worden er minder organische oplosmiddelen gebruikt.