

Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Klapková E.¹, Uřinová R.², Průša R.¹

¹Ústav klinické biochemie a patobiochemie, UK 2. LF a FN Motol

²Ústav klinické farmakologie, FN Ostrava

SOUHRN

Práce se zabývá zhodnocením vzájemných vlivů jednotlivých analytických kroků na matricové efekty při vývoji metody stanovení léků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC-MS). Matricové efekty ovlivňují jak kvalitu, tak i kvantitu analýzy a jsou jedny z mnoha příčin chyb v LC-MS. Mechanismů, které je způsobují, je mnoho a ne všechny lze zcela objasnit. Autoři v článku diskutují o vlivu typu ionizace (elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku), způsobu úpravy vzorku, vlivu složení mobilní fáze a jejích aditiv, zvolení vhodného vnitřního standardu a typu biologického vzorku při vývoji nové metody. Testování matricových efektů u HPLC-MS je nezbytné pro úspěšnou validaci metody.

Klíčová slova: matricové efekty, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace.

SUMMARY

Klapková E., Uřinová R., Průša R.: The influence of matrix effects on high performance liquid chromatography-mass spectrometry methods development and validation

The purpose of the present work was to evaluate the synergistic effects of analytical procedures on matrix effects during method development of the drugs determination by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). Matrix effects influence both the quantitative and the qualitative analysis, and they are one from the many errors in LC-MS. They are many mechanisms evoking these errors and it is not trivial to clear up all of them. We evaluated the influence of the optimal ionization type (electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization), the sample preparation procedure, the mobile phase composition and the additives, the choice of suitable internal standard, and the type of biological material during the development of new method. For the successful validation of HPLC-MS method is mandatory to evaluate the matrix effect parameters.

Key words: matrix effects, liquid chromatography, mass spectrometry, validation.

Úvod

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po převedení na kladné nebo záporné ionty. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které ionty vytvoří, nebo je emituje do plynného stavu a z plynné směsi molekul, jejich nabitých fragmentů a iontů separuje nabitě částice podle jejich efektivních hmotností m/z . Pro analýzu léčiv se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). APCI je primárně určena pro ionizaci nízkomolekulárních látek do $m/z < 1000$. Mezi hmotnostní analyzátory používané při analýze léčiv patří trojitý kvadrupolový analyzátor, iontová past nebo průletový analyzátor (TOF), popřípadě jejich kombinace [1].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) má široké uplatnění v terapeutickém monitorování léků a jejich metabolitů (imunosupresiva, inhibitory proteáz, psychofarmaka, betablokátory), v analýze dědičných metabolických poruch, steroidů, mastných kyselin, aminokyselin, catecholaminů, v toxikologii atd.

U APCI je možné použít průtok v rozmezí 0,1 až 2 ml/min, optimální citlivosti lze dosáhnout při průtoku 1 ml/min. U ESI je vhodnější použít průtok v rozmezí 10–500 $\mu\text{l}/\text{min}$, kdy optimální průtok je okolo 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ [1].

APCI je vhodné pro méně polární látky s molekulovou hmotností nižší než 1000 Da a pro látky obsahující v molekule heteroatom. Naopak ESI je vhodný pro středně až vysokomolekulární polární a iontové látky [4].

Metody HPLC-MS – kalibrace, optimalizace, vlivy matrice

Před zavedením nové metody je nejprve nutné definovat cíle, kterých je třeba dosáhnout, zda bude prováděno stanovení samotného léku nebo i jeho metabolitu. Dále navrhnout řešení problémů spojených s analýzou, jako jsou výběr materiálu, ze kterého bude stanovení prováděno (plná krev, plazma, sérum, moč, tkáň), limitace množstvím vzorku (pediatrické vzorky). V případě HPLC-MS je nezbytné vyhledat fyzikálně-chemické vlastnosti stanovovaných látek, jejich strukturu a přítomnost funkčních skupin, které mají vliv na výběr ana-

lytické kolony a mobilní fáze, rozpustnost, pKa a stabilitu. U většiny biologických vzorků je předpokladem, že musí být před samotnou analýzou nějakým způsobem upraveny. K úpravě vzorku se nejčastěji používá extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce na tuhou fázi (SPE) a precipitace proteinů [1, 2, 7]. K precipitaci proteinů se používá metanol, acetonitril, síran zinečnatý nebo jejich kombinace. Při precipitaci proteinů nedojde k účinnému odstranění solí a lipidů, které mohou být jednou z příčin matricového efektu. Metanol a acetonitril jsou účinná rozpouštědla při precipitaci proteinů asi v 98 %, jestliže jsou používány v poměru 2 : 1 nebo vyšším. Rozpouštědla jako kyselina perchloroctová a trifluoroctová jsou sice vhodné k precipitaci proteinů, ale nedoporučují se používat u LC/MS v negativním modu [2, 4].

Vnitřní standard (IS)

V případě, že jsou vzorky upravovány extrakcí, je nezbytné použití vnitřního standardu, který minimalizuje rozdíly v účinnosti extrakce a ionizace. V současné době jsou k dispozici tři druhy IS – strukturní analog stanovované látky, izotopem značený analyt (^{18}O , ^{15}N , ^{13}C , ^2H) nebo jiná vhodná chemická látka. Izotopem značený vnitřní standard je nejlepší volbou, nejlépe splňuje požadavky kladené na spolehlivost analýzy. Při nedostatečné výtěžnosti nedochází k ovlivnění výsledků, stejně jako při koeluci iontů dochází k rovnoměrné změně u IS i u analytu. Matricové efekty v tomto případě neovlivňují poměr IS/analytu, ale nepříznivě ovlivňují dolní mez stanovitelnosti.

Při použití strukturálně podobné látky jako IS je třeba dbát na přítomnost funkčních skupin. V případě, že funkční skupiny obsahují atomy jako O, N, S, P, halogeny dochází ke změně v rozložení náboje dané molekuly a tím i k rozdílné účinnosti ionizace. Z tohoto důvodu je doporučováno, aby se strukturální analog lišil od původní látky pouze vazbami C-H. Při analýzách léků a jejich metabolitů je doporučováno užití více IS [7].

Optimalizace parametrů měření

Dalším krokem při zavádění nové metody je optimalizace podmínek měření. Výběr vhodného iontového zdroje, kdy ESI je používána zejména pro silně polární látky přibližně v 73 %, APCI je používána pro méně polární látky přibližně ve 23 % a pro nepolární látky je používána fotoionizace za atmosférického tlaku [6]. Výběr vhodné mobilní fáze má vliv na tvorbu iontů, minimalizaci tvorby nežádoucích aduktů. Jako mobilní fáze se nejčastěji používá metanol/voda, acetonitril/voda nebo metanol/acetonitril/voda a slabé kyseliny (kyselina octová nebo mravenčí) nebo kyselé pufrы (mravenčan amonný, octan amonný). Slabé kyseliny se přidávají do mobilní fáze v koncentraci 0,005–0,05 %. Kyselina mravenčí a kyselina octová se doporučují pro přípravu mobilní fáze s nízkým pH při použití elektrospreje, kyselina trifluoroctová pro stanovení proteinů nebo peptidů, ale není vhodná pro stanovení v negativním modu. Nízké pH mobilní fáze podporuje ionizaci analytu s bazickými funkčními skupinami. Kyselinu trifluoroctovou je možné také použít ke snížení „chvostování“ piků

a spolu s kyselinou propionovou k potlačení matricového efektu u zásaditých látek. Samozřejmě musí být optimalizovány i parametry jako průtok plynu, teplota analýzy a další [4, 7].

Matricové efekty

Jak již bylo v textu několikrát zmíněno, matricové efekty mají velký význam při stanovování léků a jejich metabolitů za použití HPLC-MS. Matricové efekty lze definovat jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou. Vznikají jako výsledek soupeření mezi netěkavými složkami matrice a analytem. Mechanismů, které způsobují matricové efekty, je mnoho a ne všechny jsou zcela objasněny. Rozdíly v mechanismech ovlivnění ionizace se samozřejmě liší i podle použité ionizační techniky. Předpokládá se, že hlavní příčina vychází z principu ionizace. Je dána změnou ve vlastnostech kapky vznikající při ionizaci, což způsobí přítomnost netěkavých nebo málo těkavých látek, které změní účinnost vytváření kapky nebo její vypařování. Výsledkem je změna v množství iontů v plynné fázi, které nakonec doputují do detektoru. Matricový efekt zahrnuje jak potlačení, tak zvýšení ionizace. Potlačení ionizace může způsobit zkřížená reakce mezi stanovovanou látkou, metabolity nebo vnitřním standardem. Zvýšení ionizace může být naopak způsobeno fragmentací metabolitů ve zdroji nebo silnou vazbou látky na biologickou matici. Důsledkem těchto procesů je snížení nebo zvýšení odezvy. Matricové efekty nejsou předvídatelné. Ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je vůči matricovým efektům méně citlivá než elektrosprej [1, 2].

Také některé složky mobilní fáze mohou způsobit matricový efekt. Mezi tyto složky patří kyseliny trifluoroctová, přídavky směsi kyseliny propionové a izopropanolu za kolonou, ale také přidání kyseliny octové a kyseliny propionové k mobilní fázi, která obsahuje kyselinu trifluoroctovou. Vznik matricového efektu mohou způsobit i exogenní materiály. Polymery obsažené v různých odběrových plastických nádobách nebo některá antikoagulantia, např. heparin litný, který se běžně používá. Rozdílný matricový efekt se může objevit jak při analýze standardních vzorků, tak při analýze biologického materiálu [2, 3].

Matricové efekty jsou pozorovány u obou typů ionizace, ale mnohem více se projevují u ESI. ESI je významně ovlivněna látkami v širokém rozsahu jejich polarit, zatímco APCI je ovlivňována především hydrofobními komponentami. Velké rozdíly jsou pozorovány u jednotlivých technik úpravy vzorku. Precipitace proteinů acetonitrem u LC-ESI-MS/MS vykazuje největší matricový efekt s mohutnou supresí, zejména na začátku a na konci chromatogramu; díky neselektivní precipitaci proteinů je tzv. „přečištění“ biologického materiálu nedostatečné. Tímto způsobem se dostatečně neodstraní lipidy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Ty mohou být příčinou snížení ionizace u látek, které mají krátký retenční čas. SPE umožňuje mnohem intenzivnější přečištění biologického vzorku, ale na druhé straně dochází ke zvýšení koncentrace cílového analytu a spolu s ním i ke zvýšení koncentrace interferujících substancí,

čímž dochází ve výsledku k poměrně silnému matricovému efektu. Matricové komponenty charakteristické pro jednotlivé biologické materiály interferují v různých časech a v rozdílném rozsahu v průběhu analýzy. Při analýze moči se nejvíce uplatňují hydrofobní reziduální komponenty, zejména anorganické soli. Analýzou slin bylo prokázáno větší množství interferujících látek při použití ESI hydrofilní i hydrofobní povahy – aminokyseliny, proteiny a mucin [5].

Matricový efekt může ovlivnit jak kvalitu, tak kvantitu. Běžně se používají dvě metody hodnocení matricového efektu: infuze standardu analyzované látky za kolonou nebo standardní přírůstek po extrakci. Post-kolonovou infuzí se zjišťuje kvalitativní matricový efekt. Při post-kolonovém dávkování je na kolonu nastříkovan slepý vzorek a konstantní množství analytu je vstříkováno přímo do iontového zdroje. Vše probíhá za podmínek, které se používají při analýze. Určí se oblast chromatogramu, kde může pravděpodobně docházet k matricovým efektům. Tento způsob lze použít u stanovení s malým počtem analytů nebo u vzorků se stejnou biologickou matricí. U vícerozložkových metod se používá přímé porovnání. Matricový efekt je zjišťován přímo během analýzy. Měří se několik vzorků o stejné koncentraci analytu a vnitřního standardu v roztoku bez matrice, slepý vzorek matrice používané pro přípravu standardů, kalibrátorů a blank matrice získaný z různých zdrojů. Za matricový efekt je považováno, jestliže rozdíl odezvy v matricích je větší než 25 %. Pokud je nižší, lze metodu použít ke kvantifikaci. Standardní přírůstek po extrakci vzorku slouží ke kvantitativnímu hodnocení [2].

K potlačení matricového efektu může dojít použitím malých objemů nastříkovaných na kolonu, nařazením vzorku, vhodnou úpravou vzorku anebo chromatografických podmínek, použitím vnitřního standardu, popř. použitím metody standardního přírůstku. Při použití vnitřního standardu se předpokládá, že bude stejně ovlivněn matricovým efektem jako analyt.

Matricové efekty jsou jedny z mnoha důležitých příčin chyb v LC/MS/MS. Jejich pochopení je velice důležité pro úspěšnou validaci [2, 3].

Validace metody

Poté, co byly optimalizovány veškeré podmínky analýzy, může být provedena validace metody. Na validaci HPLC-MS metody jsou kladeny některé specifické požadavky.

Linearita

Linearita musí být testována pro všechny stanovené léky a jejich metabolity v celém koncentračním rozsahu klinických aplikací. Kalibrační křivka by měla být sestavena alespoň z 6 kalibračních bodů. Jednotlivé kalibrační standardy by měly být připraveny ve stejné matrici, jako bude biologický materiál, ze kterého bude analýza prováděna. Pouze v některých případech (tkáň, ultrafiltrát) je možné použít kalibrační standard, který nebude rozpuštěn ve stejné matrici. Nejnižší bod kalibrační křivky by měl mít hodnotu dolní meze stanovitelnosti (LLOQ). Rovnice regrese, která je funkcí kalibrační závislosti, nesmí být v průběhu analýz měněna. Akceptovatelná odchylka pro LLOQ je 20 %, pro ostatní kalibrační standardy 15 % [7].

vitelnosti (LLOQ). Rovnice regrese, která je funkcí kalibrační závislosti, nesmí být v průběhu analýz měněna. Akceptovatelná odchylka pro LLOQ je 20 %, pro ostatní kalibrační standardy 15 % [7].

Bias a přesnost

Pravdivost a přesnost metody je stanovována analýzou 5 kontrolních vzorků na 5 hladinách v testovaném rozsahu linearity:

1. kontrolní vzorek by měl mít koncentraci nejnižšího nenulového standardu kalibrační křivky, čili dolní mez stanovitelnosti.
2. kontrolní vzorek by měl mít koncentraci nejvyššího standardu kalibrační křivky.
3. kontrolní vzorek (nízká kontrola) by měl mít koncentraci rovnou trojnásobku hodnoty dolní meze stanovitelnosti.
4. kontrolní vzorek (střední kontrola) by měl mít koncentraci standardu nacházejícího se uprostřed kalibrační křivky.
5. kontrolní vzorek (vysoká kontrola) by měl mít vysokou koncentraci, ale nižší než poslední bod kalibrační křivky.

Může být používán i 6. kontrolní vzorek o koncentraci vyšší než poslední bod kalibrační křivky, který je následně nařazen na koncentraci v testovaném rozsahu linearity. Správnost i přesnost má být stanovena i pro vzorky, které jsou limitované objemem (pediatrické vzorky), a to při ředění 1 : 1 a 1 : 4. Vzorky musí být ředěny stejným biologickým materiálem s nulovou hodnotou analytu, ve kterém budou stanovovány. Opakovatelnost je třeba měřit u 5 vzorků od každé kontroly v jednom dni, reprodukovatelnost u 1 vzorku od každé kontroly v pěti následujících dnech. Akceptovatelná odchylka na hladině meze stanovitelnosti je 20 %, u ostatních kontrolních vzorků 15 % [7].

Analytická selektivita

Schopnost analytické metody správně a přesně detekovat analyt v přítomnosti ostatních interferujících látek je důležitá právě u LC-MS. Provádí se testováním nulových vzorků matrice, vzorků obsahujících standard bez přítomnosti matrice a kalibračních vzorků na hladině meze stanovitelnosti. U každého vzorku je testována míra interference tím, že se stanoví velikost a rozptýl signálů pozadí a významnost těchto signálů vzhledem k výsledku kalibračního standardu [3, 7].

Stabilita

Stabilita musí být testována v průběhu celého procesu. Měla by být testována stabilita vnitřního standardu, zejména deuterovaného IS, stabilita zásobních kalibračních roztoků, ale i stabilita matrice. Je zkoumána stabilita vzorků při skladování při -4 °C, -20 °C a -80 °C a při samotné analýze v autosampleru. Dále by měla být otestována stabilita vzorků při opakovaném rozmrazování [7].

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií se vyznačuje vysokou přesností, širokou oblastí použití, výrazným zkrácením délky analýzy. Pro úspěšnou detekci léků je nezbytné zvolit nejen vhod-

nou chromatografickou metodu, ale zejména adekvátní způsob úpravy vzorku. Všechny kroky při vývoji metody spolu úzce souvisí a v průběhu vývoje musí být opakovaně optimalizovány. Mnoho parametrů, které jsou měřeny v průběhu validace HPLC-MS metody, je stejných jako u jiných analytických metod, ale u HPLC-MS je nezbytné pro vývoj a validaci robustní a spolehlivé analytické metody testování vlivu matricových efektů.

Literatura

1. **Hoffmann, E., Stroobant, V.** *Mass Spectrometry Principles and Application*. Wiley-Interscience, 3rd edition, Chichester, 2007, p. 15–60. ISBN-13: 978-0470033111.
2. **Korfmaier, W. A. et al.** *Using mass spectrometry for drug metabolism studies*, 1st edition, CRC Press, 2004, p. 103–129. ISBN-13: 978-0849319631.
3. **Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y.** Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J. of Chromatography B*, 2009, 887, p. 2198–2207.
4. **Rossi, D. T., Sinz, M. et al.** *Mass Spectrometry in drug discovery*, 1. edition, CRC Press, 2001, p. 125–142, 171–195. ISBN-13: 978-0824706074.

5. **Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E., Murphy, C. M.** Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14, p. 1290–1294.
6. **Oliveira, E. J., Watson D. G.** Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Biomed Chromatogr.*, 2000, 14, s. 351–372.
7. **Taylor, P. J.** *Method development and optimisation of LC-MS (Chapter 2)*. In: *Polettini, A., ed. Application of liquid chromatography-mass spectrometry in toxicology*. London: Pharmaceutical Press, 2006.

Do redakce došlo dne 18. 8. 2010.

Adresa pro korespondenci:
Ing. Eva Klapková, Ph.D.
Ústav klinické biochemie a patobiochemie
UK 2. LF a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5-Motol
e-mail: eva.klapkova@email.cz