

## **Bachelorproef**

Ontwikkeling en Validatie van een LC-MS/MS Methode  
voor de Kwantificatie van Cafeïne in Verschillende  
Soorten Koffie en Thee

BioNotus  
Galileilaan 15, 2845 Niel

Yeghig Armoudjian  
Senior Scientist Bioanalysis

## **Jaron Willems**

Departement Gezondheid, Design & Technologie  
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie  
Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie  
2023-2024



## **Bachelorproef**

Ontwikkeling en Validatie van een LC-MS/MS Methode  
voor de Kwantificatie van Cafeïne in Verschillende  
Soorten Koffie en Thee

BioNotus  
Galileilaan 15, 2845 Niel

Yeghig Armoudjian  
Senior Scientist Bioanalysis

## **Jaron Willems**

Departement Gezondheid, Design & Technologie  
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie  
Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie  
2023-2024

# Voorwoord

---

In het kader van de stageperiode die deel uitmaakt van de opleiding Biomedische Laboratoriumtechnologie, heb ik in de loop van het tweede semester van het academiejaar 2023-2024 de mogelijkheid gehad om grondig kennis te maken met de bedrijfswereld. De volledige stage omvatte een bachelorproef (12 weken) en een vakkenstage (8 weken) die in totaal 20 weken in beslag namen.

Ik heb mijn volledige stage mogen volbrengen bij BioNotus, een jong bedrijf dat in 2024 zijn zevende verjaardag heeft kunnen vieren. Het is gesitueerd in het wetenschapspark van de Universiteit Antwerpen en specialiseert zich in bioanalyses en pharmacometrics. Mijn bijzondere dank gaat uit naar de heren Johan Van Daele en Pieter Annaert, oprichters van het voornoemde bedrijf, die snel reageerden op mijn sollicitatiemail en mij uitnodigden om een bedrijfsbezoek te maken op 23 september 2023. Dit bezoek mondde uit op een onderling akkoord, samen met de toestemming van de hogeschool Erasmus, om mijn volledige stageperiode binnen het bedrijf BioNotus te volbrengen. Mijn dank gaat eveneens uit naar mijn stagementor de heer Yeghig Armoudjian voor zijn deskundige uitleg gedurende de gehele stageperiode, alsook voor zijn advies bij het uitvoeren van het onderzoeksproject en het schrijven van deze bachelorproef. Verder wil ik mijn dank uiten naar de andere leden van het BioNotus-team voor de manier waarop ze mij verwelkomd en opgenomen hebben in de groep.

Graag wil ik eveneens mevrouw Ine Van Nieuwenhove bedanken voor mij op te volgen gedurende mijn stageperiode, alsook voor haar kritische en opbouwende feedback die ze gaf omtrent dit eindwerk. Haar adviezen en ideeën hebben bijgedragen om deze thesis tot een hoger niveau te verheffen. Mevrouw Stefanie Mot bedank ik evenzeer voor haar hulp bij het tot stand brengen van deze stage.

Tenslotte een dankwoord aan mijn grootvader Eddy De Cooman die zich steeds heeft geprofileerd als mijn begeleider met raad en daad alsook aan mijn ouders voor hun steun en vertrouwen in mij.

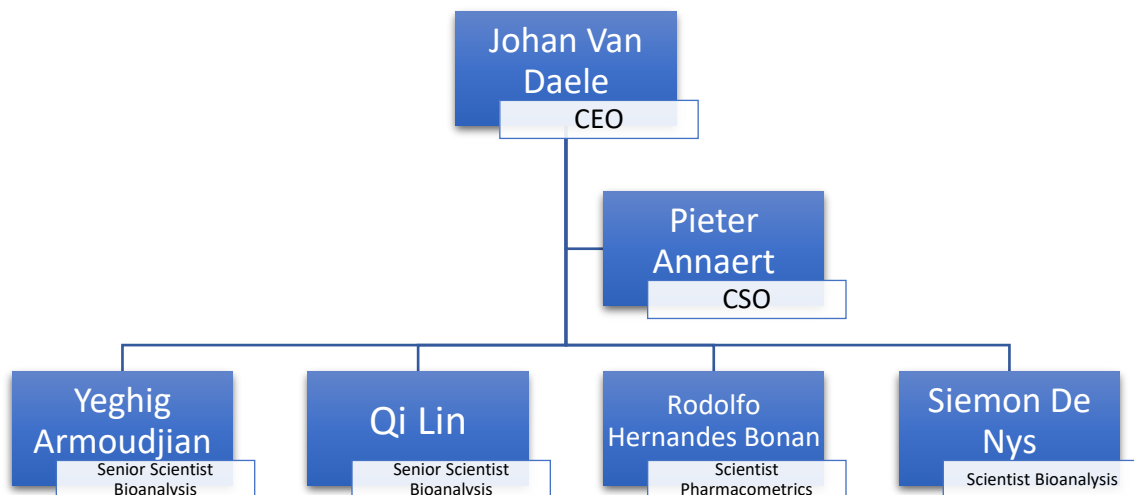
# Organigram

---

BioNotus werd in het tweede kwartaal van 2017 opgericht door jeugdvrienden Johan Van Daele en Pieter Annaert die elkaar hebben leren kennen in 1989 toen ze beide studenten farmacie waren aan de KU Leuven. BioNotus beschikt vandaag over een getalenteerd team van wetenschappers gespecialiseerd in bioanalyse, pharmacometrics (PMX) en in vitro Absorptie, distributie, metabolisatie, excretie en toxiciteit (ADMET) evaluatie.

Bioanalyses omvatten kwantitatieve bepalingen van analytconcentraties in biologische matrices. Het bedrijf ontwikkelt en valideert hiervoor robuuste bioanalytische methoden die toegepast worden op basis van state-of-the-art analytisch-chemische technologieën. Eén van de technieken die het meest gebruikt wordt binnen het bedrijf is Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). De bioanalysten zijn gespecialiseerd in de ontwikkeling van deze analytische methoden omdat deze voldoen aan de fit-for-purpose behoeften van haar klanten. Deze methodeontwikkeling gebeurt altijd volgens de richtlijnen die opgegeven worden door het International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use/European Medicines Agency (ICH/EMA) en de Food and Drug Administration (FDA).

BioNotus streeft ernaar om op maat gemaakte oplossingen te blijven bieden aan haar klanten om zo de ontdekking en de ontwikkeling van de toekomstige medicijnen te versnellen.



Figuur 1: Organigram BioNotus

# Inhoudsopgave

---

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Voorwoord                                                                  | 1  |
| Organigram                                                                 | 2  |
| Afkortingenlijst                                                           | 5  |
| Abstract (NI)                                                              | 6  |
| Abstract (Eng)                                                             | 7  |
| 1. Introductie                                                             | 8  |
| 2. Literatuurstudie                                                        | 9  |
| 2.1 Cafeïne                                                                | 9  |
| 2.1.1 Structuur en parameters                                              | 9  |
| 2.1.2 Effecten en metabolisatie                                            | 9  |
| 2.1.3 Bronnen                                                              | 10 |
| 2.1.4 Aanbevolen dagelijkse hoeveelheid (ADH)                              | 10 |
| 2.2 Chromatografische analysemethode                                       | 11 |
| 2.2.1 Inleiding                                                            | 11 |
| 2.2.2 Chromatografische parameters                                         | 11 |
| 2.2.3 Piekverbreding                                                       | 15 |
| 2.2.4 (U)HPLC                                                              | 16 |
| 2.2.5 Detectiemethode   ESI-MS/MS                                          | 17 |
| 3. Materiaal en methoden                                                   | 19 |
| 3.1 Chemicaliën en reagentia                                               | 19 |
| 3.2 Apparatuur                                                             | 19 |
| 3.3 MS tuning                                                              | 22 |
| 3.4 Chromatografie scouting en ontwikkeling                                | 23 |
| 3.4.1 Automatische scouting                                                | 23 |
| 3.4.2 Verdere manuele ontwikkeling                                         | 25 |
| 3.5 Bereiding van kalibratie standaarden en quality control samples (QC's) | 25 |

|       |                                                 |    |
|-------|-------------------------------------------------|----|
| 4.    | Resultaten en discussie                         | 27 |
| 4.1   | MS tuning                                       | 27 |
| 4.2   | Chromatografie scouting en ontwikkeling         | 29 |
| 4.2.1 | Automatische scouting                           | 29 |
| 4.2.2 | Verdere manuele ontwikkeling                    | 30 |
| 4.3   | Validatie                                       | 32 |
| 4.3.1 | Selectiviteit/specificiteit                     | 32 |
| 4.3.2 | Lineariteit en kwantificatielimiet (LLOQ)       | 33 |
| 4.3.3 | Carryover                                       | 34 |
| 4.3.4 | Precisie, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid | 35 |
| 5.    | Troubleshooting van een LC-MS/MS methode        | 36 |
| 6.    | Conclusie                                       | 37 |
| 7.    | Referenties                                     | 38 |
| 8.    | Bijlagen                                        | 41 |

## Afkortingenlijst

| <b>Begrip</b> | <b>Verklaring</b>                                                                                   |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADH           | Aanbevolen Dagelijkse Hoeveelheid                                                                   |
| ADMET         | Absorptie, distributie, metabolisatie, excretie en toxiciteit                                       |
| ATL           | Atenolol                                                                                            |
| AZ            | Azijnzuur                                                                                           |
| BEH           | Ethylene Bridged Hybrid                                                                             |
| CAF           | Cafeïne                                                                                             |
| CZS           | Centraal Zenuwstelsel                                                                               |
| EMA           | European Medicines Agency                                                                           |
| ESI           | Elektrospray Ionisatie                                                                              |
| FDA           | Food and Drug Administration                                                                        |
| FOD           | Federale Overheidsdienst                                                                            |
| HETP          | Height Equivalent of Theoretical Plates                                                             |
| HGR           | Hoge Gezondheidsraad                                                                                |
| HILIC         | Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography                                                       |
| HSS           | High Strength Silica                                                                                |
| ICH           | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use |
| LC-MS/MS      | Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry                                                      |
| MeCN          | Methyl Cyanide                                                                                      |
| MF            | Mobiele Fase                                                                                        |
| MRM           | Multiple Reaction Monitoring                                                                        |
| MS            | Massa Spectrometrie                                                                                 |
| MTX           | Methotrexaat                                                                                        |
| MW            | Molecular Weight                                                                                    |
| MZ            | Methaanzuur                                                                                         |
| PAR           | Paracetamol                                                                                         |
| PRL           | Propranolol                                                                                         |
| QC's          | Quality Control Samples                                                                             |
| SF            | Stationaire Fase                                                                                    |
| SUL           | Sulfasalazine                                                                                       |
| UHPLC         | Ultra-High-Performance Liquid Chromatography                                                        |



## Ontwikkeling en Validatie van een LC-MS/MS Methode voor de Kwantificatie van Cafeïne in Verschillende Soorten Koffie en Thee

---

Jaron Willems

Yeghig Armoudjian

Ine van Nieuwenhove

---

### Abstract (NI)

#### Achtergrond

Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) gekoppeld aan tandem massa spectrometrie (MS/MS) is een uitermate geschikte techniek voor het uitvoeren van gerichte analyses op een brede waaier aan moleculen. De techniek kent zowel kwantitatieve als kwalitatieve toepassingen en wordt gekarakteriseerd door zijn hoge gevoeligheid, selectiviteit, precisie en nauwkeurigheid.

#### Doel

Het doel van dit onderzoekswerk is om een LC-MS/MS methode te ontwikkelen en te valideren dat gebruikt kan worden voor de detectie en de kwantificatie van cafeïne in verschillende soorten koffie en thee.

#### Methode

Het proces van de LC-MS/MS methodeontwikkeling werd stapsgewijs uitgevoerd. Eerst werden de MS parameters geoptimaliseerd voor de detectie van cafeïne en de interne standaard paracetamol. Vervolgens werd de chromatografische methode ontwikkeld met als doel de geschikte combinatie van mobiele en stationaire fases te vinden, alsook een goede flowsnelheid, eventuele gradiënt en analysetijd. Tot slot werden de lineariteit, carryover, reproduceerbaarheid, selectiviteit, sensitiviteit, precisie en nauwkeurigheid van de methode nagegaan volgens de ICH Q2 richtlijnen.

#### Resultaten

De transities die gekozen werden voor de kwantificatie van cafeïne en paracetamol waren respectievelijk 195/138 en 152/93. Verder werden de transities 195/110 en 152/110 gebruikt als kwalitatieve controle. De finale chromatografische analysemethode maakte gebruik van een Kinetex<sup>®</sup> C8 (100 x 2,1 mm) analytische kolom als stationaire fase, 10 mM ammoniumformaat + 0,1% methaanzuur in water als mobiele fase A, methanol als mobiele fase B, respectievelijk ingesteld op 75% en 25%. De flowsnelheid werd ingesteld op 0,4 mL/min, het injectievolume en de analysetijd bedroegen 2 µL en 3,0 minuten. De validatieparameters waren allemaal binnen de acceptatiegrenzen, behalve de carryover.

#### Conclusie

Het doel van dit onderzoekswerk werd bereikt door een LC-MS/MS analysemethode te ontwikkelen die gebruikt kan worden voor de kwantificatie van cafeïne in koffie en thee. De validatie was nagenoeg volledig conform aan de Q2 en M10 richtlijnen van het ICH en geeft blijk dat de methode geschikt is voor gebruik.

## LC-MS/MS Method Development and Validation for the Quantification of Caffeine in Different Kinds of Coffee and Tea

---

Jaron Willems

Yeghig Armoudjian

Ine van Nieuwenhove

---

### Abstract (Eng)

#### Background

Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) is a highly suitable technique for performing targeted analyses on a wide range of molecules. The technique has both quantitative and qualitative applications and is characterised by its high sensitivity, selectivity, precision and accuracy.

#### Objective

The aim of this research work is to develop and validate an LC-MS/MS method that can be used for the detection and quantification of caffeine in different types of coffee and tea.

#### Method

The process of LC-MS/MS method development was carried out in a stepwise manner. First, the MS parameters were optimised for the detection of caffeine and the internal standard paracetamol. Next, the chromatographic method was developed with the aim of finding the appropriate combination of mobile and stationary phases, as well as a good flow rate, possible gradient and analysis time. Finally, linearity, carryover, reproducibility, selectivity, sensitivity, precision and accuracy of the method were evaluated according to the ICH Q2 guidelines.

#### Results

The transitions chosen for the quantification of caffeine and paracetamol were 195/138 and 152/93 respectively. Furthermore, transitions 195/110 and 152/110 were used as qualitative controls. The final chromatographic analytical method used a Kinetex® C8 (100 x 2.1 mm) analytical column as stationary phase, 10 mM ammonium formate + 0.1% formic acid in water as mobile phase A, methanol as mobile phase B, set to 75% and 25% respectively. Flow rate was adjusted to 0.4 mL/min, injection volume and analysis time were 2 µL and 3.0 minutes. The validation parameters were all within the limits of acceptance, except for the carryover.

#### Conclusion

The aim of this research work was achieved by developing an LC-MS/MS analytical method that can be used for the quantification of caffeine in coffee and tea. The validation was almost fully compliant with the Q2 and M10 guidelines of the ICH and shows that the method is suitable for use.

# 1. Introductie

---

De rol die analytische laboratoria vandaag de dag vervullen in onze maatschappij is haast niet meer te overzien. Ze spelen een essentiële rol bij de uitvoering van analyses en tests op verschillende soorten monsters die erg kunnen variëren van waterstalen tot lichaamsvloeistoffen. Deze laboratoria zijn terug te vinden in diverse sectoren en dragen bij tot verschillende facetten van kwaliteitswaarborging, veiligheid en wetenschappelijk onderzoek. In de praktijk streeft men naar de ontwikkeling van nieuwe onderzoeksmethodes die een verbetering met zich meebrengen op vlak van gevoeligheid, selectiviteit, nauwkeurigheid, precisie, robuustheid en meetbereik. Een voorbeeld van zo een onderzoeksmethode is chromatografie, een techniek die in het begin van de 20<sup>ste</sup> eeuw ontwikkeld is door Michail Tsvet en ondertussen is uitgegroeid tot een universeel veelgebruikte techniek doordat het de onderzoeker in staat stelt om verschillende componenten te scheiden, te identificeren en op te zuiveren. Deze chromatografische onderzoeksmethodes maken doorgaans gebruik van apparatuur voor het verschaffen van kwaliteitsvolle data. Een voorbeeld hiervan is Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) gekoppeld aan tandem massa spectrometrie (MS/MS). Deze techniek is uitermate geschikt wanneer men een gerichte analyse wenst uit te voeren omwille de hoge gevoeligheid, selectiviteit, precisie en nauwkeurigheid. Vanwege deze karakteristieken wordt deze techniek regelmatig toegepast bij geneesmiddelenontwikkeling waarbij onderzoekslaboratoria niet altijd beschikken over deze geschikte apparatuur en dus beroep doen op analytische laboratoria voor kwantitatieve en/of kwalitatieve analyses.

Om professioneel vertrouwd te geraken met deze zojuist vernoemde gesofisticeerde analysetechniek en om bekend te geraken met hoe de methodeontwikkeling, die gebruik maakt van deze techniek, in zijn werk gaat, werd voor het schrijven van deze thesis een methode ontwikkeld voor de kwantitatieve bepaling van cafeïne in verschillende soorten koffie en thee. De reden waarom er voor deze toepassing gekozen werd is omwille van de maatschappelijke relevantie van dit onderwerp. Koffie en, in mindere mate, thee worden aanschouwd als de meest geconsumeerde cafeïnerijke dranken in de wereld. Omwille van de brede waaier aan effecten, zowel positief als negatief, dat cafeïne kan hebben op het menselijk lichaam is het van groot belang dat men weet hoeveel men exact consumeert wanneer men hiervoor kiest. De methodeontwikkeling vormt het centrale thema van dit werk en geeft een inzicht in hoe de workflow hiervan binnen een analytisch labo eruitziet. De literatuurstudie die voorafgaat aan deze methodeontwikkeling vormt een belangrijke theoretische basis waarin er dieper wordt ingegaan op essentiële informatie omtrent de gehanteerde analysetechniek, alsook de stof die centraal staat in deze thesis namelijk cafeïne. Hoofdstuk vier van dit werk handelt over de resultaten van het onderzoekswerk en de discussie. Hierna volgt er een korte troubleshooting over een project waaraan een bijdrage werd geleverd gedurende de stageperiode. Tot slot zal een conclusie gevormd worden omtrent dit werk.

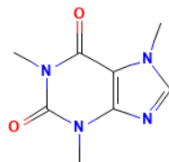
## 2. Literatuurstudie

---

### 2.1 Cafeïne

#### 2.1.1 Structuur en parameters

Cafeïne (1,3,7-trimethylxanthine), ook wel coffeïne, theïne, matheïne en guaranine genoemd, is een plantaardige alkaloïde met de chemische structuurformule  $C_8H_{10}N_4O_2$  (Fig.2) en heeft een molecuulmassa van 194,19 g/mol. Structureel kan cafeïne, samen met de andere methylxanthines (xanthine, theofylline en theobromine) ingedeeld worden in de klasse van de purines. Een belangrijke parameter voor chromatografie is de log P. Deze parameter wordt gedefinieerd als het logaritme van de verdelingscoëfficiënt van een opgeloste stof tussen octanol en water, bij een bijna oneindige verdunning (Berger et al., 2022). Het geeft een idee over de hydrofliciteit en de polariteit van een molecuul. De log P van cafeïne bedraagt -0,07 wat indiceert dat cafeïne eerder hydrofiel is. De  $pK_a$  waarde, ook wel de zuurconstante genoemd, is de maat voor de sterkte van een zuur. De  $pK_a$  waarde van cafeïne bedraagt 14,0 wat aangeeft dat deze stof zich gedraagt als een zeer sterke base (NCBI, 2001 & 2024). Het is met andere woorden in staat om gemakkelijk een proton te accepteren. De stof heeft in water een oplosbaarheid van 2,17 g/100 mL en is daarom volgens de Europese Farmacopee per definitie 'weinig oplosbaar' (Ph. Eur.).



*Figuur 2: Chemische structuurformule van cafeïne (NCBI, 2024)*

#### 2.1.2 Effecten en metabolisatie

Cafeïne heeft vele effecten op het menselijk lichaam waaronder positieve en negatieve. Het is over het algemeen geweten dat het een stimulerende werking heeft ter hoogte van het centrale zenuwstelsel (CZS), maar de activiteit van de stof heeft ook betrekking op andere systemen waaronder het immuunsysteem, het spijsverteringsstelsel, het ademhalingsstelsel, de urinewegen, enzovoort (Rodak et al., 2021). Cafeïne veroorzaakt het merendeel van zijn effecten door reversibel te binden aan alle types adenosinereceptoren ( $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$ ,  $A_3R$ ) en dus de werking van adenosine, het vertragen van de signaaltransductie in het CSZ, tegen te gaan. Het grootste deel van de metabolisatie (ca. 80%) van cafeïne vindt plaats in de lever. Het iso-enzym CYP1A2 is hiervoor verantwoordelijk. Het enzym zorgt voor de 3-demethylatie waardoor het primair metaboliet 1-7-dimethylxanthine (paraxanthine) wordt gevormd.

Belangrijk om te vermelden is dat cafeïne zelf ook een inductor is van CYP1A2 waardoor het de eigen metabolisatie versnelt. Het iso-enzym zorgt ook voor de 1- en 7-demethylatie van cafeïne met de vorming van 3,7-dimethylxanthine (theobromine) en 1,3-dimethylxanthine (theofylline) (Arnaud, 2011).

### 2.1.3 Bronnen

Koffie is uiteraard de primaire bron van cafeïne, doch kan het ook aanwezig zijn in andere soorten planten zoals theebladeren, cacaobonen en guarana. Hiernaast is cafeïne rijk aanwezig in vele soorten energiedranken en frisdranken, alsook soorten kauwgom, bepaalde voedingssupplementen en sommige medicatie voornamelijk in de vorm van gelulen en tabletten (Mahoney, 2019 & Heckman, 2010).

### 2.1.4 Aanbevolen dagelijkse hoeveelheid (ADH)

In 2012 werd een rapport gepubliceerd door de Belgische Hoge Gezondheidsraad (HGR) omtrent het gebruik van cafeïne in voedingsmiddelen, waaronder frisdranken en voedingssupplementen. Dit rapport was het resultaat van een vraag voor advies van de Federale Overheidsdienst (FOD) Volksgezondheid aan de Gezondheidsraad. Het advies van de Raad werd aangevraagd voor een tiental onderwerpen waaronder: “de veilige maximumgehalten (UL: tolerable Upper intake Level), eventueel in functie van de variërende mate van gevoeligheid van specifieke bevolkingsgroepen”.

Onder dit punt haalt het rapport het verslag aan van de Nieuw-Zeelandse overheid voor voedselveiligheid (New Zealand Food Safety Authority, 2010b) waarin wordt gesteld dat er “thans helemaal geen erkende referentiewaarde bestaat m.b.t. de blootstelling aan cafeïne”. Bijgevolg verwijzen de deskundigen naar verschillende studies en blootstellingsgrenzen die voor verschillende bevolkingsgroepen worden vermeld. De volgende gegevens zijn waarden die de HGR in hun advies nuttig acht en naar verwijst:

Voor zowel de algemene bevolking als kinderen gelden nog steeds de gegevens van Nawrot et al. (2003) als referentie. Deze beweren dat bij gezonde volwassenen een cafeïneblootstelling van 5,7 mg/kg/dag (400 mg/dag voor een volwassene van 70 kg) niet gepaard gaat met ongewenste effecten zoals algemene toxiciteit, cardiovasculaire effecten, gedragswijzigingen, verhoogde frequentie van kanker en een aangetaste vruchtbaarheid bij mannen. Deze hoeveelheid cafeïne komt overeen met vier tot vijf kopjes koffie per dag. Sommige auteurs leggen de grenswaarde op 3 mg/kg/dag (210 mg/dag voor een man van 70 kg) omwille van het feit dat men boven deze waarde een toename van angstgevoelens kan vaststellen.

Voor kinderen tot en met 12 jaar wordt 2,5 mg/kg/dag beschouwd als de grenswaarde waarboven gedragswijzigingen kunnen optreden zoals angstgevoelens, maar ook schade berokkend kan worden in het centraal zenuwstelsel tijdens de ontwikkeling. Voor vrouwen in de vruchtbare leeftijd gelden de volgende aanbevelingen: hoogstens 300 mg/dag (Nawrot et al., 2003) of zelfs 200 mg/dag (FSA, 2008).

## 2.2 Chromatografische analysemethode

### 2.2.1 Inleiding

Chromatografie is een verzameling van verschillende scheidingstechnieken waarbij de componenten van een mengsel gescheiden worden tussen twee fases, een stationaire fase en een mobiele fase. Deze technieken kennen zowel kwalitatieve als kwantitatieve toepassingen en stellen de analist in staat om componenten te scheiden, te identificeren en op te zuiveren. Afhankelijk van de chromatografische techniek die gehanteerd wordt, kan de scheiding gebeuren op basis van verschillende eigenschappen van de moleculen zoals: grootte, vorm, lading, hydrofobiciteit en polariteit. Op basis van de aggregatietoestand van de mobiele fase kunnen deze technieken verdeeld worden over twee klassen: de gaschromatografie en de vloeistofchromatografie (Coskun, 2016). Vloeistofchromatografie kan verder onderverdeeld worden tussen omgekeerde fase en normale fase chromatografie. Bij normale fase chromatografie is de stationaire fase hydrofiel en de mobiele fase hydrofoob. Het tegengestelde geldt voor omgekeerde fase chromatografie (ThermoFisher, 2019).

In de praktijk wordt chromatografie voornamelijk toegepast onder de vorm van geavanceerde toestellen. Deze toestellen bevatten doorgaans dezelfde onderdelen nl.: een solventreservoir voor de mobiele fase, een ontgasser, een pompsysteem, een autosampler, een kolomoven met daarin de analytische kolom en tot slot een detector (CHROMacademy, z.d). Dankzij deze analysetechniek worden mogelijks interfererende stoffen gescheiden van de component(en) waarin men geïnteresseerd is dankzij een verschil in snelheid waarmee de componenten zich verplaatsen. Dit wordt gedefinieerd als de 'retentietijd' (ThermoFisher, 2019). Het belang van chromatografie in analytische toepassingen kan niet genoeg worden benadrukt omwille van de mogelijkheid die het biedt om structureel zeer gelijkaardige moleculen van elkaar te scheiden (Agilent, 1998).

### 2.2.2 Chromatografische parameters

De eerste en mogelijk de belangrijkste parameter binnen chromatografie is resolutie. Bij een chromatografische analyse opteert men steeds om de optimum resolutie te bekomen binnen een zo kort mogelijke tijdspanne. De resolutie wordt steeds uitgedrukt door middel van een numerieke waarde en kan gedefinieerd worden als de mate waarin twee pieken op een chromatogram van elkaar gescheiden zijn. Wanneer de resolutie een waarde heeft groter of gelijk aan 1,5 dan kan men

vaststellen dat de componenten van het staal goed van elkaar gescheiden zijn. Men spreekt ook wel van ‘baseline separation’. De resolutie staat tevens in functie van drie andere parameters en wordt uitgedrukt door middel van de onderstaande vergelijking (Fig. 3). De verschillende parameters zijn de retentiefactor ( $k$ ), de selectiviteit ( $\alpha$ ) en de efficiëntie van de pieken ( $N$ ) (CHROMacademy, z.d.).

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k}$$

Efficiency    Selectivity    Retention

Figuur 3: Fundamentele Vergelijking van de Resolutie (CHROMacademy, z.d.)

De retentiefactor kan worden gedefinieerd als de mate waarin een component wordt tegengehouden door een chromatografische kolom (CHROMacademy & Sigma-Aldrich). De retentiefactor kan berekend worden via onderstaande vergelijking (Fig.4) waarbij  $t_R$  de retentietijd is van het analyt en  $t_0$  de retentietijd is van een component die niet wordt tegengehouden door de chromatografische kolom. Dit laatste wordt ook wel gedefinieerd als de ‘dode tijd’ en kan bepaald worden door de elutietijd van de mobiele fase te bepalen (CHROMacademy, z.d.). Een alternatief hiervoor is het bepalen van de retentietijd van uracil, dit is echter enkel geldig voor de omgekeerde fase chromatografie. In de praktijk probeert men  $k$ -waarden te bekomen tussen 1 en 10 omdat deze aanleiding geven tot een goede scheiding. Belangrijk hierbij is dat de  $k$ -waarden tussen 1 en 5 de grootste toename in resolutie veroorzaken, terwijl de  $k$ -waarden groter dan 10 proportioneel een veel kleinere stijging teweegbrengen. De analysetijd zal daarentegen wel steeds toenemen naarmate de waarde van de retentiefactor groter wordt. De meest efficiënte manier om de retentiefactor te wijzigen is door de samenstelling van de mobiele fase aan te passen. Bij de omgekeerde fase chromatografie zal een daling in de hoeveelheid organisch solvent resulteren in een grotere retentiefactor voor hydrofobe componenten en vice versa.

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

Figuur 4: Retentiefactor  $k$  (CHROMacademy, z.d.)

De retentiefactor ( $k$ ) stelt de chromatograaf in staat om bij isocratische scheidingen, die gebruik maken van dezelfde mobiele fase, een directe vergelijking te maken tussen chromatografische kolommen met verschillende dimensies en partikelgroottes. Bij een isocratische scheiding blijft de samenstelling van de mobiele fase constant in tegenstelling tot een gradiënt scheiding waarbij de samenstelling van de mobiele fase geleidelijk aan wijzigt.

Om een correctere uitspraak te kunnen doen over de mate waarin een component wordt tegengehouden bij een gradiënt scheiding, wordt er gebruik gemaakt van de gradiënt retentiefactor ( $k^*$ ). De  $k^*$ -waarden die men wenst te bekomen zijn gelijkaardig aan die van de retentiefactor  $k$ . De gradiënt retentiefactor houdt echter rekening met meer factoren dan de retentiefactor  $k$  zoals kan worden waargenomen in onderstaande vergelijking (Fig.5).

Hierbij is  $t_G$  de gradiënt looptijd,  $F$  de flow rate,  $\Delta\phi$  is de procentuele range van de organische component van de mobiele fase uitgedrukt als een decimaal getal,  $V_m$  is het dood volume van de analytische kolom en  $S$  is een constante die afhankelijk is van het moleculaire gewicht van de te analyseren molecule (Shimadzu, 2020).

$$k^* = \frac{t_G F}{\Delta\phi V_m S}$$

*Figuur 5: Gradiënt retentiefactor  $k^*$  (Shimadzu, 2020)*

De tweede factor die een invloed heeft op de resolutie is de selectiviteit. De selectiviteit van een chromatografisch systeem geeft weer in welke mate het in staat is om twee verschillende stoffen chemisch van elkaar te onderscheiden (CHROMacademy, z.d.). Deze factor kan berekend worden door het quotiënt te bepalen van de retentiefactoren van de twee pieken in kwestie (Fig.5). De waarde van de selectiviteit is per definitie altijd groter dan 1 omwille van het feit dat de retentiefactor van de later eluerende piek steeds in de teller staat. Algemeen wordt beweerd dat  $\alpha$ -waarden van 1,1 of groter leiden tot een kwaliteitsvolle scheiding tussen de top van elke piek (CHROMacademy; Sigma-Aldrich, 2024).

Men heeft verschillende opties indien men de selectiviteit wenst te wijzigen. Er kan geopteerd worden om ofwel de mobiele fase ofwel de stationaire fase te wijzigen. Dit is mogelijk omwille van het feit dat de selectiviteit afhankelijk is van de chemische interacties tussen het analyt en de mobiele fase en de stationaire fase. Naast deze wijzigingen is het ook mogelijk om de pH aan te passen aangezien dit de moleculaire eigenschappen, zoals ionisatie en derhalve hydrofobiciteit, van het analyt kan doen veranderen waardoor één van de te analyseren stoffen sneller of juist minder snel zal elueren dan de andere (Sigma-Aldrich, 2024). De temperatuur is ook een parameter die kan worden gewijzigd om een verschil in selectiviteit te bekomen, maar dit is enkel mogelijk met bepaalde analyten bij omgekeerde fase chromatografie en bij chirale HPLC (CHROMacademy, z.d.).

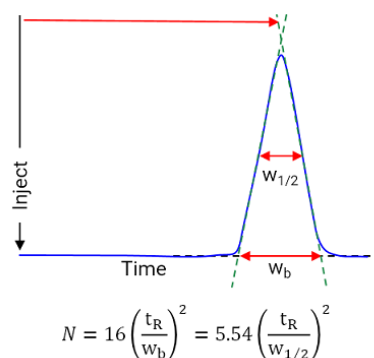
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

*Figuur 6: Selectiviteit  $\alpha$  (CHROMacademy, z.d.)*



De derde en laatste parameter die de resolutie beïnvloedt is de kolomefficiëntie. De efficiëntie kan worden gedefinieerd als de maat voor de dispersie van een analyt terwijl het zich doorheen de analytische kolom verplaatst en wordt uitgedrukt in het aantal theoretische platen van de kolom (N).

Een theoretische plaat werd in 1941 door Martin en Synge, winnaars van de Nobelprijs voor Chemie (1952), omschreven als een laag waarin er een perfect evenwicht optreedt van de verdeling van het analyt tussen de stationaire fase en de mobiele fase. Het aantal theoretische platen kan via twee verschillende vergelijkingen bepaald worden. Om deze vergelijkingen ook te kunnen visualiseren wordt er verwezen naar figuur 7. Zoals kan worden waargenomen op deze figuur is de kolomefficiëntie afhankelijk van twee parameters, de retentietijd van het analyt en de piekbreedte. De efficiëntie kan worden berekend door ofwel de piekbreedte onderaan de piek te gebruiken, ofwel de piekbreedte halweg de piekhoogte te kiezen. Afhankelijk van welke piekbreedte er wordt gehanteerd, worden er verschillende constanten gebruikt. Deze zijn respectievelijk 16 en 5.54 (CHROMacademy; Sigma-Aldrich, 2024).



Figuur 7: Bepaling van het aantal theoretische platen (N) (CHROMacademy, z.d.)

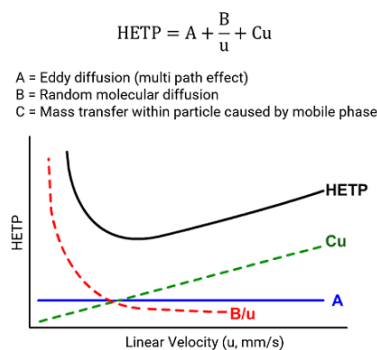
Naast het aantal theoretische platen (N) wordt de kolomefficiëntie ook vaak uitgedrukt in de height equivalent to a theoretical plate (HETP of H). Deze hoogte kan beschreven worden als de afstand van waarbij de componenten van een staal in evenwicht zijn tussen de mobiele fase en de stationaire fase binnen de grenzen van een theoretische plaat. Dit brengt met zich mee dat wanneer een analytische kolom meer theoretische platen telt de scheiding van de componenten ook beter zal zijn en dus de resolutie zal toenemen. Aangezien een kolom een constante lengte heeft kan de HETP berekend worden indien N gekend is (Fig.8). Vervolgens zal een lagere HETP resulteren in een betere resolutie (ScienceDirect, 2024). De kolomefficiëntie kan dus geoptimaliseerd worden door N te maximaliseren en HETP te minimaliseren.

$$H = L/N$$

Figuur 8: Formule HETP (CHROMacademy, z.d.)

### 2.2.3 Piekverbreding

De HETP wordt ook beschreven volgens een andere vergelijking genaamd de 'Van Deemtervergelijking'. Piekverbreding is een chromatografisch fenomeen dat leidt tot een vermindering in efficiëntie van de analyse. Dit zorgt ervoor dat de kwaliteit van de scheiding verslechtert en de accuraatheid van de kwantificatie daalt. In 1956 werd door J. J. Van Deemter een vergelijking opgesteld die de drie factoren en de flowsnelheid van de mobiele fase ( $u$ ), in rekening neemt die aanleiding geven tot piekverbreding (Deemter. 1956). Hij omschreef de verschillende variabelen als A, B en C (Fig.9). Om in staat te zijn om chromatografische scheidingen te optimaliseren en piekverbreding tot een minimum te herleiden, is het van groot belang om de verschillende termen goed te begrijpen (CHROMacademy, z.d.).



Figuur 9: Van Deemtervergelijking en curves (CHROMacademy, z.d.)

Factor A staat voor Eddy-diffusie, ook wel 'multi path effect' genoemd. Ten gevolge van een niet-homogene packing van de kolom zullen de moleculen van een analyt verschillende paden afleggen doorheen de kolom waardoor de moleculen op verschillende tijdstippen elueren (CHROMacademy, z.d.). Wanneer de moleculen van een analyt geïnjecteerd worden op de kolom zal er in de mobiele fase ook nog een andere vorm van diffusie optreden namelijk 'longitudinale diffusie'. Dit gebeurt onder invloed van de concentratiegradiënt en wordt in de Van Deemtervergelijking uitgedrukt met de letter B. Deze diffusie kan geminimaliseerd worden door hogere flowsnelheden te gebruiken en de leidingen van het LC-toestel zo kort en zo smal mogelijk te houden (CHROMacademy, z.d.). Tot slot kan piekverbreding veroorzaakt worden door het fenomeen 'massa transfer' dat in de vergelijking wordt uitgedrukt met de letter C. Dit fenomeen is voornamelijk te verwijten aan de porositeit van de stationaire fase waardoor er een vergrote oppervlakte ontstaat waar scheiding van de moleculen kan plaatsgrijpen (CHROMacademy, z.d.). Om dit probleem zo goed als volledig te omzeilen produceert o.a. Phenomenex analytische kolommen die gebruik maken van Core-Shell technologie. Bij deze technologie wordt er gebruik gemaakt van een massieve silica kern die omringd wordt door een homogene poreuze laag dat functioneert als de stationaire fase. Dit resulteert in minder piekverbreding en dus in hogere efficiëntie (Phenomenex, 2023).

Tabel 1 geeft een overzicht van enkele chromatografische parameters van verschillende analytische kolommen geproduceerd door Phenomenex. Alle analyses werden uitgevoerd met naftaleen als analyt. De testcondities die gehanteerd werden tijdens deze verschillende analyses zijn raadpleegbaar op de kolomcertificaten in de bijlage (Phenomenex, 2019).

Tabel 1: Overzicht van enkele parameters van verschillende chromatografische kolommen gebaseerd op een analyse van naftaleen. MeCN = methyl cyanide (= acetonitril). Zie bijlage voor kolomcertificaten (Phenomenex, 2019).

|                                 | Kolomgrootte | Mobiele fase              | N/meter | k factor | Retentietijd (min) |
|---------------------------------|--------------|---------------------------|---------|----------|--------------------|
| Kinetex® 1,7 µm C8              | 50 x 2,1 mm  | 50% MeCN/H <sub>2</sub> O | 216460  | 3.618    | 0.95               |
| Kinetex® 2,6 µm XB-C18          | 50 x 2,1 mm  | 50% MeCN/H <sub>2</sub> O | 189187  | 6.282    | 1.46               |
| Kinetex® 2,6 µm XB-C18          | 100 x 2,1 mm | 65% MeCN/H <sub>2</sub> O | 213680  | 2.200    | 1.20               |
| Kinetex® 5 µm XB-C18            | 100 x 4,6 mm | 70% MeCN/H <sub>2</sub> O | 183610  | 1.633    | 1.80               |
| Kinetex® 1,7 µm XB-C18          | 100 x 2,1 mm | 65% MeCN/H <sub>2</sub> O | 230680  | 1.851    | 1.02               |
| Kinetex® 1,7 µm XB-C18          | 50 x 2,1 mm  | 50% MeCN/H <sub>2</sub> O | 267140  | 5.272    | 1.23               |
| Luna® Omega 1,6 µm<br>C18 Polar | 50 x 2,1 mm  | 65% MeCN/H <sub>2</sub> O | 323540  | 2.739    | 0.79               |

#### 2.2.4 (U)HPLC

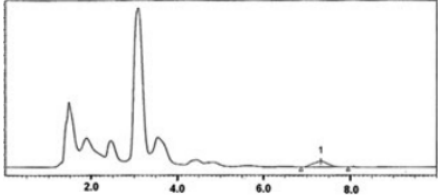
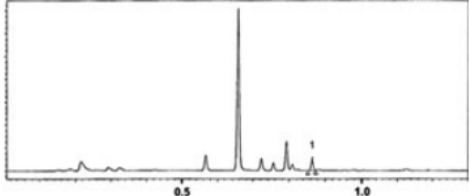
De analysemethoden die vandaag de dag door verschillende farmacopees worden aanbevolen zijn gebaseerd op chromatografische methoden, waarvan HPLC de meest gebruikte is. Deze techniek voldoet aan vele criteria die belangrijk zijn voor analyses. HPLC is echter relatief tijdrovend en verbruikt een relatief grote hoeveelheid organische solventen in vergelijking met andere analysetechnieken (Cielecka-Piontek et al., 2013). De meer recente chromatografische techniek UHPLC biedt een milieuvriendelijker alternatief voor HPLC op vlak van geneesmiddelenanalyse door het verbruik van oplosmiddelen te verminderen. Op deze manier sluit het aan bij de belangrijke Reduce-Replace-Recycle-regel (Katusz. 1981; Chen. 2009; Armenta. 2008; Görög. 2007).

Het feit dat UHPLC de laatste twintig jaar steeds frequenter werd toegepast voor de analyse van (bio)farmaceutica toont aan dat het een waardig alternatief is voor HPLC. De hogere druk die gebruikt wordt bij UHPLC leidt tot een kortere run-time wat resulteert in een vermindering in het verbruik van mobiele fase en een vermindering van de totale analysetijd. Daarnaast draagt de kleinere (< 2 µm) partikelgrootte van het packingsmateriaal bij tot een lagere HETP en dus, zoals eerder aangehaald, tot een betere resolutie. Tot op heden zijn er echter maar een handvol producenten voor UHPLC kolommen waarbij de stationaire fase erg variërend kunnen zijn. Enkele van de meest gebruikte stationaire fases zijn: C18, C8, polaire C18, Xbridge C18, biphenyl, F5 en hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) (Cielecka-Piontek et al., 2013). Verschillende studies tonen tevens aan dat de sensitiviteit van UHPLC, afhankelijk van de detectiemethode, twee tot drie keer groter is dan bij HPLC (Swartz; Snyder; Deemter; Goodwin).

Het gebruik van UHPLC en HPLC voor analyses in farmaceutische en biologische matrixen is reeds onderzocht in een grote hoeveelheid studies. J. Jastrebova et al. (2011) hebben bijvoorbeeld de scheiding van foliumzuurderivaten geanalyseerd door gebruik te maken van UHPLC- en HPLC-methoden met respectievelijk ethylene bridged hybrid (BEH) C18/ high strength silica (HSS) T3- en Xbridge C18/Atlantis C18-kolommen. Hieruit bleek dat de UHPLC-methode een betere gevoeligheid, bredere lineariteit en een goede scheidingsefficiëntie opleverde. Daarnaast werd de totale analysetijd vier keer korter en werden er lagere limit of detection (LOD) waarden bekomen.

Tabel 2 geeft een overzichtelijke vergelijking tussen HPLC- en UHPLC-analysemethoden voor de bepaling van busulfan in biologische matrix. Uit onderstaande chromatogrammen kan worden afgeleid dat, zoals daarnet aangehaald, de UHPLC-analysemethode wel degelijk leidt tot een aanzienlijk verkorte analysetijd en dus vermindering in solventverbruik en een hogere resolutie.

Tabel 2: Vergelijking tussen HPLC- en UHPLC-analysemethoden voor de bepaling van busulfan in biologische matrix (Cielecka-Piontek et al., 2013). SF = stationaire fase. MF = mobiele fase.

|                          | HPLC                                                                               | UHPLC                                                                               |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Chromatogram</b>      |  |  |
| <b>SF</b>                | BEH C18 (100 mm x 1,0 mm, 1,7 µm)                                                  | BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)                                                    |
| <b>MF</b>                | Methanol : water (75:25 V/V)                                                       | Acetonitril : water + trifluorazijnzuur (0,2 % V/V)                                 |
| <b>Flowsnelheid</b>      | 0,14 mL/min                                                                        | 1,0 mL/min                                                                          |
| <b>T<sub>kolom</sub></b> | Kamertemperatuur                                                                   | Kamertemperatuur                                                                    |
| <b>Detectie</b>          | UV                                                                                 | UV                                                                                  |

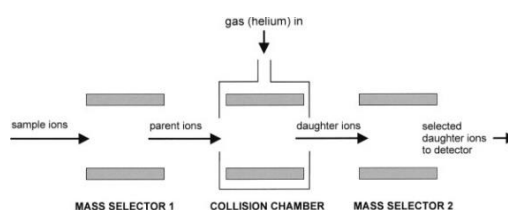
### 2.2.5 Detectiemethode | ESI-MS/MS

De detectie speelt een beduidende rol in de kwaliteit en de betrouwbaarheid van de onderzoeksresultaten van een chromatografische analysemethode. Voor vloeistofchromatografie bestaan er verschillende soorten detectoren. De meest voorkomende in de praktijk zijn: ultraviolet-vis (diode array) detectoren, fluorescentie/chemoluminescentie detectoren en elektrochemische detectoren. Deze detectoren verschillen van elkaar onder andere in prijs, sensitiviteit en toepassingen. Naast deze opties is het ook mogelijk om massa spectrometers te gebruiken als detectoren voor vloeistofchromatografie (ScienceDirect, 2024).

Massa spectrometrie (MS) kent als analysetechniek zowel kwalitatieve als kwantitatieve toepassingen voor de identificatie en de kwantificatie van een brede waaier aan relevante analyten waardoor het wordt gebruikt voor verschillende klinische toepassingen. MS-data wordt weergegeven onder de vorm van een massaspectrum waarbij de massa/lading-verhouding ( $m/z$ ), uitgedrukt in daltons (Da), in functie staat van de relatieve abundantie. Bij de  $m/z$  staan 'm' en 'z' respectievelijk voor de exacte massa van het ion en het aantal ladingen die aanwezig zijn op het moleculair ion. Kleine moleculen dragen vaak slechts één lading in tegenstelling tot grote (bio)moleculen zoals proteïnen en peptides die meerdere ladingen kunnen bezitten (Garg & Zubair, 2023).

Om succesvol een MS-analyse te kunnen uitvoeren is het van cruciaal belang dat er een adequate staalvoorbereiding plaatsvindt. Deze voorbereiding is voornamelijk nodig indien er gewerkt wordt met complexe matrixen, vaak voorkomend binnen de klinische chemie, die kunnen zorgen voor interferenties tijdens de analyse (= matrixeffect). Een staalvoorbereiding bestaat meestal uit één of meer van de volgende technieken: (1) eiwitprecipitatie gevolgd door centrifugatie of filtratie, (2) solid-phase extraction, (3) vloeistof-vloeistof extractie, (4) affinity enrichment, of (5) derivatisatie (Wilschefski & Baxter, 2019).

Elektrospray ionisatie (ESI) is een geschikte en veelgebruikte ionisatiebron voor LC-analyses omwille van het feit dat het te ioniseren staal geïntroduceerd dient te worden in vloeibare vorm. Het ionisatieproces kan op twee manieren verlopen: ofwel ontvangt het analyt één of meerdere protonen, ofwel staat het analyt één of meerdere protonen af. Dit gebeurt onder invloed van de elektrische energie waarmee de moleculen in contact komen aan het begin van de ionisatiebron. Respectievelijk spreekt men van 'positive (ion) mode' en 'negative (ion) mode'. Positive mode is het best toepasbaar indien het analyt kationisch is, negative mode is het best toepasbaar indien het analyt anionisch is. MS/MS wordt vandaag de dag rijkelijk gebruikt voor chemische analytische toepassingen omwille de erg hoge sensitiviteit en specificiteit. Dit is te danken aan de twee in serie geplaatste quadrupolen die functioneren als massa analysatoren (Q1 en Q3). Hiertussen bevindt er zich een collision cell (Q2) waarin gasmoleculen (stikstofgas, helium of argon) in botsing komen met de eerder gevormde moeder-ionen zoals schematisch weergegeven is op figuur 10. Hierdoor treedt ionfragmentatie op waardoor er dochterionen gevormd worden. Doordat de quadrupolen gebruik maken van elektrische potentialen kan er een selectie gemaakt worden van welke ionen de detector bereiken. Deze selectie gebeurt op basis van hun  $m/z$  waarde (Tilvi et al, 2014 & Ligon, 2001).

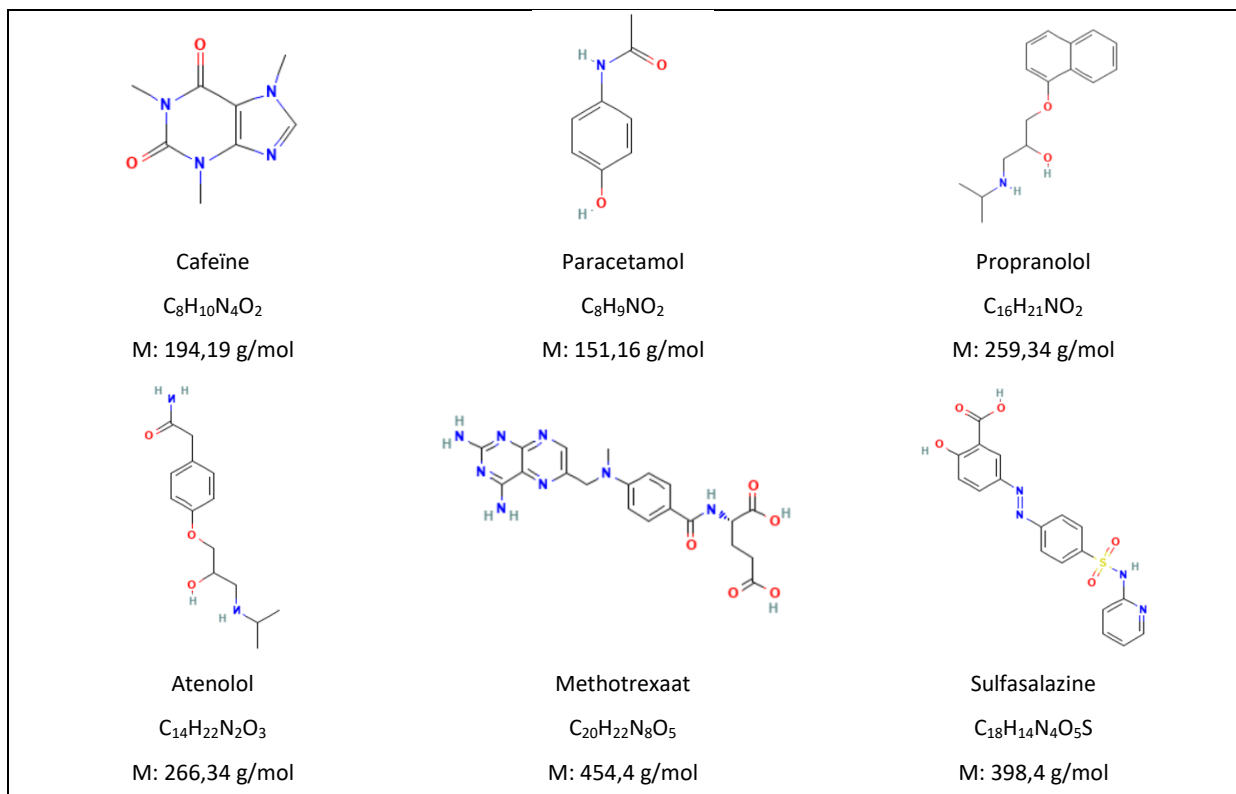


Figuur 10: Schematische voorstelling van een tandem massa-analysator (Jan Schuberth, 2003)

### 3. Materiaal en methoden

#### 3.1 Chemicaliën en reagentia

Het cafeïnepoeder (Fig. 11) dat gebruikt werd als standaard voor de bereiding van stockoplossingen was afkomstig van Apotheek Van Wambeke. Ammoniumacetaat ( $\geq 99\%$ ), ammoniumformaat ( $\geq 99\%$ ), methaanzuur ( $\geq 99\%$ ), azijnzuur ( $\geq 99\%$ ) en water (HPLC grade) werden gekocht bij VWR chemicals (Rosny-sous-Bois, Frankrijk). Methanol en acetonitril waren beiden hypergrade voor LC-MS en werden aangekocht bij Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Duitsland). Atenolol, methotrexaat, paracetamol, propranolol en sulfasalazine (Fig. 11) werden eveneens aangekocht bij Sigma-Aldrich.



Figuur 11: Chemische structuurformule van cafeïne (CAF), paracetamol (PAR), propranolol (PRL), atenolol (ATL), methotrexaat (MTX) en sulfasalazine (SUL).

#### 3.2 Apparatuur

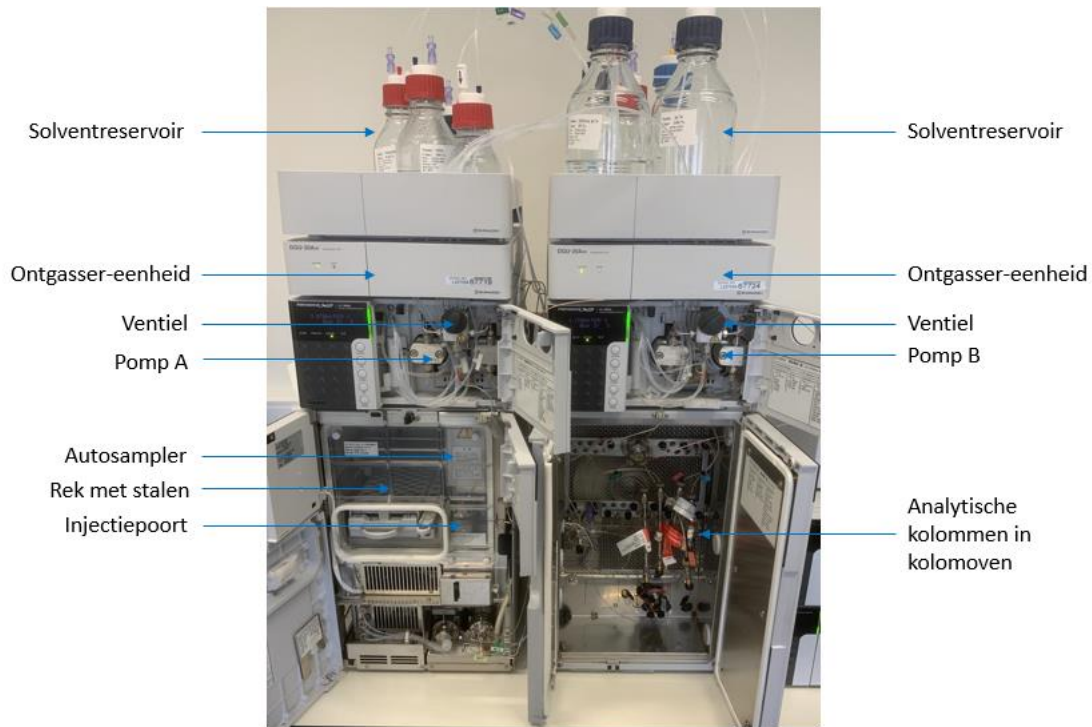
Analyses werden uitgevoerd met behulp van de Nexera X2 High Performance Liquid Chromatograph LCMS-8050 Triple Quadrupole Mass Spectrometer van Shimadzu (Shimadzu Benelux B.V. - Belgium).

Het toestel was uitgerust met een DGU-20A ontgasser-eenheid, een LC-30AD pompsysteem, een SIL-30AC autosampler, een CTO-20AC kolomoven, een elektro spray ionisatiebron en een UFsweeper III collision cell.

De besturing van het systeem en de gegevensverwerking werden uitgevoerd met behulp van de LabSolutions software van Shimadzu. Op figuur 12 is de gebruikte Nexera X2 HPLC chromatograaf van Shimadzu te zien. Bovenop het toestel bevindt zich het solventreservoir. Hier worden de verschillende mobiele fases opgeslagen in afzonderlijke flessen. Deze flessen zijn afgesloten met een speciale dop waar doorheen de leidingen lopen die aangesloten zijn aan één van de twee pompsystemen. De pompsystemen zorgen ervoor dat de mobiele fases uit de flessen worden gezogen en vervolgens terechtkomen in één van de twee ontgasser-eenheden die zich boven de twee pompsystemen bevinden. Beide pompsystemen bestaan uit twee zuigers die afwisselend werken. Hierdoor wordt de mobiele fase continu en met een constante snelheid aangezogen en door de kolom geduwd. Hiernaast zijn de pompsystemen ook verantwoordelijk voor het correct mixen van de twee aangezogen solventen.

Via de software van het toestel worden de flessen gekozen waaruit de solventen worden aangezogen, alsook de flowsnelheid en de percentuele verhouding tussen de twee solventen worden ingesteld zodat uiteindelijk de gewenste mobiele fase verkregen wordt. Onder het linkse pompsysteem op figuur 12 bevindt zich de autosampler. De autosampler is verantwoordelijk voor het injecteren van de stalen op de analytische kolom. In de software van het toestel dient ingegeven te worden in welke volgorde de stalen geïnjecteerd dienen te worden, alsook de positie van elk staal in het rek (op de figuur reeds in het toestel geschoven) en het gewenste injectievolume.

Nadat de naald een staal heeft opgezogen, verplaatst de naald zich naar de injectiepoort en vindt de injectie plaats waarna het staal terechtkomt in de zogenaamde 'loop'. Deze loop is simpelweg een kort stuk leiding waarin het staal verblijft vooraleer het terechtkomt op de analytische kolom. De injectiepoort is een zeer belangrijk onderdeel van het HPLC toestel omwille van het feit dat dit het toestel beschermt tegen de hoge druk. De injectiepoort is in staat om te roteren nadat de staalinjectie heeft plaatsgevonden waardoor het staal uit de loop naar de kolom wordt geduwd door het pompsysteem. Na de injectie draait het ventiel terug naar zijn oorspronkelijke positie. Dit mechanisme zorgt ervoor dat er ononderbroken mobiele fase naar de analytische kolom gepompt wordt. De analytische kolom bevindt zich bij dit toestel in een kolomoven, rechtsonder te zien op figuur 12. De kolomoven heeft als functie om een constante temperatuur te creëren waarbij de chromatografische scheiding in de analytische kolom kan plaatsvinden.



Figuur 12: Gebruikte Nexera X2 HPLC chromatograaf van Shimadzu (eigendom van BioNotus)

Nadat de chromatografische scheiding heeft plaatsgevonden komt het staal terecht in de MS detector, hieronder te zien op figuur 13. De moleculen die aanwezig zijn in het staal worden geïntroduceerd in de ionisatiebron waarin ze door middel van ESI geïoniseerd worden door ofwel een positieve lading te krijgen of door een negatieve lading te krijgen. Deze geïoniseerde moleculen komen vervolgens terecht in de eerste quadropool (Q1). Deze quadropool functioneert als de eerste massa analysator van de detector. Dankzij aanwezige elektrische potentialen is het in staat om een selectie te maken van de geïoniseerde moleculen op basis van hun  $m/z$  waarde. Enkel de moleculen die over de correcte  $m/z$  waarde beschikken zijn in staat om zich doorheen de volledige Q1 te verplaatsen. Na de Q1 volgt de collision cell (Q2) waarin gasmoleculen in botsing worden gebracht met de eerder gevormde moederionen. Dit zorgt voor ionfragmentatie en leidt tot de vorming van dochterionen. Vervolgens vindt er opnieuw een selectie plaats op basis van de  $m/z$  waarde in de tweede massa analysator (Q3) waarna tot slot de eigenlijke detectie plaatsvindt.



Figuur 13: Gebruikte LCMS-8050 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (eigendom van BioNotus)



### 3.3 MS tuning

MS tuning, ook wel 'compound optimization' genoemd, doelt op de optimalisatie van de verschillende MRM-detectieparameters zoals de m/z van de precursor- en dochterionen, botsingsenergieën (collision energy) en potentialen (Q1 entry & Q3 entry) voor elk analyt. Deze optimalisatie is een belangrijke stap in de ontwikkeling van een MS detectiemethode. De reden hiervoor is omdat elke massadetector uniek is en dus de kans reëel is dat twee detectoren verschillende potentialen hanteren voor eenzelfde analyt. Deze variatie zorgt ervoor dat wanneer men bepaalde detectieparameters hanteert dat deze optimaal zijn voor de ene massaspectrometer, maar niet voor de andere. Kortom is er dus een optimalisatie vereist per analyt en per detector. Een gebrek aan optimalisatie kan leiden tot een verlies aan sensitiviteit en mogelijks kan het een invloed hebben op de detectielimieten van het desbetreffende analyt.

Met dit in het achterhoofd kon de optimalisatie van start gaan voor de verschillende analyten die gedetecteerd dienden te worden in het verloop van dit onderzoekswerk. De voornaamste stof die gedetecteerd diende te worden was uiteraard cafeïne. Echter werd er ook bedoeld om later een interne standaard te gebruiken. Een interne standaard zou gelijkaardige chemische en fysische eigenschappen moeten hebben aan die van het analyt van interesse. Voor LC-MS/MS zou dit zich moeten uiten onder de vorm van gelijkaardige retentietijden, piekvorm en signaalsterkte. De meest ideale interne standaard is in theorie een isotoop gelabelde vorm van het analyt.

Een concreet voorbeeld hiervan is de  $^{13}\text{C}_3$ -cafeïne interne standaard die gehanteerd werd door Mendes et al. (2019). Helaas was BioNotus niet in het bezit van dit type interne standaard en dus werd een andere oplossing gezocht in de vorm van andere moleculen, waaronder atenolol, methotrexaat, paracetamol, propranolol en sulfasalazine. Een interne standaard toevoegen aan de te analyseren stalen en/of standaarden tijdens de staal voorbereiding is een goede manier om systematische en willekeurige fouten op te sporen. Concreet kan het bijvoorbeeld informatie verschaffen over de stabiliteit van het apparaat, meer bepaald de detector, of wanneer er pipetteerfouten hebben plaatsgevonden tijdens de staalvoorbereiding (Scion Instruments, 2024).

Voor de analyses werd een oplossing gemaakt met alle zojuist vermeldde potentiële interne standaarden vertrekkende van stockoplossingen met verschillende concentraties. De eindconcentratie van de verschillende geneesmiddelen bedroeg 100 ng/mL, alsook werd er een aparte cafeïne standaardoplossing bereid met dezelfde eindconcentratie vertrekkende van de Caffeine Standard for Capillary LC van Agilent Technologies (2 µg/mL). Als verdunningsmiddel werd HPLC grade water gebruikt en het injectievolume bedroeg 2 µL.

Om te beginnen werd de cafeïnestandaard geanalyseerd met als doel te achterhalen bij welke m/z waarden de precursor- en dochterionen werden gedetecteerd. Hiervoor werd een multiple reaction monitoring uitgevoerd (MRM).

Na de MRM werden er twee transities gekozen die een hoge signaalintensiteit hadden en werd er vervolgens een tuning uitgevoerd van de entry potentialen (Q1 en Q3) en van de botsingsenergie. Een gelijkaardige aanpak werd gehanteerd voor het verkrijgen van de detectieparameters voor de (potentiële) interne standaarden. Al deze detectieparameters werden vervolgens gebruikt tijdens de ontwikkeling van de chromatografie.

### 3.4 Chromatografie scouting en ontwikkeling

#### 3.4.1 Automatische scouting

Een chromatografische scoutingsmethode kan dienen als een goed startpunt voor de ontwikkeling van een chromatografische analysemethode aangezien het resultaat van één scouting al meteen een idee kan geven of de elutie het best isocratisch verloopt of er toch eerder een gradiënt gehanteerd dient te worden. Een eerste scoutingsmethode werd ontwikkeld om na te gaan welke combinatie van mobiele fase en stationaire fase resulteerde in het beste chromatogram. De chromatografie was geslaagd indien aan de volgende zaken wordt voldaan: er dient retentie op te treden van de analyten, de elutie dient plaats te vinden vooraleer de gradiënt terug afneemt, de bekomen piek dient zo smal en zo hoog mogelijk te zijn, de tailing factor dient zo dicht mogelijk bij 1,0 te liggen aangezien dit wijst op een symmetrische piek.

Een verdunning werd gemaakt van de Caffeine Standard for Capillary LC van Agilent Technologies (2 µg/mL) in HPLC grade water zodat een eindconcentratie bekomen werd van 100 ng/mL. Deze standaardoplossing werd gebruikt gedurende de analyses, het injectievolume bedroeg 2,0 µL. Een analysetijd van 4 minuten werd ingesteld samen met een flowsnelheid van 0,4 mL/min en een oventemperatuur van 40°C.

Tussen elke injectie werd de analytische kolom geëquilibreerd gedurende 8 minuten met de verschillende samenstellingen aan mobiele fases. Een overzicht van welke stationaire fases, mobiele fases (A en B) en gradiënten gebruikt werden tijdens de scoutingsmethode staat weergegeven in tabel 3. De vijf verschillende analytische kolommen die gebruikt werden, waren aangekocht bij Phenomenex. In totaal werden er dertig verschillende combinaties uitgetest door gebruik te maken van vijf verschillende stationaire fases en zes combinaties aan mobiele fase (3 soorten A en 2 soorten B) allemaal bij dezelfde gradiënt.

Tabel 3: Overzicht van de gebruikte stationaire fases, mobiele fases en gradiënt gedurende chromatografische scouting #1. Analyses werden uitgevoerd met een 100 ng/mL cafeïne standaardoplossing. Injectievolume 2,0 µL, flowsnelheid 0,4 mL/min, oventemperatuur 40°C.

| Stationaire fase                              | Mobiele fase A                   | Mobiele fase B    | Gradiënt                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kinetex® 1,7 µm C8 (50 x 2,1 mm)              | 0,1% Ammoniumformaat<br>in water |                   |                                                                                                                                             |
| Luna® Omega 1,6 µm Polar C18<br>(50 x 2,1 mm) | 10 mM<br>Ammoniumformaat +       | 100 % Acetonitril | 10% B (0-0,50 min),<br>10-60% B (0,50-1,50<br>min), 60% B (1,50-2,80<br>min), 60-10% B (2,80<br>min-3,00 min), 10% B<br>(3,00 min-4,00 min) |
| Kinetex® 1,7 µm XB-C18<br>(50 x 2,1 mm)       | 0,1% Methaanzuur in<br>water     |                   |                                                                                                                                             |
| Kinetex® 1,7 µm Biphenyl<br>(50 x 2,1 mm)     | 10 mM<br>Ammoniumacetaat in      | 100 % Methanol    |                                                                                                                                             |
| Kinetex® 1,7 µm F5 (50 x 2,1 mm)              | water                            |                   |                                                                                                                                             |

Na deze eerste scouting werd er vervolgens een andere gradiënt uitgetest met als doel de retentietijd te verbeteren. Hierbij werd de totale analysetijd verminderd naar 3,4 minuten en werd het initiële percentage van mobiele fase B verlaagd naar 5% en het eindpercentage naar 35%. Alle andere parameters en combinaties van stationaire fases en mobiele fases bleven behouden. Een overzicht hiervan is weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: Overzicht van de gebruikte stationaire fases, mobiele fases en gradiënt gedurende chromatografische scouting #2. Analyses werden uitgevoerd met een 100 ng/mL cafeïne standaardoplossing. Injectievolume 2,0 µL, flowsnelheid 0,4 mL/min, oventemperatuur 40°C.

| Stationaire fase                              | Mobiele fase A                   | Mobiele fase B    | Gradiënt                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kinetex® 1,7 µm C8 (50 x 2,1 mm)              | 0,1% Ammoniumformaat<br>in water |                   |                                                                                                                                    |
| Luna® Omega 1,6 µm Polar C18<br>(50 x 2,1 mm) | 10 mM<br>Ammoniumformaat +       | 100 % Acetonitril | 5% B (0-0,50 min), 5-<br>35% B (0,50-1,00 min),<br>35% B (1,00-2,00 min),<br>35-5% B (2,00 -2,30<br>min), 5% B (2,30 -3,40<br>min) |
| Kinetex® 1,7 µm XB-C18<br>(50 x 2,1 mm)       | 0,1% Methaanzuur in<br>water     |                   |                                                                                                                                    |
| Kinetex® 1,7 µm Biphenyl<br>(50 x 2,1 mm)     | 10 mM<br>Ammoniumacetaat in      | 100 % Methanol    |                                                                                                                                    |
| Kinetex® 1,7 µm F5 (50 x 2,1 mm)              | water                            |                   |                                                                                                                                    |

### 3.4.2 Verdere manuele ontwikkeling

Na het testen van verschillende chromatografische methodes door middel van scouting werd er overgegaan naar een manuele ontwikkeling om op een meer gerichte manier verder inzicht te krijgen in welke combinatie aan parameters (mobiele fase, stationaire fase, flowsnelheid, etc.) een geschikte chromatografische scheiding en detectie werd teweeggebracht.

In deze fase van de methodeontwikkeling werden er in totaal meer dan vijftig verschillende combinaties aan parameters uitgetest. Hierbij werden er vier verschillende mobiele fases A gebruikt en twee verschillende mobiele fases B. De verschillende mobiele fases A waren: 10 mM ammoniumformaat in water, 10 mM ammoniumformaat + 0,1% methaanzuur in water, 10 mM ammoniumacetaat in water en 10 mM ammoniumacetaat + 0,1% azijnzuur in water. Mobiele fases B waren: 100% methanol en 100% acetonitril. Voor de stationaire fase werden er vier analytische kolommen uitgetest. Deze waren: Luna<sup>®</sup> Omega 1,6 µm Polar C18 (50 x 2,1 mm), Kinetex<sup>®</sup> 1,7 µm Biphenyl (50 x 2,1 mm), Kinetex<sup>®</sup> 1,7 µm C8 (50 x 2,1 mm) en Kinetex<sup>®</sup> 1,7 µm C8 (100 x 2,1 mm).

De flowsnelheid werd voor het merendeel van de analyses behouden op 0,4 mL/min, het injectievolume bleef onveranderd bij 2,0 µL en de oventemperatuur bedroeg net zoals bij de scoutingsmethodes 40°C. Verder werden er vele verschillende gradiënten uitgetest variërend tussen 5% en 95% mobiele fase B, alsook enkele isocratische scheidingen. Voor elke methode werd er minstens één blanco staal geanalyseerd en één staal met de verschillende interne standaarden en cafeïne. Een overzicht van welke parameters gebruikt werden voor elke LC methode kan worden geraadpleegd in bijlage 8.

### 3.5 Bereiding van kalibratie standaarden en quality control samples (QC's)

Voor het testen van de lineariteit van de analysemethode werd een kalibratie curve opgesteld die bestond uit acht kalibratiepunten. Voor de bereiding van deze standaarden werd er vertrokken vanuit een 5,0 mg/mL cafeïne-stockoplossing. Een tussenverdunding van deze stockoplossing werd bereid in HPLC grade water zodat een concentratie werd bekomen van 200,0 µg/mL. Uit deze tussenverdunding werd dan werkoplossing 1 bereid met een concentratie van 10,0 µg/mL. Hieruit werd vervolgens werkoplossing 2 bereid waarin de concentratie 500 ng/mL bedroeg. Er werd nog steeds gebruik gemaakt van hetzelfde diluent. Vanuit de twee werkoplossingen werden vervolgens de kalibratiestandaarden bereid in polypropyleen tubes. De concentraties aan cafeïne in de tubes bedroegen op dit moment 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000 en 2000 ng/mL en het eindvolume bedroeg 1000 µL.

Voor de bereiding van de Qc's was de workflow gelijkaardig. Een aparte weging werd uitgevoerd voor het bereiden van een andere cafeïne-stockoplossing met dezelfde concentratie van 5,0 mg/mL.

Ook hieruit werden twee werkoplossingen bereid op identiek dezelfde wijze als voor de standaarden. Om duidelijk onderscheid te maken tussen de eerste twee werkoplossingen werden deze gelabeld als werkoplossing 3 en werkoplossing 4.

Vervolgens werden er vanuit deze werkoplossingen vier Qc's bereid (High QC, Middle QC, Low QC, Lower Limit of Quantitation QC (LLOQ)) in polypropyleen tubes respectievelijk met een cafeïneconcentratie van 1500, 150, 30 en 10 ng/mL. Ook hier werd HPLC grade water gebruikt als diluent. Pipetteerschema's voor de bereiding van de kalibratie standaarden en van de QC's zijn hieronder terug te vinden in respectievelijk tabellen 5 en 6.

Tabel 5: Pipetteerschema kalibratiestandaarden

| Standaard Opl. | Pipetteer (µL) | Van                           | Toev. (µL)                     | Eind V. (µL) | Std Conc. (ng/mL) |
|----------------|----------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------|-------------------|
| CCS 8          | 200            |                               | 800                            | 1000         | 2000              |
| CCS 7          | 100            |                               | 900                            | 1000         | 1000              |
| CCS 6          | 50             | Werkoplossing 1<br>(10 µg/mL) | 950                            | 1000         | 500               |
| CCS 5          | 25             |                               | 975                            | 1000         | 250               |
| CCS 4          | 10             |                               | 990                            | 1000         | 100               |
| CCS 3          | 100            |                               | Werkoplossing 2<br>(500 ng/mL) | 900          | 1000              |
| CCS 2          | 40             | 960                           |                                | 1000         | 20                |
| CCS 1          | 20             | 980                           |                                | 1000         | 10                |

Tabel 6: Pipetteerschema QC's

| QC      | Pipetteer (µL) | Van                            | Toev. (µL) | Eind V. (µL) | Std Conc. (ng/mL) |
|---------|----------------|--------------------------------|------------|--------------|-------------------|
| HQC     | 150            | Werkoplossing 3<br>(10 µg/mL)  | 850        | 1000         | 1500              |
| MQC     | 15             |                                | 985        | 1000         | 150               |
| LQC     | 60             | Werkoplossing 4<br>(500 ng/mL) | 940        | 1000         | 30                |
| LLOQ QC | 20             |                                | 980        | 1000         | 10                |

Voor de interne standaard werd een paracetamol-werkoplossing (1,0 µg/mL) bereid vanuit een stockoplossing met een concentratie van 1,0 mg/mL. Tot slot werd een finale verdunning uitgevoerd van de kalibratie standaarden en de QC's in amber gekleurde 400 µL glazen flesjes. Van zowel de standaarden als de QC's werd er 40 µL overgebracht in deze flesjes. Voor elk QC-niveau werd dit zes keer herhaald. Vervolgens werd er 20 µL van de interne standaard toegevoegd aan elk flesje. Tot slot werd elke vial aangelengd met 140 µL HPLC grade water zodat een eindvolume werd bekomen van 200 µL. Bijgevolg bedroeg de eindconcentratie van de IS in elk flesje 100 ng/mL. De concentratie aan cafeïne in de HQC's, MQC's, LQC's en LLOQ QC's bedroegen respectievelijk 300 ng/mL, 30 ng/mL, 6 ng/mL en 2 ng/mL. Voor de kalibratiestandaarden bedroeg de cafeïneconcentratie 400, 200, 100, 50, 20, 10, 4 en 2ng/mL.

## 4. Resultaten en discussie

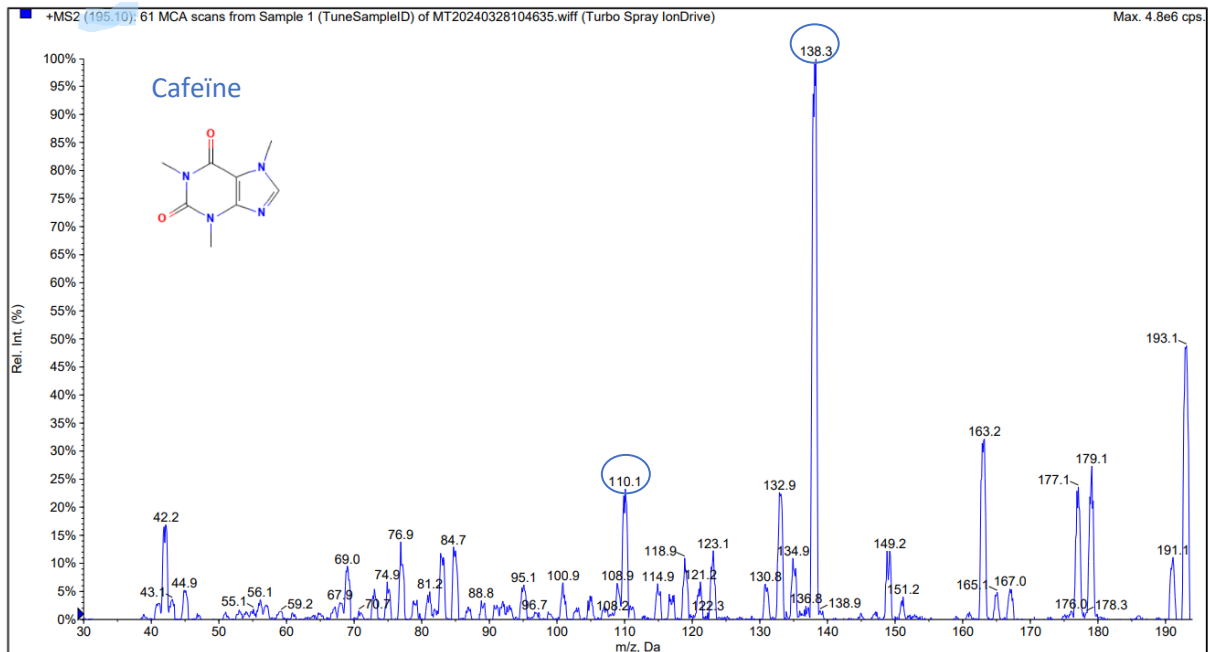
---

### 4.1 MS tuning

MS tuning werd uitgevoerd in positieve ion mode voor het verzamelen van de optimale detectieparameters van cafeïne en de geneesmiddelen paracetamol, atenolol, methotrexaat, propranolol en sulfasalazine die gebruikt werden als potentiële interne standaard. Als eerste werd de MS tuning uitgevoerd op cafeïne. Hierbij werd er uit interesse ook nagegaan of er ionisatie zou plaatsvinden indien het toestel ingesteld staat op negatieve ion mode. Het resultaat van deze test sloot volledig aan bij wat er in theorie zou gebeuren, namelijk dat de afgifte van een proton, onder de vorm van een  $H^+$ , onmogelijk is zonder dat er onmiddellijk fragmentatie optreedt. Wanneer er gekeken wordt naar de structuur van cafeïne kan worden opgemerkt dat het niet beschikt over functionele groepen die gemakkelijk in staat zijn om een proton af te staan. Het tegengestelde is een feit, cafeïne beschikt over verschillende stikstoffen die in staat zijn om een extra proton op te nemen en dus een positieve lading te krijgen. Uit dit resultaat blijkt dus dat cafeïne reageert als een basische molecule. Ook dit komt overeen met wat de pKa waarde (14,0) vertelt over de molecule. Deze waarde geeft aan dat cafeïne een zeer sterke base is.

Figuur 14 geeft het massaspectrum weer met de dochterionen afkomstig van de geprotoneerde vorm van cafeïne ( $m/z$ : 195,10). Voor het bekomen van onderstaand spectrum werd er gebruik gemaakt van oplopende botsingsenergieën (beter gekend als 'ramping') tussen 20 en 45 eV. Elke piek op het spectrum stemt overeen met een specifiek dochterion/transitie en komt voor bij een specifieke  $m/z$  waarde. Bij de detectie wordt er verwacht om gebruik te maken van minstens twee transities. De eerste transitie wordt gebruikt voor de kwantificatie van het analyt. De tweede en eventueel ook andere transities vervullen een kwalitatieve rol. Deze tweede transitie wordt immers gebruikt om te bevestigen dat het wel degelijk het analyt in kwestie is dat gedetecteerd wordt. Het is namelijk zo dat een transitie afkomstig kan zijn van verscheidene moleculen.

Dit wetende werd er uit het massaspectrum van cafeïne (Fig. 14) de volgende twee transities gekozen: 195/138 voor de kwantitatieve bepaling en 195/110 voor de kwalitatieve controle. De reden waarom de transitie 195/138 gekozen werd voor de kwantitatieve bepaling is omwille van het feit dat het dochterion met de  $m/z$  waarde 138,2 Da de hoogste abundantie heeft en dus de hoogste signaalsterkte oplevert. Voor de kwalitatieve bepaling konden transities zoals 195/163 en 195/179 evenwel een goede optie zijn geweest. Vervolgens werd er een optimalisatie uitgevoerd van de MRM-parameters voor deze twee transities.



Figuur 14: Massaspectrum met dochterionen van de geprotoneerde vorm van cafeïne ( $M + H^+$ ). Fragmentatie werd verkregen door gebruik te maken van oplopende botsingsenergie (ramping) van 20-45 eV. Dit spectrum werd verkregen gebruikmakend van een Sciex MS-systeem en werd verkozen boven het gebruikte massaspectrum, verkregen na de analyses met het LCMS-8050 systeem, omwille van de eenvoudigere en meer overzichtelijke weergave.

Naast de compound optimization voor cafeïne werden dezelfde stappen ondernomen voor de optimalisatie van de MRM-parameters voor de verschillende geneesmiddelen die dienden als potentiële IS. Een overzicht van de twee gebruikte transities van elke molecule, alsook de overeenstemmende MRM-parameters is hieronder weergegeven in tabel 7.

Tabel 7: Overzicht van de MRM parameters van cafeïne (CAF), paracetamol (PAR), atenolol (ATL), methotrexaat (MTX), propranolol (PRL), sulfasalazine (SUL).

|     | Precursor m/z<br>(Da) | Product m/z<br>(Da) | Dwell time<br>(msec) | Q1 entry (V) | CE (V) | Q3 entry (V) |
|-----|-----------------------|---------------------|----------------------|--------------|--------|--------------|
| CAF | 195,3000              | 138,2000            | 50,0                 | -23,0        | -18,0  | -13,0        |
|     | 195,3000              | 110,0000            | 50,0                 | -10,0        | -23,0  | -20,0        |
| PAR | 152,1000              | 93,000              | 50,0                 | -10,0        | -35,0  | -10,0        |
|     | 152,1000              | 110,2000            | 50,0                 | -10,0        | -18,0  | -10,0        |
| ATL | 267,1678              | 145,1000            | 100,0                | -14,0        | -25,0  | -15,0        |
|     | 267,1678              | 190,2000            | 100,0                | -14,0        | -18,0  | -19,0        |
| MTX | 455,1778              | 308,2000            | 100,0                | -13,0        | -18,0  | -30,0        |
|     | 455,1778              | 175,1500            | 100,0                | -12,0        | -39,0  | -12,0        |
| PRL | 260,1500              | 116,2000            | 100,0                | -15,0        | -17,0  | -15,0        |
|     | 260,1500              | 155,2000            | 100,0                | -15,0        | -25,0  | -15,0        |
| SUL | 399,0778              | 367,2000            | 100,0                | -21,0        | -14,0  | -28,0        |
|     | 399,0778              | 381,2000            | 100,0                | -10,0        | -17,0  | -18,0        |

## 4.2 Chromatografie scouting en ontwikkeling

### 4.2.1 Automatische scouting

Voor de ontwikkeling van de chromatografische analysetechniek werd er gestart met een automatische scouting. Hierbij werden in totaal dertig combinaties aan stationaire fase en mobiele fases uitgetest, allemaal bij dezelfde gradiënt. Per methode werden twee analyses uitgevoerd van dezelfde 100 ng/mL cafeïnestandaard. De data van deze zestig analyses kan worden geraadpleegd in bijlage 8. Een overzicht werd gemaakt van vijf methodes die de meest belovende chromatografische data opleverden (tabel 8).

*Tabel 8: Overzicht van 5 chromatografische methodes die getest werden door middel van automatische scouting met enkele bijhorende chromatografische parameters. Analyses werden uitgevoerd op een 100 ng/mL cafeïnestandaardoplossing bereid vanuit een 2 µg/mL cafeïnestandaard van Agilent Technologies.*

|            | SF                        | MF A       | MF B | Gradiënt                      | Gem. oppervlakte | Gem. retentietijd (min.) | Gem. Tailing fact. | Gemiddelde breedte (min.) |
|------------|---------------------------|------------|------|-------------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------|
| Methode 4  | Biphenyl (50 x 2,1 mm)    | 10 mM AmF  | MeOH | 10% B (0-0,50 min), 10-60% B  | 2.134.995        | 0,5965                   | 1,3855             | 0,1740                    |
| Methode 10 | C8 (50 x 2,1 mm)          | 10 mM AmF  | MeOH | (0,50-1,50 min), 60% B (1,50- | 2.330.539        | 0,5695                   | 1,3665             | 0,1545                    |
| Methode 12 | C8 (50 x 2,1 mm)          | 10 mM AmAc | MeOH | 2,80 min), 60-10% B           | 2.072.651        | 0,5620                   | 1,3515             | 0,1595                    |
| Methode 22 | Polaire C18 (50 x 2,1 mm) | 10 mM AmF  | MeOH | (2,80 min-3,00 min), 10% B    | 2.108.484        | 0,5695                   | 1,3910             | 0,1595                    |
| Methode 28 | XB C18 (50 x 2,1 mm)      | 10 mM AmF  | MeOH | (3,00 min-4,00 min)           | 2.057.739        | 0,5960                   | 1,3990             | 0,1745                    |

Uit de data van de eerste scouting konden meteen enkele zaken worden afgeleid. Om te beginnen was de gebruikte gradiënt bij de eerste scouting niet geschikt om retentie te bekomen van cafeïne. Dit was af te leiden uit het feit dat de retentietijden allemaal bleven schommelen rond 0,55 minuten wat overeenkomt met het dode volume van de gebruikte kolommen die elk 50 mm lang waren en een diameter hadden van 2,1 mm. Om dit op te lossen werd de gradiënt aangepast zoals besproken werd onder deel 3.4.1. Deze wijziging resulteerde in een toename in retentietijd bij alle methodes.

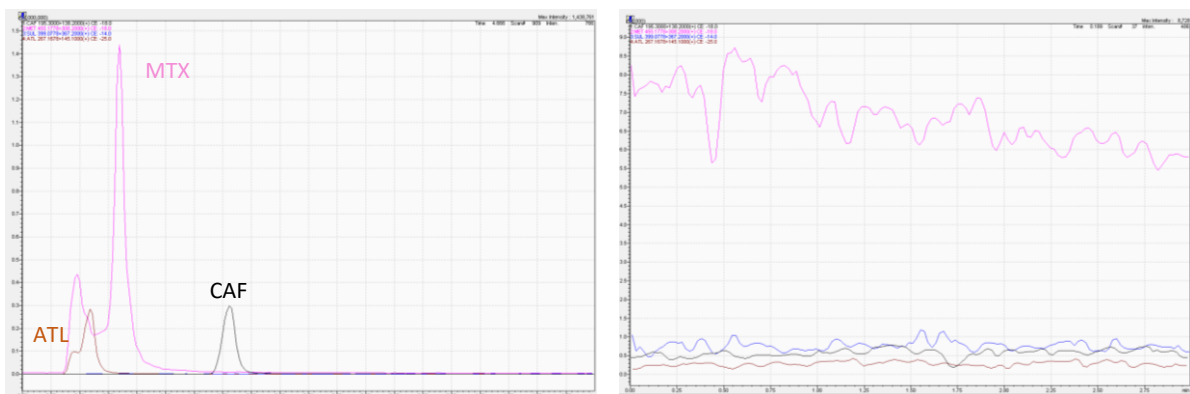
Naast de retentietijd was er een groot verschil op te merken tussen de gemiddelde piekoppervlakten die bekomen werden wanneer er gewisseld werd tussen methanol en acetonitril als mobiele fase B. Methanol leverde de hoogste signaalintensiteit op en dus werd er besloten om definitief voor dit solvent te kiezen als mobiele fase B. Verder werden er voor mobiele fase A drie verschillende solventen uitgetest die elk een andere pH-waarde hadden.



De resultaten van de scoutingsmethodes toonden aan dat 10 mM ammoniumformaat in water zorgde voor een hogere signaalintensiteit in vergelijking met 10 mM ammoniumacetaat in water. Tot slot werd vastgesteld dat door de toevoeging van 0,1% methaanzuur aan mobiele fase A de signaalintensiteit gedeeltelijk was afgenomen in combinatie met de eerder beschreven gradiënten.

#### 4.2.2 Verdere manuele ontwikkeling

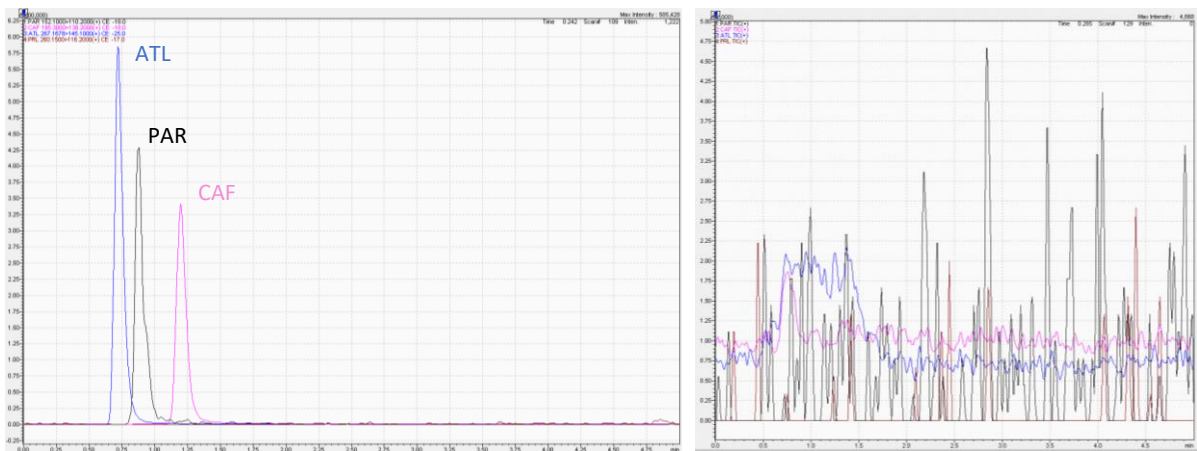
Na het uitvoeren van de analyses met behulp van de automatische scoutings werd de chromatografische analysemethode verder manueel ontwikkeld. Tijdens deze ontwikkeling werd er tevens gezocht naar een geschikte interne standaard die een gelijkaardige retentietijd en signaalintensiteit vertoont aan die van cafeïne. Atenolol, methotrexaat en sulfasalazine waren de eerste drie geneesmiddelen die samen met cafeïne werden geanalyseerd. Figuur 15 geeft respectievelijk de chromatogram weer van de geanalyseerde standaardoplossingen (100 ng/mL cafeïne, atenolol, methotrexaat, sulfasalazine) en de bijhorende blanco-injectie. Uit dit resultaat werd geconcludeerd dat methotrexaat en sulfasalazine geen geschikte interne standaarden konden zijn voor cafeïne. Methotrexaat had namelijk een te grote signaalintensiteit in vergelijking met cafeïne desondanks de gelijke concentratie en sulfasalazine had een retentietijd die buiten de vijf minuten analysetijd elueerde. Atenolol had aan de andere hand meer potentieel omwille van de gelijkaardige signaalintensiteit en een retentietijd die verschoven kon worden door de gradiënt aan te passen.



Figuur 15: Chromatogrammen van respectievelijk standaardoplossing met cafeïne, atenolol, methotrexaat en sulfasalazine (100 ng/mL) en bijhorende blancostaal (HPLC grade water). Stationaire fase: Biphenyl (50 x 2,1 mm). Mobiele fase A: ammoniumacetaat 10 mM. Mobiele fase B: methanol. Gradiënt: 20% B (0 - 0,50 min), 20-50% B (0,50 -1,50), 50% B (1,50 - 3,00 min), 50 - 20% B (3,00 - 3,50 min), 20% B (3,50 - 5,00 min). Injectievolume: 2 µL. Flowsnelheid: 0,4 mL/min. Analysetijd: 5,00 min. Detectie werd uitgevoerd op een LCMS-8050 Triple Quadrupole massa spectrometer (Shimadzu).

Na het testen van tientallen gradiënten en enkele isocratische eluties met als doel een betere chromatografische scheiding te krijgen tussen cafeïne en atenolol, werden er nog twee andere geneesmiddelen getest. Deze twee geneesmiddelen waren paracetamol en propranolol.

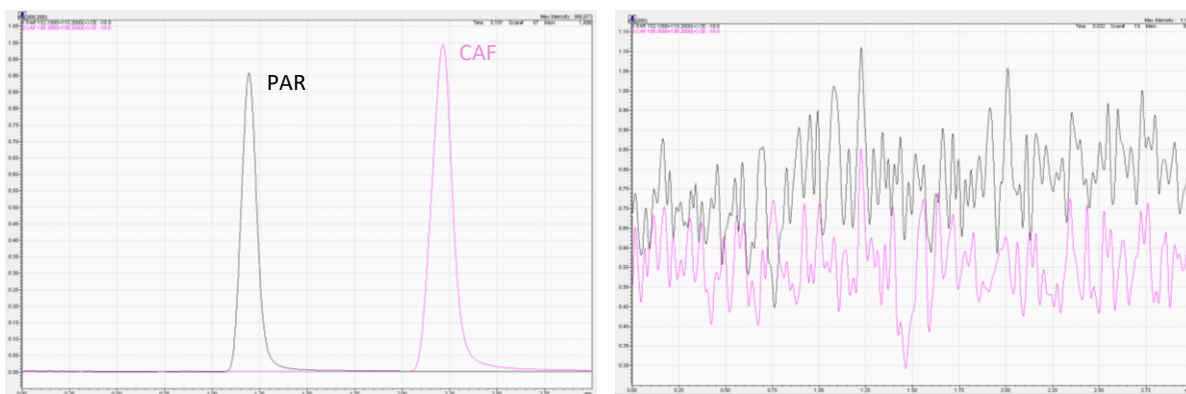
Figuur 16 geeft respectievelijk de chromatogrammen weer van de geanalyseerde standaardoplossing (100 ng/mL cafeïne, atenolol, paracetamol, propranolol) en de bijhorende blanco-injectie. Uit dit resultaat was af te leiden dat de signaalintensiteit en piekvorm van paracetamol meer overeenstemde met die van cafeïne dan atenolol deed en dat de toevoeging van propranolol volledig irrelevant bleek te zijn. Bij een isocratische elutie met 30% methanol, 70% ammoniumformaat + 0,1% methaanzuur en een C8 analytische kolom (100 x 2,1 mm) bedroegen de retentietijden van paracetamol en cafeïne respectievelijk 0,90 minuten en 1,25 minuten. Op basis van dit resultaat werd besloten dat uit alle uitgeteste geneesmiddelen paracetamol het meest geschikt was om te functioneren als interne standaard voor cafeïne.



Figuur 16: Chromatogrammen van respectievelijk standaardoplossing met cafeïne, atenolol en paracetamol (100 ng/mL) en bijhorende blanco-injectie (HPLC grade water). Stationaire fase: C8 (100 x 2,1 mm). Mobile fase A: ammoniumformaat 10 mM + 0,1% methaanzuur. Mobile fase B: methanol. Isocratisch: 30% B. Injectievolume: 2 µL. Flowsnelheid: 0,4 mL/min. Analysetijd: 5,00 min.

Uit het resultaat van figuur 16 was het duidelijk dat de gehanteerde parameters voor de analyse zeer dicht in de buurt kwamen bij het streefdoel. De laatste wijzigingen die nagestreefd werden, waren een vermindering van de analysetijd naar 3,0 minuten en een iets hogere retentietijd van zowel het analyt als de interne standaard. Om dit te bereiken bleven de stationaire en mobiele fases ongewijzigd, maar werd er wel overgegaan naar een 25% isocratische elutie. Een voorbeeld van hoe de chromatogrammen er vervolgens kwamen uit te zien is weergegeven in figuur 17 waarop een chromatogram weergegeven is van een high quality control en de bijhorende blanco-injectie.

De finale chromatografische analysemethode maakte gebruik van een analytische C8 kolom (100 x 2,1 mm) als stationaire fase, 10 mM ammoniumformaat + 0,1% methaanzuur als mobiele fase A, methanol als mobiele fase B, een flowsnelheid van 0,4 mL/min, 25% isocratische elutie en een analysetijd van 3,0 minuten. De retentietijden van de interne standaard paracetamol en van het analyt cafeïne bedroegen respectievelijk 1,20 minuten en 2,25 minuten.



Figuur 17: Chromatogrammen van respectievelijk HQC met cafeïne (300 ng/mL) + paracetamol als IS (100 ng/mL) en bijhorende blancostaal (HPLC grade water). Stationaire fase: C8 (100 x 2,1 mm). Mobiele fase A: ammoniumformaat 10 mM + 0,1% methaanzuur. Mobiele fase B: methanol. Isocratisch: 25% B. Injectievolume: 2 µL. Flowsnelheid: 0,4 mL/min. Analysetijd: 3,00 min.

### 4.3 Validatie

De ontwikkelde analysemethode werd gevalideerd volgens de Q2 richtlijnen van het ICH voor de selectiviteit, lineariteit, gevoeligheid, precisie, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid. De carry-over werd gevalideerd volgens de M10 richtlijnen van het ICH. Voor de validatie werden drie runs uitgevoerd met telkens nieuwe kalibratiestandaarden en QC's op niet-consecutieve dagen.

#### 4.3.1 Selectiviteit/specificiteit

Volgens de ICH Q2 richtlijnen worden selectiviteit en specificiteit gedefinieerd als "termen die de mate beschrijven waarin andere stoffen interfereren met de bepaling van een analyt volgens een gegeven analytische procedure". Verder wordt er in de richtlijn verduidelijkt dat de term 'specificiteit' meestal gebruikt wordt om de uiteindelijke toestand te beschrijven waarbij een gewenst analyt ondubbelzinnig wordt gemeten. 'Selectiviteit' is een relatieve term die de graad beschrijft waarin bepaalde analyten in mengsels of matrices gemeten kunnen worden zonder interferentie van andere componenten met een vergelijkbaar gedrag.

De selectiviteit van de analysemethode werd rekenkundig bepaald voor zowel cafeïne als de interne standaard. Volgens de ICH richtlijnen dient de procentuele interferentie lager te zijn dan 20%. Dit percentage wordt berekend door het quotiënt te bepalen tussen de oppervlakten onder de curves van het desbetreffende analyt in zowel het blancostaal als CCS 1 en dit vervolgens procentueel uit te drukken. Na het uitvoeren van deze berekening (tabel 9) werd geconcludeerd dat de ontwikkelde methode selectief is voor zowel cafeïne als de interne standaard paracetamol.

Tabel 9: Bewijs voor de selectiviteit de ontwikkelde LC-MS/MS methode. S/N (Bl.): Signal-to-noise ratio van het blancostaal.

|       | S/N (Bl.) | % interferentie CAF | % interferentie PAR |
|-------|-----------|---------------------|---------------------|
| Run 1 | 2,43      | 5,2                 | 0,4                 |
| Run 2 | 0,47      | 0,9                 | 0,3                 |
| Run 3 | 1,30      | 2,3                 | 0,2                 |

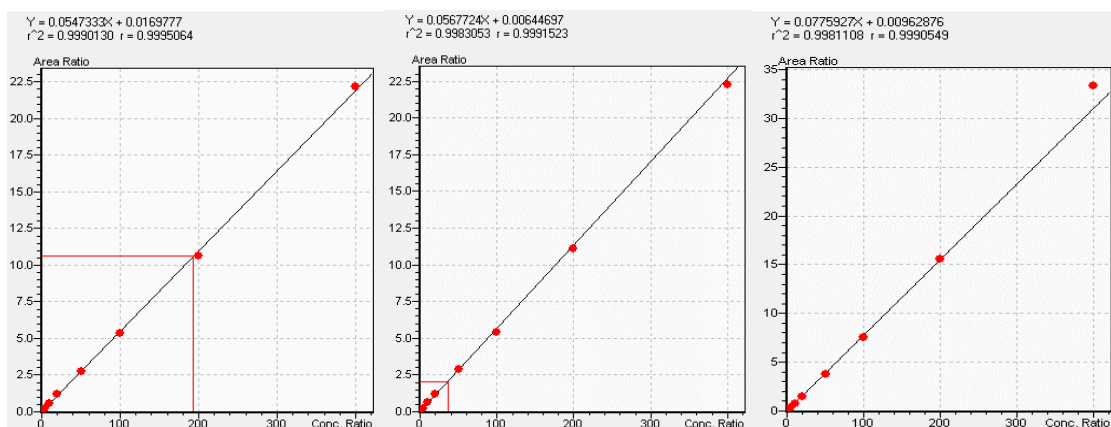
#### 4.3.2 Lineariteit en kwantificatielimiet (LLOQ)

De lineariteit of de ‘respons’ van een analytische methode wordt volgens de ICH Q2 richtlijnen gedefinieerd als “het vermogen (binnen een bepaald bereik) om een signaal te verkrijgen dat effectief gerelateerd is met de concentratie (hoeveelheid) of de activiteit van een analyt in een staal volgens een wiskundige vergelijking”. Om de lineariteit na te gaan van de ontwikkelde analysemethode werd er voor elke run een nieuwe reeks van acht kalibratiestandaarden bereid. Tabel 10 geeft een overzicht van de reële en theoretische concentraties van de verschillende kalibratiestandaarden afkomstig van de drie uitgevoerde runs samen met enkele statistische gegevens. De accuraatheid van de acht kalibratiestandaarden voldoen allemaal aan de eis van de ICH M10 richtlijnen (CCS 1:  $\pm 20\%$  CCS 2-7:  $\pm 15\%$ ). Voor de validatie van de LLOQ (CCS 1) kan er gekeken worden naar de signal-to-noise ratio van deze standaard. Deze moet volgens de Q2 richtlijnen minstens 10:1 bedragen om acceptabel te zijn. Run 2 had de laagste ratio met 20,88 als resultaat. Dit zou erop wijzen dat de methode accuraat en precies CCS 1 kan kwantificeren. De resultaten uit de eerste kolom van tabel 10 bevestigen dit.

*Tabel 10: Statistische data van kalibratiestandaarden CCS 1 tot en met CCS 8 van de drie uitgevoerde runs. De bovenste helft van de tabel geeft de reële en theoretische concentraties aan cafeïne weer in de standaarden uitgedrukt in ng/mL. De onderste helft geeft het gemiddelde (Gem.), de standaarddeviatie (SD), de variatiecoëfficiënt (VC%) en de accuraatheid (Acc.) weer die berekend werden vanuit elk CCS-niveau van de drie runs. De gebruikte wegingsfactor was  $1/x^2$ .*

|                  | [CCS 1] | [CCS 2] | [CCS 3] | [CCS 4] | [CCS 5] | [CCS 6] | [CCS 7] | [CCS 8] |
|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Theor. C (ng/mL) | 2,00    | 4,00    | 10,00   | 20,00   | 50,00   | 100,00  | 200,00  | 400,00  |
| Run 1 C (ng/mL)  | 2,0     | 3,92    | 10,15   | 21,06   | 49,48   | 97,96   | 193,28  | 405,27  |
| Run 2 C (ng/mL)  | 1,95    | 4,08    | 10,69   | 20,40   | 50,22   | 95,62   | 194,93  | 392,49  |
| Run 3 C (ng/mL)  | 1,98    | 4,15    | 9,84    | 19,24   | 48,90   | 97,13   | 200,77  | 429,71  |
| Gem. (ng/mL)     | 1,98    | 4,05    | 10,23   | 20,23   | 49,53   | 96,90   | 196,33  | 409,16  |
| SD               | 0,02    | 0,12    | 0,43    | 0,92    | 0,67    | 1,19    | 3,94    | 18,91   |
| VC%              | 1,24    | 2,89    | 4,17    | 4,56    | 1,35    | 1,23    | 2,01    | 4,62    |
| Acc. %           | 98,84   | 101,22  | 102,26  | 101,16  | 99,07   | 96,90   | 98,16   | 102,29  |
| n                | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       |

Hieronder op figuur 18 zijn de drie kalibratiecurves weergegeven die werden verkregen vanuit bovenstaande kalibratiestandaarden. Bij de drie curves was de correlatiecoëfficiënt ( $R^2$ ) acceptabel ( $>0,99$ ). Uit deze resultaten werd besloten dat de ontwikkelde methode lineair is voor cafeïne over het concentratiebereik van 2,0 tot en met 400,0 ng/mL.



Figuur 18: Verkregen kalibratiecurves van respectievelijk run 1, 2 en 3 (lineariteit).

### 4.3.3 Carryover

Carryover kan aanschouwd worden als een vorm van contaminatie van achtergebleven analyt-moleculen tussen opeenvolgende analyses, die aanleiding kan geven tot analytische fouten tijdens de kwantificatie. De carryover van zowel cafeïne als van de interne standaard zijn weergegeven in tabel 11. Deze resultaten procentueel uitgedrukt werden bekomen door het quotiënt te bepalen tussen de oppervlakte onder de piek van een blankostaal dat geïnjecteerd werd na CCS 8 en die van CCS 1. Bij een percentage groter dan 20%, kan er gesproken worden van een carryover van het analyt. Voor de interne standaard bedraagt de grenswaarde 5% (ICH, M10).

Tabel 11: Procentuele carryover van cafeïne (CAF) en de interne standaard paracetamol (PAR)

|       | Carryover CAF (%) | Carryover PAR (%) |
|-------|-------------------|-------------------|
| Run 1 | 38,7              | 0,4               |
| Run 2 | 36,3              | 0,3               |
| Run 3 | 24,0              | 0,2               |

Deze resultaten uit de tabel tonen aan dat er bij alle drie van de uitgevoerde runs een carryover aanwezig was voor cafeïne, maar niet voor de interne standaard. Aangezien de percentages van de cafeïne carryover groter zijn dan 20% voldoet de methode niet aan deze parameter volgens de ICH M10 richtlijnen. Echter zijn er een paar zaken die deze carryover kunnen verklaren. De eerste mogelijke oorzaak is de mobiele fase B. Hier werd er zoals eerder aangehaald gekozen voor methanol. Dit solvent heeft een lagere elutiesterkte in vergelijking met bijvoorbeeld acetonitril en is daarom niet in staat om de analytische kolom binnen de 3,0 minuten analysetijd volledig te reinigen. Een verandering van deze mobiele fase of van het percentage van mobiele fase B zou een verandering in de chromatografie en de detectie teweegbrengen, maar kan mogelijks de carryover verhelpen. Een tweede factor waar deze carryover van afkomstig kan zijn, zijn de fittingen in het HPLC toestel. Bij de derde run werden er namelijk omwille van technische redenen twee fittingen omzeild en dit bleek uit de resultaten wel degelijk invloed te hebben op de carryover.

Alhoewel deze carryover niet wenselijk is, blijkt dit geen invloed te hebben gehad op de bekomen concentraties van de quality control samples (QC's). In theorie zou een carryover namelijk zorgen voor een stijging in de respons van een staal dat geïnjecteerd wordt na een ander staal met een hoge concentratie van het analyt. In praktijk was dit echter niet het geval zoals blijkt uit de resultaten (bijlage 9). Tot slot is er ook nog de mogelijkheid om één of meerdere blancostalen te injecteren tussen stalen waarvan er verwacht wordt dat deze een hoge concentratie aan cafeïne bevatten.

#### 4.3.4 Precisie, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid

Volgens de ICH Q2 richtlijnen wordt de precisie van een analytische methode gedefinieerd als “de mate van overeenstemming (mate van spreiding) die uitgedrukt wordt tussen een reeks metingen verkregen uit de analyses van verschillende staalafnames van eenzelfde homogeen staal onder vastgestelde condities.” Deze parameter wordt meestal uitgedrukt als de variantie, de standaardafwijking of de variatiecoëfficiënt van een reeks metingen. De nauwkeurigheid of accuraatheid van een analytische methode drukt de overeenkomst uit tussen de geaccepteerde referentiewaarde en de gemeten waarde(n) (ICH Q2). Tijdens dit onderzoekswerk werd ook de intra-labo reproduceerbaarheid getest door de precisie te bepalen tussen dezelfde analyses die uitgevoerd werden op verschillende dagen.

Tabel 12 geeft overzichtelijk de gemiddelde reële concentraties weer van de vier QC niveaus, alsook de bijhorende statistische parameters voor de precisie en de nauwkeurigheid. Deze resultaten zijn een groepering van de resultaten die weergegeven worden in bijlage 9.

De M10 richtlijnen van het ICH stelt de volgende eisen voor zowel de within-run als de between-run precisie en de nauwkeurigheid: voor de accuraatheid dient de concentratie van elk QC-niveau binnen  $\pm 15\%$  van de target waarde te liggen, behalve bij de LLOQ, deze dient binnen  $\pm 20\%$  van de target waarde te liggen. De precisie (VC%) van de concentraties van elk QC-niveau mag niet meer dan 15% bedragen, behalve bij de LLOQ, deze dient niet groter te zijn dan 20%. Uit de resultaten en de berekeningen kan worden geconcludeerd dat de analytische methode voldoet aan deze vereisten voor zowel de within-run precisie en nauwkeurigheid (bijlage 9), als de between-run precisie en nauwkeurigheid (tabel 12).

Tabel 12: Between-run precisie en nauwkeurigheid data van de uitgevoerde runs

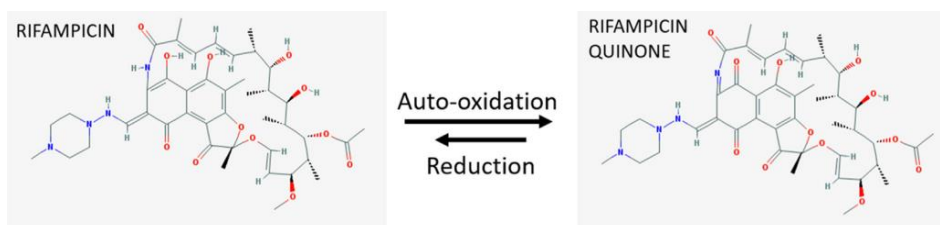
| Run 1-3          | LLOQ QC | LQC  | MQC   | HQC    |
|------------------|---------|------|-------|--------|
| Theor. C (ng/mL) | 2       | 6    | 30    | 300    |
| Gem. C (ng/mL)   | 1,72    | 5,37 | 28,18 | 283,51 |
| SD               | 0,1     | 0,2  | 1,1   | 8,8    |
| VC%              | 7,9     | 3,4  | 4,0   | 3,1    |
| Acc. %           | 85,9    | 89,5 | 93,9  | 94,5   |
| n                | 18      | 18   | 18    | 18     |

## 5. Troubleshooting van een LC-MS/MS methode

---

Troubleshooting is een zeer relevant onderwerp wanneer men het heeft over HPLC methodes. Gedurende de methodeontwikkeling kunnen er namelijk problemen optreden die gelinkt kunnen worden aan het toestel ofwel aan de methode. Gedurende de stageperiode werd er binnen het bedrijf gewerkt aan een project dat als doel had om een kwantitatieve bepaling uit te voeren van rifampicine in menselijk plasma. Tijdens de analyses werd een opmerkelijke trend waargenomen. Uit de chromatogrammen was af te leiden dat er na verloop van tijd een interfererende piek begon te ontstaan bij dezelfde retentietijd als het analyt rifampicine. Om de twee pieken beter te kunnen monitoren werd de chromatografische methode aangepast zodat de twee pieken verschillende retentietijden bekwamen. Uit verdere analyses werd afgeleid dat naarmate de tijd vorderde, de intensiteit van de rifampicine piek in de chromatograms geleidelijk aan begon af te nemen, alsook dat de intensiteit van de andere piek langzamerhand toenam. Beide moleculen hadden tevens een zeer gelijkaardige exacte massa waardoor de massadetector geen onderscheid kon maken tussen beiden. Deze bevindingen gaven het vermoeden dat de rifampicine in de stalen, die in de autosampler bewaard werden bij 4°C, niet stabiel was en werd omgezet naar een andere molecule met een zeer gelijkaardige m/z waarde. Een literatuurstudie volgde om de oorsprong van deze extra piek, die afkomstig kon zijn van een metaboliet ofwel van een degradatieproduct, te achterhalen.

Uit de literatuurstudie kwamen er drie moleculen naar voor die mogelijks de oorzaak konden zijn van de extra piek. 25-desacetyl rifampicine is het belangrijkste actieve metaboliet dat gevormd wordt uit rifampicine. Een andere molecule dat in zuur milieu gevormd kan worden ten gevolge van hydrolyse is 3-formyl rifamycine SV. Tot slot hebben verschillende onderzoeken al aangetoond dat er gemakkelijk in-vitro auto-oxidatie kan optreden van rifampicine met als gevolg dat de molecule rifampicine quinone wordt gevormd zoals hieronder te zien is op figuur 19 (Sutradhar, et al. 2020)



Figuur 19: Auto-oxidatie van rifampicine (Sutradhar, 2020)

De auto-oxidatie en de pH van de stalen waren twee factoren waarop ingegrepen kon worden. Gezien de abundantie van de wetenschappelijke artikelen waarin deze auto-oxidatie vermeld wordt, werd er geprobeerd om dit te verhinderen door een antioxidant toe te voegen aan de stalen.

Ascorbinezuur werd hiervoor gekozen waarna de stabiliteit van rifampicine werd getest over de loop van een handvol dagen. De toevoeging van dit antioxidant zorgde ervoor dat de intensiteit van de rifampicine piek meer constant bleef dan voordien, alsook dat de extra piek aanzienlijk minder aanwezig was.

Er werd geconcludeerd dat rifampicine quinone en dus de auto-oxidatie van rifampicine de onbetwiste oorzaak was van additionele piek en dat ascorbinezuur zorgt voor een betere stabiliteit van rifampicine in de autosampler.

## 6. Conclusie

---

Het doel van dit onderzoekswerk was om een LC-MS/MS methode te ontwikkelen en te valideren die gebruikt kan worden voor de kwantificatie van cafeïne in verschillende soorten koffie en thee.

Uit al de geteste moleculen bleek paracetamol het meest geschikt te zijn als interne standaard omwille van het feit dat de retentietijd en de signaalsterkte het meest in overeenstemming kwamen met die van cafeïne. Een MS tuning werd uitgevoerd voor het verkrijgen van de MRM-detectieparameters van het analyt en de interne standaard. Hieruit werden de volgende transities verkregen: 195,30/138,20 en 195,30/110,00 voor cafeïne, 152,10/93,20 en 152,10/110,20 voor paracetamol. De ontwikkelde chromatografische analysemethode maakte gebruik van een analytische Kinetex<sup>®</sup> 1,7 µm C8 kolom (100 x 2,1 mm), 10 mM ammoniumformaat + 0,1% methaanzuur in water als mobiele fase A en methanol als mobiele fase B. Een isocratische elutie werd gebruikt met 25% mobiele fase B. De flowsnelheid werd ingesteld op 0,4 mL/min en de oventemperatuur op 40°C. Het injectievolume bedroeg 2,0 µL en de analysetijd 3,0 minuten.

De analysemethode werd tot slot gevalideerd voor de selectiviteit, lineariteit, kwantificatielimit, carryover, precisie, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid volgens de Q2 en M10 richtlijnen van het ICH. Uit de resultaten van deze validatie werd geconcludeerd dat de methode voldoet aan de vereisten van deze richtlijnen voor alle parameters behalve voor de carryover. Het falen van deze parameter kan mogelijks te verwijten zijn aan de elutiesterkte van de mobiele fase en de fittingen in het HPLC toestel.

Uit dit onderzoek is gebleken hoe de workflow van een methodeontwikkeling binnen een analytisch labo verloopt en dat de ontworpen analysemethode succesvol gevalideerd is. Deze methode zal worden gebruikt voor de analyses van verschillende soorten koffie en thee. De resultaten van deze analyses zullen besproken worden in het verslag dat gekoppeld is aan de FBT laboratoriumstage.



## 7. Referenties

---

1. Agilent. (1998). *Basics of LC/MS*. agilent.com. Geraadpleegd op 1 februari 2024, van <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf>
2. Armenta S, Garrigues S, De la Guardia M. *Trends Anal Chem*. 2008;27:497–511. doi: 10.1016/j.trac.2008.05.003. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>.
3. Arnaud M. J. (2011). Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of experimental pharmacology*, (200), 33–91. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_3)
4. *Back to Basics Gradient Retention Factor, K\**. (2020). Shimadzu.com. Geraadpleegd op 7 februari 2024, van [https://www.shimadzu.co.uk/sites/shimadzu.seg/files/SUK/BacktoBasics-average\\_k\\_V2.pdf](https://www.shimadzu.co.uk/sites/shimadzu.seg/files/SUK/BacktoBasics-average_k_V2.pdf)
5. Belgisch centrum voor farmacotherapeutische informatie. (2024). Gecommentarieerd geneesmiddelenrepertorium. BCFI. <https://www.bcfi.be/nl/chapters>
6. Berger, T. A., Berger, B. K., & Kogelman, K. (2022). Supercritical Fluid Chromatography for Chiral Analysis and Semi-preparative Purification. In *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-32-390644-9.00013-5>
7. Chen, S., & Kord, A. (2009). Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1216(34), 6204–6209. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.084>
8. *CHROMacademy | HPLC Chromatographic Parameters*. (z.d.). CHROMacademy. <https://www.chromacademy.com/channels/hplc-training-courses/principles/hplc-chromatographic-parameters/>
9. *CHROMacademy. | HPLC introduction* (z.d.). CHROMacademy. <https://www.chromacademy.com/channels/hplc-training-courses/principles/hplc-introduction/>
10. Cielecka-Piontek, J., Zalewski, P., Jelińska, A., & Garbacki, P. (2013). UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 76(21), 1429–1437. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2434-6>
11. Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
12. Deemter J, Zuiderweg A, Klingenberg A. *J Chem Eng Sci*. 1956;5:272–278. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=J+Chem+Eng+Sci&author=J+Deemter&author=A+Zuiderweg&author=A+Klingenberg&volume=5&publication\\_year=1956&pages=272-278&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=J+Chem+Eng+Sci&author=J+Deemter&author=A+Zuiderweg&author=A+Klingenberg&volume=5&publication_year=1956&pages=272-278&)
13. *European Pharmacopoeia online*. (2024). Publication Platform. <https://pheur.edqm.eu/home>
14. *Factors affecting resolution in HPLC*. (2024). sigmaaldrich.com. Geraadpleegd op 7 februari 2024, van <https://www.sigmaaldrich.com/BE/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/factors-affecting-resolution-in-hplc#retention-factor>

15. FSA – Food Standard Agency. new caffeine advice for pregnant women. Internet: <http://www.food.gov.uk/news/pressreleases/2008/nov/caffeineadvice>
16. Garg E, Zubair M. Mass Spectrometer. [Updated 2023 Jan 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589702/>
17. Goodwin L, While s, Spooner NL. *J Chromatogr Sci*. 2007;45:298–304. doi: 10.1093/chromsci/45.6.298. <https://doi.org/10.1093/chromsci/45.6.298>
18. Görög S. *Trends Anal Chem*. 2007;26:11–17. doi: 10.1016/j.trac.2006.07.011. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.07.011>.
19. Heckman, M.A.; Weil, J.; De Mejia, E.G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *J. Food Sci*. 2010, 75, R77–R87. <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x>
20. Hoge Gezondheidsraad. (2012). Gebruik van cafeïne in voedingsmiddelen. In [health.belgium.be](http://health.belgium.be) (NR. 8689).
21. Indorica Sutradhar, Muhammad H. Zaman. Evaluation of the effect of temperature on the stability and antimicrobial activity of rifampicin quinone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113941>.
22. Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001. 2, Pharmacology of Caffeine. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK223808/>
23. International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human use. (November, 2023). ICH Harmonized Guideline Validation of Analytical Procedures Q2(R2). Ich.org. [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2%28R2%29\\_Guideline\\_2023\\_1130-.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130-.pdf)
24. International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human use. (2022). Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis. Ich.org. [https://database.ich.org/sites/default/files/M10\\_Guideline\\_Step4\\_2022\\_0524.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf)
25. Jan Schuberth, in *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*, 2003
26. Jastrebova J, Strandler H, Patring J, Wiklund T (2011) *Chromatographia* 73:219–225. <http://www.waters.com/>
27. Katusz R, Bellew L, Mangravite J, Foery R. *J Chromatogr*. 1981;213:331–335. doi: 10.1016/S0021-9673(00)81917-2. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81917-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81917-2).
28. *Kinetex Core-Shell HPLC columns | Phenomenex*. (2023). [phenomenex.com. https://www.phenomenex.com/products/kinetex-hplc-column](https://www.phenomenex.com/products/kinetex-hplc-column)
29. Ligon, W. (2001). Organic Mass spectrometry. In *Elsevier eBooks* (pp. 6552–6555). <https://doi.org/10.1016/b0-08-043152-6/01158-x>
30. Mahoney, C.R.; Giles, G.E.; Marriott, B.P.; Judelson, D.A.; Glickman, E.L.; Geiselman, P.J.; Lieberman, H.R. Intake of caffeine from all sources and reasons for use by college students. *Clin. Nutr*. 2019, 38, 668–675. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561418301341>

31. Martin, A. J., & Synge, R. L. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *The Biochemical journal*, 35(12), 1358–1368. <https://doi.org/10.1042/bj0351358>
32. Mendes, V. M., Coelho, M., Tomé, A. R., Cunha, R. A., & Manadas, B. (2019). Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of Caffeine and Theobromine Using Non-Matched Matrix Calibration Curve. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(16), 2863. <https://doi.org/10.3390/molecules24162863>
33. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine. Retrieved March 1, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>.
34. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam* 2003;20(1):1-30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12519715/>
35. Rodak, K., Kokot, I., & Kratz, E. M. (2021). Caffeine as a Factor Influencing the Functioning of the Human Body-Friend or Foe?. *Nutrients*, 13(9), 3088. <https://doi.org/10.3390/nu13093088>
36. ScienceDirect. (2024). *Chromatography Detector*. ScienceDirect.com. Geraadpleegd op 12 maart 2024, van <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/chromatography-detector>
37. ScienceDirect. (2024). *Theoretical Plate: the concept of theoretical plates is often used to analyse zone broadening in chromatography*. ScienceDirect.com. Geraadpleegd op 16 februari 2024, van <https://doi.org/10.1016/b978-012220855-3/50010-9>
38. SCION Instruments. (2024, 28 februari). *Internal Standardization in chromatography explained | Internal StD*. <https://scioninstruments.com/blog/internal-standards-what-are-they-how-do-i-choose-use-and-benefit-from-them/>
39. Snyder L, Kirkland J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York: Wiley; 1979. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Introduction+to+Modern+Liquid+Chromatography&author=L+Snyder&author=J+Kirkland&publication\\_year=1979&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Introduction+to+Modern+Liquid+Chromatography&author=L+Snyder&author=J+Kirkland&publication_year=1979&)
40. Stauffer, E. S., Newman, R. N., & A. Dolan, J. A. D. (2008). Theoretical Plate: the concept of theoretical plates is often used to analyse zone broadening in chromatography. In *Fire Debris Analysis* (pp. 218–253). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-012220855-3/50010-9>
41. Swartz M (2005) Supplement LCGC
42. ThermoFisher Scientific. (2019, 17 oktober). What is chromatography and how does it work? *What is chromatography and how does it work?* Geraadpleegd op 1 februari 2024, van <https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-chromatography/>
43. Tilvi, S., Majik, M. S., & Singh, K. S. (2014). Mass Spectrometry for Determination of Bioactive Compounds. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (pp. 193–218). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63359-0.00008-2>
44. Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical biochemist. Reviews*, 40(3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>

## 8. Bijlagen

Bijlage 1: kolomcertificaat Kinetex 1.7 µm C8 100A (50 X 2.1 mm)

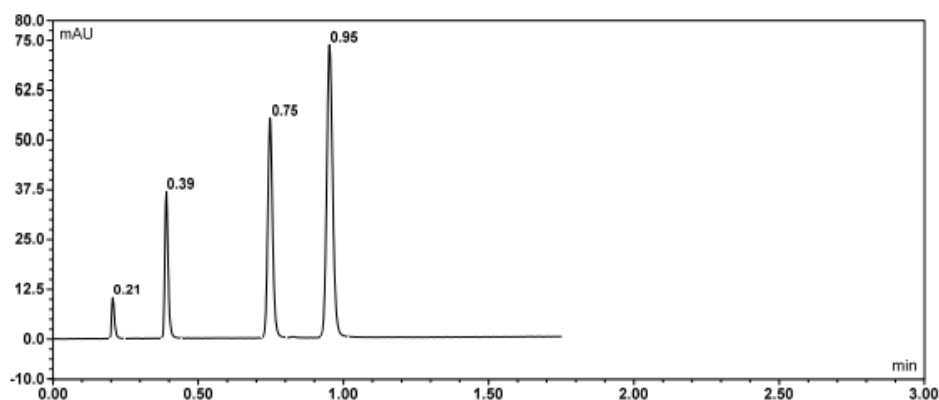


**Part #:** 00B-4499-AN  
**Description:** Kinetex 1.7u C8 100A

**Serial #:** H23-306880  
**Size:** 50 X 2.1 mm

**Measured parameters below based on last peak**

**Plates/meter:** 216460      **k Factor:** 3.618      **Batch #:** 5606-0146  
**Peak Asym.:** 1.17      **Ret. (min):** 0.95      **Analyte:** Naphthalene



**Test Analytes**

| Peak | Analyte      | Time | Area  | k Factor | Width | Plates (N) | Asymmetry |
|------|--------------|------|-------|----------|-------|------------|-----------|
| 1    | Uracil       | 0.21 | 0.118 | 0.000    | 0.010 | 2227       | 1.58      |
| 2    | Acetophenone | 0.39 | 0.486 | 0.894    | 0.012 | 6064       | 1.37      |
| 3    | Toluene      | 0.75 | 1.062 | 2.624    | 0.018 | 10067      | 1.22      |
| 4    | Naphthalene  | 0.95 | 1.723 | 3.618    | 0.022 | 10823      | 1.17      |

**Test Conditions**

**Mobile Phase:** 50%MECN/H2O      **Temperature (°C):** Ambient  
**Flow Rate (mL/min):** 0.50      **Injection (µL):** 0.1  
**Wavelength (nm):** 254      **Back Pressure (psi):** 5222  
**QC Approved:** Rashaabd      **Instrument:** LC-1200-8  
**Tested:** 07-Sep-2023

Note: The units used to report area have changed. This change does not impact the quality or performance of the product.

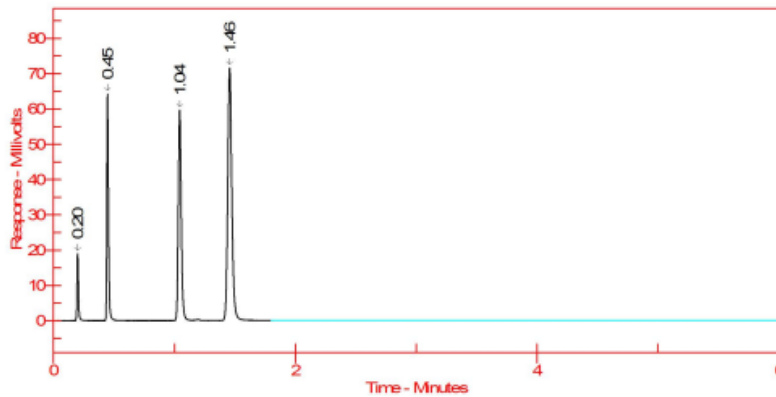
Phenomenex products are available worldwide. [www.phenomenex.com/mysupport](http://www.phenomenex.com/mysupport)

© 2019 Phenomenex, Inc. All rights reserved.

QUALITY MANAGEMENT SYSTEM CERTIFIED BY DNV GL  
 ISO 9001:2015



**Part No.:** 00B-4496-AN      **Serial No.:** H19-065088  
**Description:** Kinetex® 2.6 µm XB-C18 100 A      **Size:** 50 X 2.1 mm  
**Measured Parameters Based on the NAPHTHALENE Peak**  
**Efficiency:** 189187 plates/meter      **k Factor:** 6.282      **Batch No.:** 5603-0167  
**Peak Asym.:** 1.22      **Ret. Time:** 1.46 minutes



**Test Analytes**

**Testing Condition**

|                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Mobile Phase:</b> 50% MECN/H2O | <b>Temperature:</b> AMBIENT    |
| <b>Flow Rate:</b> 0.5 mL          | <b>Injection:</b> 0.1 µL       |
| <b>Detection:</b> 254 nm          | <b>Back Pressure:</b> 3343 psi |

**QC Approved:** Iman S.      **Instrument:** LC-1200-16  
**Tested:** 01 March 2019

Phenomenex products are available worldwide.

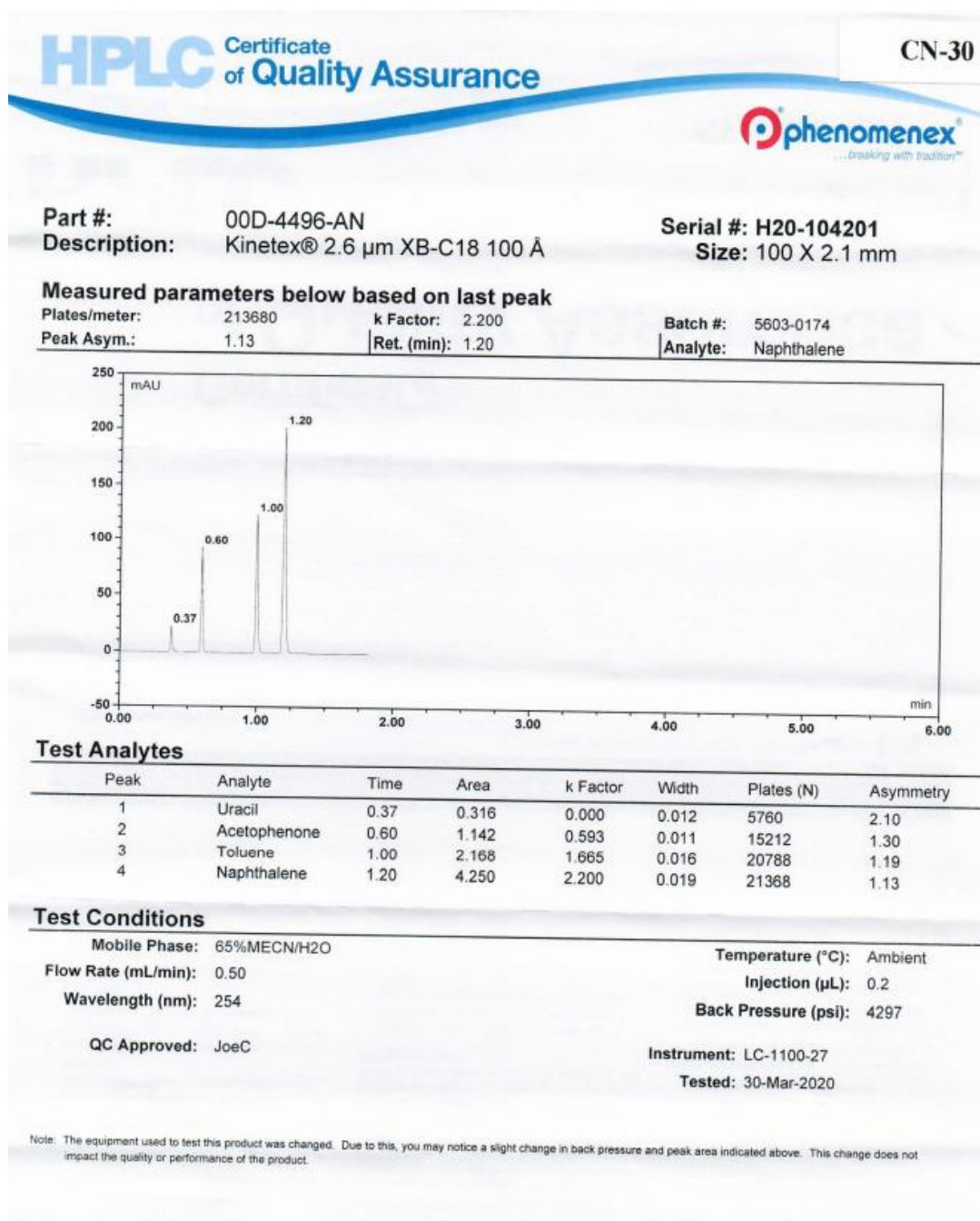
[www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)



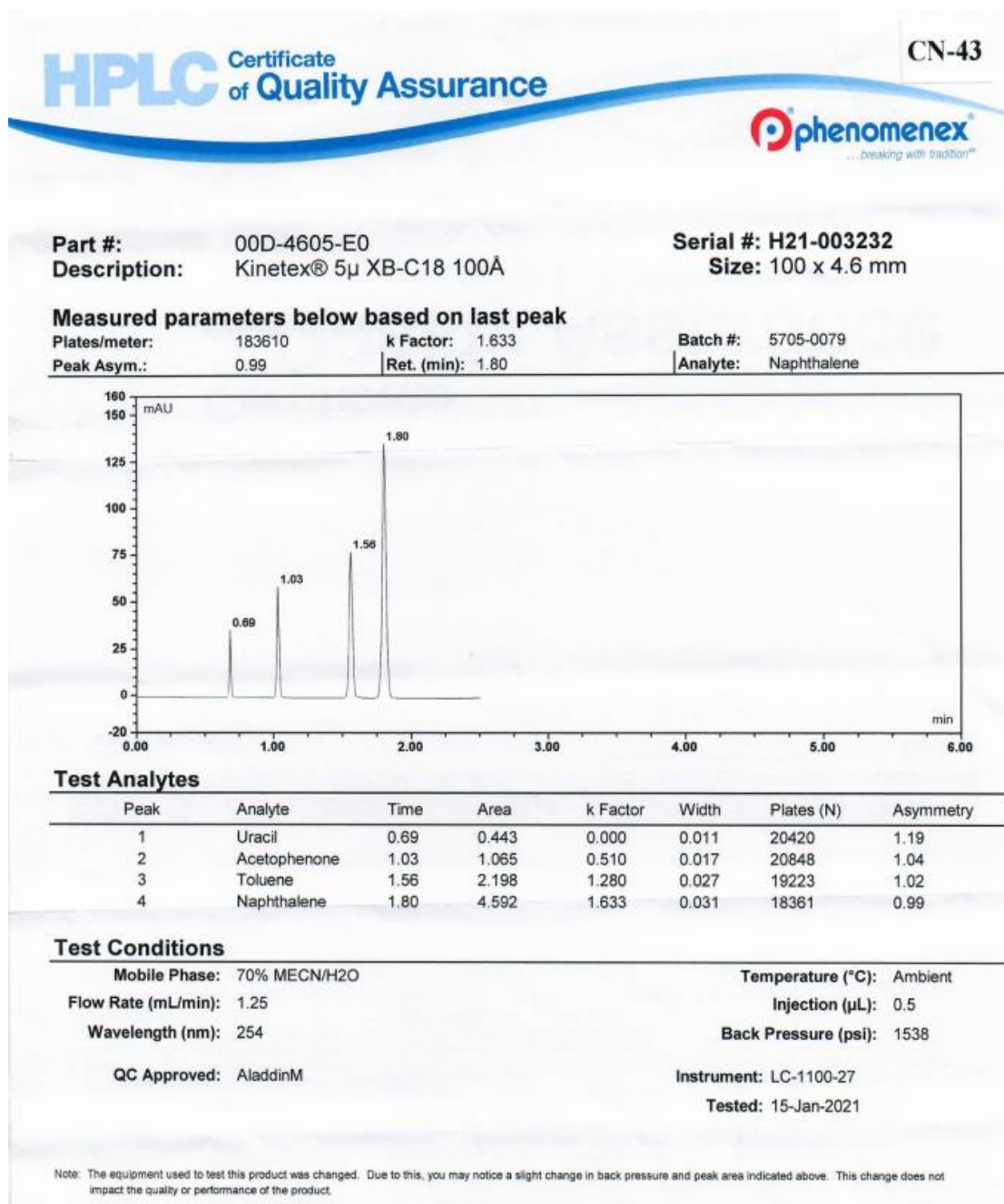
[support@phenomenex.com](mailto:support@phenomenex.com)

FR64911008\_L

Bijlage 3: kolomcertificaat Kinetex 2.6 µm C8 100A (100 X 2.1 mm)



Bijlage 4: kolomcertificaat Kinetex 1.7u C8 100A (50 X 2.1 mm)



Bijlage 5: kolomcertificaat Kinetex 1.7u C8 100A (50 X 2.1 mm)

**HPLC** Certificate of Quality Assurance

CN-45

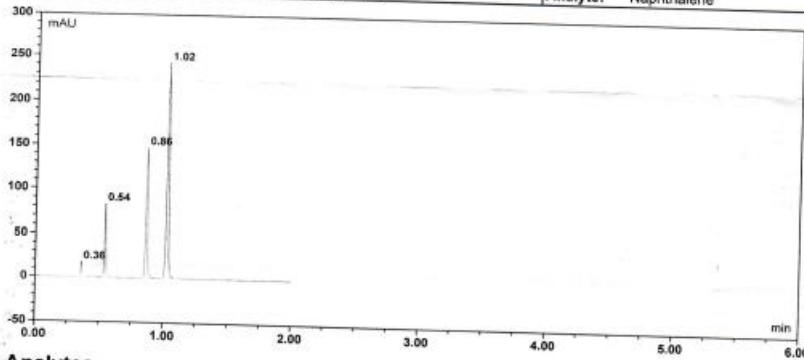


Part #: 00D-4498-AN  
Description: Kinetex 1.7u XB-C18 100A

Serial #: H21-122264  
Size: 100 x 2.1 mm

**Measured parameters below based on last peak**

Plates/meter: 230680      k Factor: 1.851      Batch #: 5605-0164  
Peak Asym.: 1.06      Ret. (min): 1.02      Analyte: Naphthalene



**Test Analytes**

| Peak | Analyte      | Time | Area  | k Factor | Width | Plates (N) | Asymmetry |
|------|--------------|------|-------|----------|-------|------------|-----------|
| 1    | Uracil       | 0.36 | 0.198 | 0.000    | 0.010 | 7917       | 1.41      |
| 2    | Acetophenone | 0.54 | 0.988 | 0.510    | 0.010 | 14883      | 1.39      |
| 3    | Toluene      | 0.86 | 2.228 | 1.399    | 0.014 | 21533      | 1.31      |
| 4    | Naphthalene  | 1.02 | 4.297 | 1.851    | 0.016 | 23088      | 1.06      |

**Test Conditions**

Mobile Phase: 65% MECN/H2O      Temperature (°C): Ambient  
Flow Rate (mL/min): 0.50      Injection (µL): 0.2  
Wavelength (nm): 254      Back Pressure (psi): 7403  
QC Approved: ImanS      Instrument: LC-1200-5  
Tested: 16-Apr-2021

Note: The units used to report area have changed. This change does not impact the quality or performance of the product.



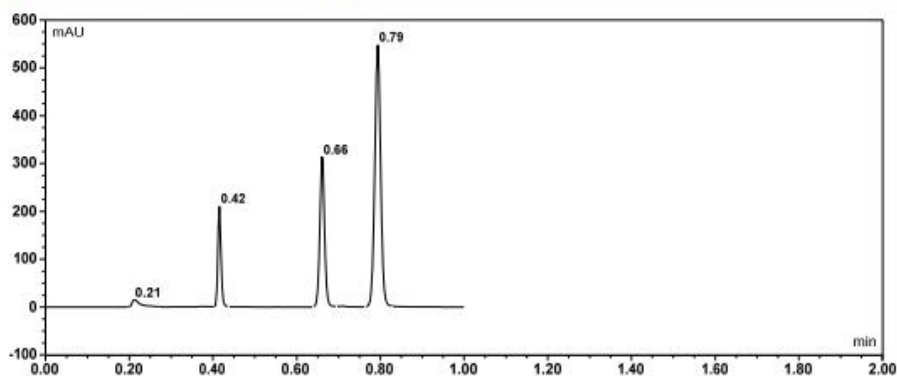
Bijlage 6: kolomcertificaat Kinetex 1.7u C8 100A (50 X 2.1 mm)



**Part #:** 00B-4748-AN **Serial #:** H24-014692  
**Description:** Luna® Omega 1.6 µm C18 Polar 100 Å **Size:** 50 x 2.1 mm

**Measured parameters below based on last peak**

**Plates/meter:** 323540 **k Factor:** 2.739 **Batch #:** 6598-0064  
**USP Tailing:** 1.01 **Ret. (min):** 0.79



**Test Analytes**

| Peak | Analyte      | Time | Area  | k Factor | Width | Plates (USP) | USP Tailing |
|------|--------------|------|-------|----------|-------|--------------|-------------|
| 1    | Uracil       | 0.21 | 0.329 | 0.000    | 0.017 | 998          | 2.88        |
| 2    | Acetophenone | 0.42 | 1.788 | 0.955    | 0.008 | 15573        | 1.18        |
| 3    | Toluene      | 0.66 | 4.149 | 2.113    | 0.012 | 16236        | 1.04        |
| 4    | Naphthalene  | 0.79 | 8.762 | 2.739    | 0.015 | 15982        | 1.01        |

**Test Conditions**

|                                   |                                  |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Mobile Phase:</b> 65% MECN/H2O | <b>Temperature (°C):</b> Ambient |
| <b>Flow Rate (mL/min):</b> 0.50   | <b>Injection (µL):</b> 1.0       |
| <b>Wavelength (nm):</b> 254       | <b>Back Pressure (psi):</b> 5809 |
| <b>QC Approved:</b> SamuelGer     | <b>Instrument:</b> LC-ACQ-03     |
|                                   | <b>Tested:</b> 19-Jan-2024       |

Phenomenex products are available worldwide.



[www.phenomenex.com/mysupport](http://www.phenomenex.com/mysupport)  
 © 2019 Phenomenex, Inc. All rights reserved.

QUALITY  
 MANAGEMENT SYSTEM  
 CERTIFIED BY DNV GL  
 = ISO 9001:2015 =

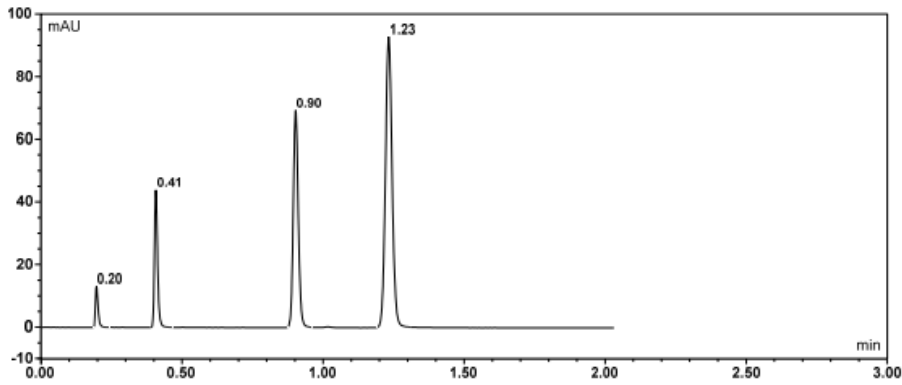
Bijlage 7: kolomcertificaat Kinetex 1.7u C8 100A (50 X 2.1 mm)



**Part #:** 00B-4498-AN **Serial #:** H23-326765  
**Description:** Kinetex 1.7u XB-C18 100A **Size:** 50 x 2.1 mm

**Measured parameters below based on last peak**

**Plates/meter:** 267140 **k Factor:** 5.272 **Batch #:** 5605-0192  
**Peak Asym.:** 1.10 **Ret. (min):** 1.23 **Analyte:** Naphthalene



**Test Analytes**

| Peak | Analyte      | Time | Area  | k Factor | Width | Plates (N) | Asymmetry |
|------|--------------|------|-------|----------|-------|------------|-----------|
| 1    | Uracil       | 0.20 | 0.146 | 0.000    | 0.010 | 2102       | 1.61      |
| 2    | Acetophenone | 0.41 | 0.566 | 1.068    | 0.012 | 6746       | 1.56      |
| 3    | Toluene      | 0.90 | 1.428 | 3.593    | 0.019 | 12497      | 1.20      |
| 4    | Naphthalene  | 1.23 | 2.526 | 5.272    | 0.025 | 13357      | 1.10      |

**Test Conditions**

**Mobile Phase:** 50% MECN/H2O **Temperature (°C):** Ambient  
**Flow Rate (mL/min):** 0.50 **Injection (µL):** 0.1  
**Wavelength (nm):** 254 **Back Pressure (psi):** 5459  
**QC Approved:** SetegnD **Instrument:** LC-1200-18  
**Tested:** 28-Sep-2023

Note: The units used to report area have changed. This change does not impact the quality or performance of the product.

Phenomenex products are available worldwide. **QUALITY MANAGEMENT SYSTEM CERTIFIED BY DNV GL ■ ISO 9001:2015 ■**

[www.phenomenex.com/mysupport](http://www.phenomenex.com/mysupport)  
 © 2019 Phenomenex, Inc. All rights reserved.

Bijlage 8: Overzichtstabel van alle uitgeteste methodes tijdens de manuele ontwikkeling van de chromatografische analysemethode.

|              |                                          |  |  |  |  | Data# | Data Filename                          | Area      | Height  | Ret. Time | S/N    | Tailing F. | Width(10%) | Average Area | Average Ret. T | Average Tailing F | Average Width |
|--------------|------------------------------------------|--|--|--|--|-------|----------------------------------------|-----------|---------|-----------|--------|------------|------------|--------------|----------------|-------------------|---------------|
| Best         |                                          |  |  |  |  | 1     | Sc_BiPhenyl_pH 2.7_ACN_100 CAF_75.lcd  | 657.238   | 179.738 | 0.483     | 399.11 | 1.468      | 0.112      | 648.563      | 0.482          | 1.449             | 0.111         |
| 2nd best     |                                          |  |  |  |  | 2     | Sc_BiPhenyl_pH 2.7_ACN_100 CAF_76.lcd  | 639.887   | 174.354 | 0.481     | 435.69 | 1.43       | 0.11       |              |                |                   |               |
| 3rd          |                                          |  |  |  |  | 3     | Sc_BiPhenyl_pH 2.7_MeOH_100 CAF_79.lcd | 1.104.036 | 193.812 | 0.584     | 288.59 | 1.386      | 0.168      | 1.159.149    | 0.588          | 1.373             | 0.1715        |
| 4th          |                                          |  |  |  |  | 4     | Sc_BiPhenyl_pH 2.7_MeOH_100 CAF_80.lcd | 1.214.262 | 205.211 | 0.592     | 324.97 | 1.36       | 0.175      |              |                |                   |               |
| 5th          |                                          |  |  |  |  | 5     | Sc_BiPhenyl_pH 3.5_ACN_100 CAF_83.lcd  | 849.980   | 226.619 | 0.483     | 461.6  | 1.309      | 0.113      | 848.986      | 0.482          | 1.3395            | 0.1105        |
| Gradient     | 10 to 60% MeOH                           |  |  |  |  | 6     | Sc_BiPhenyl_pH 3.5_ACN_100 CAF_84.lcd  | 847.992   | 231.938 | 0.481     | 519.28 | 1.37       | 0.108      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 7     | Sc_BiPhenyl_pH 3.5_MeOH_100 CAF_87.lcd | 2.027.805 | 337.957 | 0.604     | 337.94 | 1.392      | 0.18       | 2.134.995    | 0.5965         | 1.3855            | 0.174         |
| Conclusions: | MeOH gives higher/better Ret T           |  |  |  |  | 8     | Sc_BiPhenyl_pH 3.5_MeOH_100 CAF_88.lcd | 2.242.185 | 395.598 | 0.589     | 389.04 | 1.379      | 0.168      |              |                |                   |               |
|              | MeOH gives higher intensity              |  |  |  |  | 9     | Sc_BiPhenyl_pH 5.5_ACN_100 CAF_91.lcd  | 630.400   | 169.700 | 0.481     | 356.7  | 1.392      | 0.111      | 584.234      | 0.479          | 1.3785            | 0.1085        |
|              | pH 3.5 is the best pH value out of the 3 |  |  |  |  | 10    | Sc_BiPhenyl_pH 5.5_ACN_100 CAF_92.lcd  | 538.067   | 149.894 | 0.477     | 410.68 | 1.365      | 0.106      |              |                |                   |               |
|              | BiPhenyl and C8 seem to be the best SP's |  |  |  |  | 11    | Sc_BiPhenyl_pH 5.5_MeOH_100 CAF_95.lcd | 1.463.316 | 280.092 | 0.561     | 331.58 | 1.353      | 0.155      | 1.556.099    | 0.5605         | 1.347             | 0.1535        |
|              |                                          |  |  |  |  | 12    | Sc_BiPhenyl_pH 5.5_MeOH_100 CAF_96.lcd | 1.648.881 | 323.834 | 0.56      | 395.97 | 1.341      | 0.152      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 13    | Sc_C8_pH 2.7_ACN_100 CAF_3.lcd         | 820.446   | 252.716 | 0.478     | 396.84 | 1.45       | 0.098      | 827.828      | 0.4775         | 1.515             | 0.0965        |
|              |                                          |  |  |  |  | 14    | Sc_C8_pH 2.7_ACN_100 CAF_4.lcd         | 835.210   | 265.038 | 0.477     | 391.63 | 1.58       | 0.095      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 15    | Sc_C8_pH 2.7_MeOH_100 CAF_7.lcd        | 1.264.008 | 244.279 | 0.562     | 281.13 | 1.429      | 0.155      | 1.301.322    | 0.5635         | 1.419             | 0.1525        |
|              |                                          |  |  |  |  | 16    | Sc_C8_pH 2.7_MeOH_100 CAF_8.lcd        | 1.338.635 | 265.334 | 0.565     | 258.44 | 1.409      | 0.15       |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 17    | Sc_C8_pH 3.5_ACN_100 CAF_11.lcd        | 974.480   | 293.212 | 0.482     | 489.08 | 1.405      | 0.101      | 946.515      | 0.4805         | 1.508             | 0.101         |
|              |                                          |  |  |  |  | 18    | Sc_C8_pH 3.5_ACN_100 CAF_12.lcd        | 918.549   | 284.925 | 0.479     | 437.41 | 1.611      | 0.101      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 19    | Sc_C8_pH 3.5_MeOH_100 CAF_15.lcd       | 2.220.291 | 438.697 | 0.57      | 319.69 | 1.332      | 0.153      | 2.330.539    | 0.5695         | 1.3665            | 0.1545        |
|              |                                          |  |  |  |  | 20    | Sc_C8_pH 3.5_MeOH_100 CAF_16.lcd       | 2.440.786 | 469.222 | 0.569     | 348.99 | 1.401      | 0.156      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 21    | Sc_C8_pH 5.5_ACN_100 CAF_19.lcd        | 761.343   | 233.249 | 0.48      | 387.38 | 1.459      | 0.097      | 706.877      | 0.479          | 1.403             | 0.1025        |
|              |                                          |  |  |  |  | 22    | Sc_C8_pH 5.5_ACN_100 CAF_20.lcd        | 652.411   | 179.447 | 0.478     | 350.12 | 1.347      | 0.108      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 23    | Sc_C8_pH 5.5_MeOH_100 CAF_23.lcd       | 1.912.816 | 352.297 | 0.559     | 361.14 | 1.406      | 0.161      | 2.072.651    | 0.562          | 1.3515            | 0.1595        |
|              |                                          |  |  |  |  | 24    | Sc_C8_pH 5.5_MeOH_100 CAF_24.lcd       | 2.232.485 | 421.985 | 0.565     | 325.82 | 1.297      | 0.158      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 25    | Sc_F5_pH 2.7_ACN_100 CAF_100.lcd       | 641.962   | 179.150 | 0.477     | 426.65 | 1.331      | 0.106      | 659.148      | 0.4785         | 1.3685            | 0.1085        |
|              |                                          |  |  |  |  | 26    | Sc_F5_pH 2.7_ACN_100 CAF_99.lcd        | 676.333   | 183.303 | 0.48      | 473.51 | 1.406      | 0.111      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 27    | Sc_F5_pH 2.7_MeOH_100 CAF_103.lcd      | 1.102.293 | 212.291 | 0.555     | 339.4  | 1.326      | 0.154      | 1.142.488    | 0.5655         | 1.3495            | 0.16          |
|              |                                          |  |  |  |  | 28    | Sc_F5_pH 2.7_MeOH_100 CAF_104.lcd      | 1.182.683 | 209.049 | 0.576     | 307.76 | 1.373      | 0.166      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 29    | Sc_F5_pH 3.5_ACN_100 CAF_107.lcd       | 844.664   | 225.824 | 0.482     | 470.48 | 1.415      | 0.112      | 821.854      | 0.4815         | 1.3725            | 0.111         |
|              |                                          |  |  |  |  | 30    | Sc_F5_pH 3.5_ACN_100 CAF_108.lcd       | 799.043   | 211.348 | 0.481     | 399.46 | 1.33       | 0.11       |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 31    | Sc_F5_pH 3.5_MeOH_100 CAF_111.lcd      | 1.911.681 | 354.903 | 0.568     | 399.26 | 1.396      | 0.159      | 1.955.575    | 0.5715         | 1.3785            | 0.1615        |
|              |                                          |  |  |  |  | 32    | Sc_F5_pH 3.5_MeOH_100 CAF_112.lcd      | 1.999.468 | 363.733 | 0.575     | 411.63 | 1.361      | 0.164      |              |                |                   |               |
|              |                                          |  |  |  |  | 33    | Sc_F5_pH 5.5_ACN_100 CAF_115.lcd       | 589.820   | 158.514 | 0.479     | 397.03 | 1.389      | 0.112      | 575.874      | 0.482          | 1.3815            | 0.1105        |

|    |                                         |           |         |       |        |       |       |           |        |        |        |  |  |
|----|-----------------------------------------|-----------|---------|-------|--------|-------|-------|-----------|--------|--------|--------|--|--|
| 34 | Sc_F5_pH 5.5_ACN_100 CAF_116.lcd        | 561.928   | 153.439 | 0,485 | 358,51 | 1,374 | 0,109 |           |        |        |        |  |  |
| 35 | Sc_F5_pH 5.5_MeOH_100 CAF_119.lcd       | 1.415.870 | 266.034 | 0,558 | 314,24 | 1,396 | 0,16  | 1.628.819 | 0,559  | 1,343  | 0,1545 |  |  |
| 36 | Sc_F5_pH 5.5_MeOH_100 CAF_120.lcd       | 1.841.767 | 365.412 | 0,56  | 356,92 | 1,29  | 0,149 |           |        |        |        |  |  |
| 37 | Sc_Polar C18_pH 2.7_ACN_100 CAF_27.lcd  | 696.302   | 189.559 | 0,481 | 457,86 | 1,46  | 0,112 | 669.348   | 0,481  | 1,4045 | 0,1125 |  |  |
| 38 | Sc_Polar C18_pH 2.7_ACN_100 CAF_28.lcd  | 642.394   | 166.452 | 0,481 | 357,39 | 1,349 | 0,113 |           |        |        |        |  |  |
| 39 | Sc_Polar C18_pH 2.7_MeOH_100 CAF_31.lcd | 1.126.368 | 199.844 | 0,57  | 321,1  | 1,319 | 0,166 | 1.147.455 | 0,5685 | 1,344  | 0,1665 |  |  |
| 40 | Sc_Polar C18_pH 2.7_MeOH_100 CAF_32.lcd | 1.168.542 | 208.119 | 0,567 | 314,38 | 1,369 | 0,167 |           |        |        |        |  |  |
| 41 | Sc_Polar C18_pH 3.5_ACN_100 CAF_35.lcd  | 898.214   | 252.813 | 0,479 | 435,14 | 1,362 | 0,106 | 891.716   | 0,4795 | 1,327  | 0,1075 |  |  |
| 42 | Sc_Polar C18_pH 3.5_ACN_100 CAF_36.lcd  | 885.218   | 236.689 | 0,48  | 431,4  | 1,292 | 0,109 |           |        |        |        |  |  |
| 43 | Sc_Polar C18_pH 3.5_MeOH_100 CAF_39.lcd | 1.984.715 | 366.054 | 0,572 | 332,74 | 1,398 | 0,161 | 2.108.484 | 0,5695 | 1,391  | 0,1595 |  |  |
| 44 | Sc_Polar C18_pH 3.5_MeOH_100 CAF_40.lcd | 2.232.253 | 423.663 | 0,567 | 365,77 | 1,384 | 0,158 |           |        |        |        |  |  |
| 45 | Sc_Polar C18_pH 5.5_ACN_100 CAF_43.lcd  | 728.400   | 192.063 | 0,487 | 365,66 | 1,372 | 0,112 | 674.193   | 0,4875 | 1,356  | 0,1145 |  |  |
| 46 | Sc_Polar C18_pH 5.5_ACN_100 CAF_44.lcd  | 619.986   | 155.937 | 0,488 | 291,62 | 1,34  | 0,117 |           |        |        |        |  |  |
| 47 | Sc_Polar C18_pH 5.5_MeOH_100 CAF_47.lcd | 1.599.132 | 278.991 | 0,584 | 346,94 | 1,366 | 0,169 | 1.611.484 | 0,5855 | 1,3655 | 0,172  |  |  |
| 48 | Sc_Polar C18_pH 5.5_MeOH_100 CAF_48.lcd | 1.623.836 | 269.817 | 0,587 | 323,99 | 1,365 | 0,175 |           |        |        |        |  |  |
| 49 | Sc_XBC18_pH 2.7_ACN_100 CAF_51.lcd      | 675.420   | 171.604 | 0,483 | 482,85 | 1,41  | 0,116 | 655.392   | 0,4835 | 1,4045 | 0,1155 |  |  |
| 50 | Sc_XBC18_pH 2.7_ACN_100 CAF_52.lcd      | 635.363   | 163.726 | 0,484 | 358,61 | 1,399 | 0,115 |           |        |        |        |  |  |
| 51 | Sc_XBC18_pH 2.7_MeOH_100 CAF_55.lcd     | 1.112.652 | 207.088 | 0,572 | 282,74 | 1,34  | 0,16  | 1.163.637 | 0,573  | 1,3475 | 0,163  |  |  |
| 52 | Sc_XBC18_pH 2.7_MeOH_100 CAF_56.lcd     | 1.214.622 | 218.045 | 0,574 | 293,7  | 1,355 | 0,166 |           |        |        |        |  |  |
| 53 | Sc_XBC18_pH 3.5_ACN_100 CAF_59.lcd      | 840.887   | 235.129 | 0,478 | 455,32 | 1,407 | 0,107 | 827.107   | 0,479  | 1,3765 | 0,108  |  |  |
| 54 | Sc_XBC18_pH 3.5_ACN_100 CAF_60.lcd      | 813.326   | 220.989 | 0,48  | 402,48 | 1,346 | 0,109 |           |        |        |        |  |  |
| 55 | Sc_XBC18_pH 3.5_MeOH_100 CAF_63.lcd     | 1.992.319 | 347.886 | 0,587 | 341,84 | 1,4   | 0,171 | 2.057.739 | 0,596  | 1,399  | 0,1745 |  |  |
| 56 | Sc_XBC18_pH 3.5_MeOH_100 CAF_64.lcd     | 2.123.158 | 351.892 | 0,605 | 339,63 | 1,398 | 0,178 |           |        |        |        |  |  |
| 57 | Sc_XBC18_pH 5.5_ACN_100 CAF_67.lcd      | 691.502   | 184.644 | 0,485 | 429,66 | 1,345 | 0,114 | 661.493   | 0,4825 | 1,375  | 0,1125 |  |  |
| 58 | Sc_XBC18_pH 5.5_ACN_100 CAF_68.lcd      | 631.483   | 174.603 | 0,48  | 384,84 | 1,405 | 0,111 |           |        |        |        |  |  |
| 59 | Sc_XBC18_pH 5.5_MeOH_100 CAF_71.lcd     | 1.588.547 | 301.660 | 0,561 | 353,45 | 1,287 | 0,156 | 1.742.890 | 0,5765 | 1,302  | 0,1615 |  |  |
| 60 | Sc_XBC18_pH 5.5_MeOH_100 CAF_72.lcd     | 1.897.232 | 337.334 | 0,592 | 322,29 | 1,317 | 0,167 |           |        |        |        |  |  |

pH 2.7: 10 mM ammoniumformaat + 0,1% mierenzuur

pH 3.5: 10 mM ammoniumformaat

pH 5.5: 10 mM ammoniumacetaat + 0,1% azijnzuur

Bijlage 9: Within-run precisie en nauwkeurigheid data van de uitgevoerde runs tijdens de validatie

| <b>Run 1</b>     | LLOQ QC | LQC  | MQC   | HQC    |
|------------------|---------|------|-------|--------|
| Theor. C (ng/mL) | 2       | 6    | 30    | 300    |
| [QC 1]           | 1,79    | 5,43 | 26,64 | 277,09 |
| [QC 2]           | 1,66    | 5,15 | 27,61 | 274,19 |
| [QC 3]           | 1,65    | 5,12 | 28,25 | 278,58 |
| [QC 4]           | 1,56    | 5,25 | 26,57 | 274,8  |
| [QC 5]           | 1,6     | 5    | 27,15 | 281,49 |
| [QC 6]           | 1,39    | 5,23 | 29,4  | 272,57 |
| Gem. C (ng/mL)   | 1,61    | 5,20 | 27,60 | 276,45 |
| SD               | 0,1     | 0,1  | 1,1   | 3,3    |
| VC%              | 8,2     | 2,8  | 3,9   | 1,2    |
| Acc. %           | 80,4    | 86,6 | 92,0  | 92,2   |
| n                | 6       | 6    | 6     | 6      |

| <b>Run 2</b>     | LLOQ QC | LQC  | MQC   | HQC    |
|------------------|---------|------|-------|--------|
| Theor. C (ng/mL) | 2       | 6    | 30    | 300    |
| [QC 1]           | 1,89    | 5,56 | 30,43 | 278,30 |
| [QC 2]           | 1,64    | 5,48 | 28,38 | 275,74 |
| [QC 3]           | 1,80    | 5,49 | 29,23 | 280,59 |
| [QC 4]           | 1,55*   | 5,32 | 28,60 | 278,71 |
| [QC 5]           | 1,73    | 5,49 | 26,51 | 287,71 |
| [QC 6]           | 1,72    | 5,34 | 28,98 | 279,61 |
| Gem. C (ng/mL)   | 1,72    | 5,45 | 28,69 | 280,11 |
| SD               | 0,1     | 0,1  | 1,3   | 4,1    |
| VC%              | 6,9     | 1,8  | 4,5   | 1,5    |
| Acc. %           | 86,0    | 90,8 | 95,6  | 93,4   |
| n                | 6       | 6    | 6     | 6      |

| <b>Run 3</b>     | LLOQ QC | LQC  | MQC   | HQC    |
|------------------|---------|------|-------|--------|
| Theor. C (ng/mL) | 2       | 6    | 30    | 300    |
| [QC 1]           | 1,85    | 5,41 | 27,20 | 303,20 |
| [QC 2]           | 1,82    | 5,52 | 29,53 | 294,07 |
| [QC 3]           | 1,81    | 5,48 | 27,90 | 297,99 |
| [QC 4]           | 1,78    | 5,67 | 27,61 | 289,41 |
| [QC 5]           | 1,77    | 5,55 | 29,00 | 290,45 |
| [QC 6]           | 1,92    | 5,15 | 28,29 | 288,62 |
| Gem. C (ng/mL)   | 1,82    | 5,46 | 28,25 | 293,96 |
| SD               | 0,1     | 0,2  | 0,9   | 5,7    |
| VC%              | 3,1     | 3,2  | 3,1   | 1,9    |
| Acc. %           | 91,2    | 91,1 | 94,2  | 98,0   |
| n                | 6       | 6    | 6     | 6      |

## Bijlage 10: Bewijs voor het belang van de gekozen wegingsfactor ( $1/x^2$ )

| Data# | Da: Sample Name | Run 3 | Run 2 | Run 1 | WF: | 1x2 | Relative differences |       |       | Sum of absolute relative differences |
|-------|-----------------|-------|-------|-------|-----|-----|----------------------|-------|-------|--------------------------------------|
|       |                 |       |       |       |     |     | Run 3                | Run 2 | Run 1 |                                      |
| 1     | 20: Blank       |       |       |       |     |     |                      |       |       |                                      |
| 2     | 20: Blank + IS  |       |       |       |     |     |                      |       |       |                                      |
| 3     | 20: CCS 1       | 98,9  | 97,6  | 101,3 |     |     | 1,1                  | 2,4   | 1,3   | <b>62,2</b>                          |
| 4     | 20: CCS 2       | 103,7 | 101,9 | 96,6  |     |     | 3,7                  | 1,9   | 3,4   |                                      |
| 5     | 20: CCS 3       | 98,4  | 106,9 | 98    |     |     | 1,6                  | 6,9   | 2     |                                      |
| 6     | 20: CCS 4       | 96,2  | 102   | 99    |     |     | 3,8                  | 2     | 1     |                                      |
| 7     | 20: CCS 5       | 97,8  | 100,4 | 105,3 |     |     | 2,2                  | 0,4   | 5,3   |                                      |
| 8     | 20: CCS 6       | 97,1  | 95,6  | 101,5 |     |     | 2,9                  | 4,4   | 1,5   |                                      |
| 9     | 20: CCS 7       | 100,4 | 97,5  | 98    |     |     | 0,4                  | 2,5   | 2     |                                      |
| 10    | 20: CCS 8       | 107,4 | 98,1  | 100,2 |     |     | 7,4                  | 1,9   | 0,2   |                                      |
| 11    | 20: CO Blank    | ----- |       |       |     |     |                      |       |       |                                      |

| Data# | Da: Sample Name | Accuracy[%] | Run 3 | Run 2 | Run 1 | WF: | 1x | Relative differences |       |       |             |
|-------|-----------------|-------------|-------|-------|-------|-----|----|----------------------|-------|-------|-------------|
|       |                 |             |       |       |       |     |    | Run 3                | Run 2 | Run 1 |             |
| 1     | 20: Blank       |             |       |       |       |     |    |                      |       |       |             |
| 2     | 20: Blank + IS  |             |       |       |       |     |    |                      |       |       |             |
| 3     | 20: CCS 1       | 110,3       | 90,2  | 101,3 |       |     |    | 10,3                 | 9,8   | 1,3   | <b>86,2</b> |
| 4     | 20: CCS 2       | 107,5       | 99,5  | 96,6  |       |     |    | 7,5                  | 0,5   | 3,4   |             |
| 5     | 20: CCS 3       | 98          | 107,3 | 98    |       |     |    | 2                    | 7,3   | 2     |             |
| 6     | 20: CCS 4       | 94,3        | 103,3 | 99    |       |     |    | 5,7                  | 3,3   | 1     |             |
| 7     | 20: CCS 5       | 95          | 102,3 | 105,3 |       |     |    | 5                    | 2,3   | 5,3   |             |
| 8     | 20: CCS 6       | 94,1        | 97,6  | 101,5 |       |     |    | 5,9                  | 2,4   | 1,5   |             |
| 9     | 20: CCS 7       | 97,1        | 99,5  | 98    |       |     |    | 2,9                  | 0,5   | 2     |             |
| 10    | 20: CCS 8       | 103,8       | 100,3 | 100,2 |       |     |    | 3,8                  | 0,3   | 0,2   |             |
| 11    | 20: CO Blank    | -----       |       |       |       |     |    |                      |       |       |             |

| Data# | Da: Sample Name | Accuracy[%] | Run 3 | Run 2 | Run 1 | WF: | none | Relative differences |       |       |              |
|-------|-----------------|-------------|-------|-------|-------|-----|------|----------------------|-------|-------|--------------|
|       |                 |             |       |       |       |     |      | Run 3                | Run 2 | Run 1 |              |
| 1     | 20: Blank       |             |       |       |       |     |      |                      |       |       |              |
| 2     | 20: Blank + IS  |             |       |       |       |     |      |                      |       |       |              |
| 3     | 20: CCS 1       | 252,4       | 92,5  | 100,9 |       |     |      | 152,4                | 7,5   | 0,9   | <b>393,2</b> |
| 4     | 20: CCS 2       | 177         | 100,6 | 96,5  |       |     |      | 77                   | 0,6   | 3,5   |              |
| 5     | 20: CCS 3       | 124,1       | 107,7 | 98,3  |       |     |      | 24,1                 | 7,7   | 1,7   |              |
| 6     | 20: CCS 4       | 106,1       | 103,5 | 100,3 |       |     |      | 6,1                  | 3,5   | 0,3   |              |
| 7     | 20: CCS 5       | 98          | 102,3 | 109,4 |       |     |      | 2                    | 2,3   | 9,4   |              |
| 8     | 20: CCS 6       | 94,2        | 97,6  | 110,5 |       |     |      | 5,8                  | 2,4   | 10,5  |              |
| 9     | 20: CCS 7       | 95,6        | 99,5  | 121,4 |       |     |      | 4,4                  | 0,5   | 21,4  |              |
| 10    | 20: CCS 8       | 101,4       | 100,2 | 147,6 |       |     |      | 1,4                  | 0,2   | 47,6  |              |
| 11    | 20: CO Blank    | -----       |       |       |       |     |      |                      |       |       |              |