Bepaling van rivaroxaban in plasma met LC-MS/MS en methodevergelijk met de aangepaste anti-factor Xa bepaling.

Determination of rivaroxaban in plasma by LC-MS/MS and method comparison with the modified anti-factor Xa determination.



Ralph Brands
Studentnummer: 1594987
Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam
Afstudeer begeleider: A.W. Kruise
Afstudeer begeleider: J.G. Dijk - van Kuilenburg
Hogeschool Utrecht, Utrecht
Afstudeer begeleider: J. van Dijk

Amsterdam, 28-05-2013

Voorwoord

Als afstudeeropdracht, voor de deeltijd opleiding Chemie aan de Hogeschool Utrecht, heb ik gekozen voor het opzetten en valideren van een methode om rivaroxaban in plasma te bepalen met LC-MS/MS. Deze LC-MS/MS methode heb ik vervolgens gebruikt om methodevergelijk uit te voeren met de routine analyse methode voor de bepaling van rivaroxaban in plasma.
Ik heb gekozen voor dit onderwerp om meer ervaring te verkrijgen met de analytische apparatuur en bioanalytische methode validatie. Tevens vond ik het interessant om 2 analyse methoden met elkaar te vergelijken.
Bij deze wil ik graag van de gelegenheid gebruik maken om een aantal organisaties en mensen te bedanken:
Het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, mijn werkgever, voor het beschikbaar stellen van een afstudeerplaats. De firma Bayer Healthcare AG voor het kosteloos beschikbaar stellen van de referentiestof rivaroxaban. De heer E.J.F. Franssen, Ziekenhuisapotheker, voor zijn inzet om deze afstudeerplaats mogelijk te maken binnen de apotheek. Jolanda Dijk - van Kuilenburg voor de ondersteuning bij het tot stand komen van het verslag. Arnold Kruise voor zijn hulp bij de praktische uitvoering van de afstudeeropdracht. Mijn vrouw, Suntha Jutte, voor haar steun gedurende de studie.

Abstract

Rivaroxaban (Xarelto ®) is a direct factor Xa inhibitor from Bayer AG (Leverkusen, Germany), one of the new oral antithrombotic agents that have been approved since 2008 in the Netherlands for the prevention of blood clots in orthopedic surgery, such as placement of an artificial hip or knee. The current method within the Onze Lieve Vrouwe Gasthuis for therapeutic monitoring of rivaroxaban in plasma is the modified anti-factor Xa determination on routine coagulation equipment Sysmex CS2100i.
The aim of this study was to determine, by method comparison, the results of the modified anti-factor Xa assay (Biophen rivaroxaban assay on the CS2100i), compared to the results of a method in which the rivaroxaban concentration is determined directly in plasma. To determine rivaroxaban in plasma directly, a method was set up by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The sample preparation consisted of the addition of precipitation reagent containing the internal standard, to the plasma in order to precipitate proteins from the plasma. After centrifugation, the above supernatant was injected onto the LC-MS/MS. Interfering components from the matrix had been flushed from the column by means of a gradient of elution. The detector was set up in such a way, in order to prevent pollution of the detector, that only the relevant part of the chromatogram was recorded.
The LC-MS/MS method was validated over a range of 20 to 500 µg/l. The inter-run precision had a maximum deviation of 8% over the range and 13% at the lowest limit of quantitation (LLOQ). The reproducibility was up 6% over the range and 13% at the LLOQ. For the used sodium citrate plasma, no matrix effect was observed. The extraction recovery for the used precipitation reagent was 82% ± 18%. The specificity was determined by testing 15 species concomitants and reagents for interference with rivaroxaban, no interference was observed.
Method comparison between the LC-MS/MS method and the modified anti-factor Xa method with the CS2100i was performed with 18 samples spiked plasma rivaroxaban and four patient samples. Orthogonal regression was performed with the results of the 2 methods, plotted against each other. The conclusion was that the two methods were not consistent with each other. If the cause was sought in the LC-MS/MS method, the extraction recovery came up for discussion. This should be near 100% to exclude potential differences in recovery of sample reprocessing between patient and rivaroxaban spiked plasma samples.

Samenvatting

Rivaroxaban (Xarelto®) is een directe factor Xa inhibitor van Bayer AG (Leverkusen, Germany), een van de nieuwe oraal anti-trombose stoffen die zijn goedgekeurd sinds 2008 in Nederland ter preventie van bloedstolsels bij orthopedische chirurgie, zoals bij plaatsing van een kunstheup of knie. De huidige methode binnen het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis voor therapeutische monitoring van rivaroxaban in plasma is de aangepaste anti-factor Xa bepaling op routine stolling apparatuur Sysmex CS2100i.
Doel van dit onderzoek was na te gaan door methodevergelijk of de resultaten van de aangepaste anti-factor Xa bepaling (Biophen rivaroxaban assay op de CS2100i), overeen kwam met de resultaten van een methode die de concentratie rivaroxaban direct bepaald in plasma. Om rivaroxaban direct te bepalen in plasma was een methode opgezet met vloeistofchromatografie met tandem massa spectrometrie (LC-MS/MS) als analyse techniek. De monsteropwerking bestond uit het toevoegen van neerslag reagens, met interne standaard, aan het plasma om de eiwitten uit het plasma neer te slaan. Na centrifuge was de bovenstaande vloeistof geïnjecteerd op de LC-MS/MS. Storende componenten uit de matrix waren door middel van een gradiënt van het eluens van de kolom gespoeld. Om vervuiling van de detector te voorkomen, was deze zodanig ingesteld dat alleen het relevante deel van het chromatogram werd opgenomen.
De LC-MS/MS methode was gevalideerd over een bereik van 20 tot 500 µg/l. De inter-run juistheid had een maximale afwijking van 8% over het bereik en 13% bij de laagst te kwantificeren grens (LLOQ). De reproduceerbaarheid was maximaal 6% over het bereik en 13 % bij de LLOQ. Bij het gebruikte natriumcitraat plasma was geen matrix effect waarneembaar. De extractie recovery was voor het gebruikte neerslag reagens 82% ± 18%. De specificiteit was bepaald door 15 soorten comedicatie en reagentia te testen op interferentie met rivaroxaban; geen interferentie was waargenomen.
Methodevergelijk tussen de LC-MS/MS methode en de aangepaste anti-factor Xa methode met de CS2100i was uitgevoerd met 18 monsters rivaroxaban gespiked plasma en 4 patiënten monsters. Met orthogonale regressie waren de resultaten van de 2 methoden tegen elkaar uitgezet. De conclusie was dat de resultaten van de twee methoden niet met elkaar overeen kwamen. Werd de oorzaak gezocht in de LC-MS/MS methode, dan kwam de extractie recovery ter discussie. Deze zou 100% moeten zijn om eventuele verschillen in recovery bij de monsteropwerking tussen patiënten monsters en rivaroxaban gespiked plasma uit te sluiten.

Lijst met afkortingen

APTT	Activated Partial Thromboplastin Time
BI	Betrouwbaarheid Interval
DC	Direct Current
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electro Spray Ionisatie
ETP	Endogenous Thrombin Potential
FDA	Food and Drug Administration
HKCL	Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium
LC	Vloeistof Chromatografie
LC-MS/MS	Vloeistof chromatografie met tandem massa spectrometer
LLOQ	Lower Limit Of Quantitation
LMWH	Low Molecular Weight Heparine
MSD	Mass Selective Detector
m/z	Massa per lading
OLVG	Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam
pNa	para-Nitroanaline
PT	Prothrombin Time
QC	Kwaliteit Controle
RF	Radio Frequency
RSD	Relatieve Standaard Deviatie
SRM	Selected Reaction Monitoring
TSQ	Triple Stage Quadrupole
ULOQ	Upper Limit Of Quantitation

Inhoud

Voorwoord 1
Abstract 2
Samenvatting 3
Lijst met afkortingen 4
Inhoud 5
Bijlagen 6
Hoofdstuk 1: Inleiding 8
Hoofdstuk 2: Theoretische beschouwingen 10
2.1 Inleiding 10
2.2 Rivaroxaban (Xarelto®) 10
2.3 Stolling cascade 10
2.4 Factor Xa inhibitie (remming) 11
2.5 Methode beschrijving anti-Xa bepaling 12
2.6 Principe van de anti-Xa bepaling (chromogene methode) 12
2.7 Bepaling van rivaroxaban: aangepaste Anti-Xa bepaling. 13
2.8 Bereik aangepaste anti-Xa bepaling 14
2.9 LC-MS/MS (Finnigan™ TSQ Quantum Discovery MAX™) 14
2.10 Ionisatie, massa spectrometrie en detectie 14
2.11 Interne standaard disopyramide voor LC-MS/MS bepaling 15
Hoofdstuk 3: Beschrijving van de experimenten 16
3.1 Chemicaliën, Instrumentatie en reagentia 16
3.1.1 Chemicaliën 16
3.1.2 Instrumentatie 16
3.1.3 Kalibratie standaarden en kwaliteit controle (QC) monsters 16
3.1.4 Monsteropwerking 16
3.2 Opzetten methode op LC-MS/MS 17
3.2.1 Inleiding 17
3.2.2 Infusie 17
3.2.3 Instrument methode 17
3.2.4 Data verwerking 17
3.2.5 Rapportage 17
3.3 Validatie LC-MS/MS methode 18
3.3.1 Inleiding 18
3.3.2 Kalibratie curve 18
3.3.3 Juistheid 18
3.3.4 Herhaalbaarheid 18
3.3.5 Reproduceerbaarheid 18

3.3.6 Recovery (extractie en matrix effect) 19
3.3.7 Selectiviteit (comedicatie en reagentia) 19
3.4 Methodevergelijk LC-MS/MS versus aangepaste anti-Xa bepaling 19
Hoofdstuk 4: Resultaten 20
4.1 Opzetten methode op LC-MS/MS 20
4.1.1 Infusie 20
4.2 Instrument methode 21
4.2.1 Optimalisatie 1 21
4.2.2 Optimalisatie 2 22
4.2.3 Optimalisatie 3 23
4.2.4 Optimalisatie 4 25
4.3 Validatie LC-MS/MS methode 26
4.3.1 Kalibratie curve 26
4.3.2 Juistheid 27
4.3.3 Herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid 28
4.3.4 Recovery (extractie en matrix effect) 28
4.3.5 Selectiviteit 30
4.4 Methodevergelijk LC-MS/MS versus aangepaste anti-Xa bepaling 30
Hoofdstuk 5: Conclusie 33
5.1 Opzetten methode op LC-MS/MS 33
5.2 Validatie LC-MS/MS methode 33
5.3 Methodevergelijk LC-MS/MS versus aangepaste anti-Xa bepaling 33
Hoofdstuk 6: Literatuur 35

Bijlagen

Bijlage 1: Rekenblad standaarden en QC monsters
Bijlage 2: ESI ionisatie rivaroxaban
Bijlage 3: Fragmentatie rivaroxaban ion
Bijlage 4: Optimalisatie 1
Bijlage 5: Optimalisatie 2
Bijlage 6: Optimalisatie 3
Bijlage 7A: Validatie run 1: data
Bijlage 7B: Validatie run 1: regressie
Bijlage 7C: Validatie run 1: detectie grens
Bijlage 7D: Validatie run 1: beslissing grens
Bijlage 8A: Validatie run 2: data
Bijlage 8B: Validatie run 2: regressie
Bijlage 8C: Validatie run 2: detectie grens
Bijlage 8D: Validatie run 2: beslissing grens

Inhoud

Bijlage 9A: Validatie run 3: data
Bijlage 9B: Validatie run 3: regressie
Bijlage 9C: Validatie run 3: detectie grens
Bijlage 9D: Validatie run 3: beslissing grens
Bijlage 10: Validatie juistheid
Bijlage 11: Validatie herhaalbaarheid
Bijlage 12: Validatie reproduceerbaarheid
Bijlage 13: Matrix effect en extractie recovery rivaroxaban
Bijlage 14: Selectiviteit acenocoumarol
Bijlage 15: Methodevergelijk: verdunning schema gespiked plasma
Bijlage 16: Methodevergelijk: kalibratie curve LC-MS/MS
Bijlage 17: Resultaten metingen LC-MS/MS en CS2100i
Bijlage 18A: Orthogonale regressie analyse, gespiked plasma
Bijlage 18B: Orthogonale regressie analyse, gespiked plasma en patiënten monsters
Bijlage 19: Analyse voorschrift Rivaroxaban in plasma met LC-MS/MS
Bijlage 20: Validatie protocol Rivaroxaban in plasma met LC-MS/MS

Hoofdstuk 1: Inleiding

Inleiding
Rivaroxaban (Xarelto®) is een directe factor Xa inhibitor van Bayer AG (Leverkusen, Germany), een van de nieuwe oraal anti-trombose stoffen die zijn goedgekeurd sinds 2008 in Nederland ter preventie van bloedstolsels bij orthopedische chirurgie, zoals bij plaatsing van een kunstheup of knie. De routine analyse methode voor therapeutische monitoring van rivaroxaban in plasma is de aangepaste anti-factor Xa bepaling met de chromogene methode op routine stolling apparatuur Sysmex CS2100i. Met deze methode wordt Rivaroxaban bepaald aan de hand van remming van het eiwit factor Xa met rivaroxaban. Nadeel van deze methode is dat er geen Rivaroxaban wordt gemeten, maar de werking die het heeft op het factor Xa eiwit. Er kunnen zich andere stoffen in het bloed bevinden die ook invloed hebben op factor Xa, welke dus de bepaling kunnen storen en dus een verkeerde uitslag betreffende de concentratie Rivaroxaban kunnen geven.
Naar de aangepaste anti-factor Xa methode wordt momenteel onderzoek gedaan op het Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium van het OLVG. De vraag naar een analyse methode om direct Rivaroxaban te kunnen meten in bloed is een wens van de onderzoekers van het HKCL, om zo de juistheid van de aangepaste anti-factor Xa bepalingsmethode te kunnen bepalen.
Aangezien het klinisch farmaceutisch en toxicologisch laboratorium, onderdeel van de apotheek van het OLVG, veel expertise heeft met het bepalen van farmaceutische stoffen in bloed en urine, is dit laboratorium gevraagd om een methode op te zetten om Rivaroxaban kwantitatief in bloed te bepalen.

Doelstellingen afstudeer opdracht
Als afstudeeropdracht van Ralph Brands voor de opleiding HLO-Chemie aan de Hogeschool Utrecht zijn de volgende doelen gesteld:
- Opzetten van een kwantitatieve methode voor het bepalen van Rivaroxaban in plasma met behulp van LC-MS/MS.
- Valideren van de LC-MS/MS methode.
- Methodevergelijk om de analyse resultaten van de aangepaste anti-factor Xa methode op de CS2100i en de analyse resultaten van de LC-MS/MS bepaling met elkaar te kunnen vergelijken.

Doelstellingen literatuuronderzoek
Het literatuuronderzoek was uitgevoerd om antwoord te krijgen op de volgende vragen:
- Wat is Rivaroxaban (Xarelto®)?
- Welke methode voor het bepalen van Rivaroxaban wordt toegepast in het HKCL?
- Is een LC-MS/MS methode voor de bepaling van Rivaroxaban reeds opgezet en hoe is deze uitgevoerd?
- Hoe wordt een methodevergelijk van de resultaten tussen 2 analyse methoden uitgevoerd?

Conclusies literatuuronderzoek
Rivaroxaban (Xarelto®) is een directe factor Xa inhibitor van Bayer AG (Leverkusen, Duitsland).
Routine bepaling methode
Voor de Rivaroxaban bepaling in plasma maakt het HKCL gebruik van een aangepaste anti-Xa bepaling. De normale anti-Xa bepaling wordt gebruikt voor de analyse van LMWH, maar aan de assay's die zijn getest (Nodia en Stago) is heparinase toegevoegd waardoor een anti-Xa bepaling ontstaat die heparine ongevoelig is. De anti-Xa bepaling maakt gebruik van de chromogene methode. Er wordt een kalibratie curve opgenomen met een bereik van 50-500 µg/L (calibrators firma Nodia) of 20-500 µg/L (calibrators firma Stago).
LC-MS/MS methode
LC-MS/MS is een geschikte methode om Rivaroxaban te bepalen met een bereik van 0,50 – 500 µg/L [1]. Deze methode is gevalideerd en de resultaten zijn hierna kort samengevat:
-Precisie en accuraatheid zijn lager dan 15% over het hele werkgebied.
-Methode is selectief en specifiek, zonder invloed van comedicatie of endogene substanties.

-Stabiliteit is bevestigd in verschillende matrices en onder verschillende condities.
-Klein matrixeffect treed op in plasma, maar deze wordt opgeheven door de interne standaard.
-Extractie recovery na eiwit neerslag is 100%.
Methodevergelijk
Methodevergelijk als regressie vorm: wanneer 2 methoden met elkaar vergeleken worden, is in het ideale geval de helling 1,00 en de as afsnede (intercept) 0,00. Bij lineaire regressie geldt dat de resultaten van methode 2 (y) worden uitgezet tegen methode 1 (x), waarbij fouten uitsluitend worden toegeschreven aan methode 2. Methode 1 wordt foutloos verondersteld. Andersom moet dit ook uitgevoerd worden.
Orthogonale regressie is noodzakelijk als beide methoden een fout bevatten. De fouten in de resultaten worden berekend met het 95% betrouwbaarheid interval. Afwijkingen in de as afsnede wijzen op een systematische fout, terwijl afwijkingen in de helling kunnen wijzen op materiaal verlies of matrix effecten bij een van beide methoden [2].

Opbouw afstudeer verslag
Het afstudeer verslag is opgebouwd uit de volgende delen:

- Hoofdstuk 1 Inleiding: Algemene inleiding met de aanleiding en doelstellingen van de afstudeer opdracht. De doelstellingen en conclusies van het literatuur onderzoek zijn samen gevat. De opbouw van het afstudeer verslag is kort beschreven.
- Hoofdstuk 2 Theoretische beschouwingen: Hier worden onder andere de achtergronden van de stof rivaroxaban en de analyse methoden beschreven. Dit is deels een aanvulling op het reeds uitgevoerde literatuur onderzoek.

Hoofdstuk 3,4 en 5 bestaan steeds uit 3 delen; het opzetten van de analysemethode op de LC-MS/MS, het valideren van de analysemethode met de LC-MS/MS en methodevergelijk van de LC-MS/MS methode met de aangepaste anti factor Xa methode.

- Hoofdstuk 3 Beschrijving van de experimenten: De experimenten die gaan worden uitgevoerd worden beschreven.
- Hoofdstuk 4 Resultaten: De resultaten van de uitgevoerde experimenten zijn beschreven en eventuele discussie is direct toegevoegd na het uitgevoerde experiment.
- Hoofdstuk 5 Conclusie: Per deel zijn conclusies getrokken naar aanleiding van de gevonden resultaten en discussie.
- Hoofdstuk 6 Literatuur: Literatuur die gebruikt is voor het tot stand komen van het afstudeerverslag staan hier vermeld.
- Bijlagen: In de bijlagen staan de data van de uitgevoerde experimenten met eventuele berekeningen. Het analyse voorschrift en het validatie protocol zijn toegevoegd als bijlage.

Hoofdstuk 2: Theoretische beschouwingen

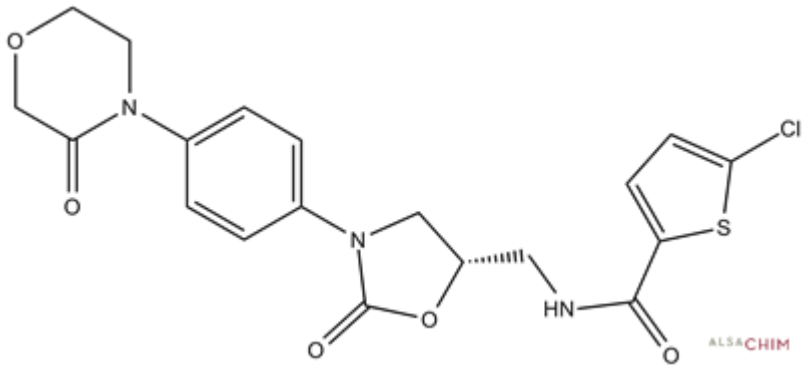
2.1 Inleiding

In dit hoofdstuk komen de volgende onderwerpen aan bod:

- Rivaroxaban, de stof.
- Het mechanisme van stollen van het bloed, de stolling cascade.
- Factor Xa inhibitie met rivaroxaban.
- Bepaling van rivaroxaban met de aangepaste anti-Xa test.
- LC-MS/MS
- Interne standaard voor LC-MS/MS bepaling.

2.2 Rivaroxaban (Xarelto®)

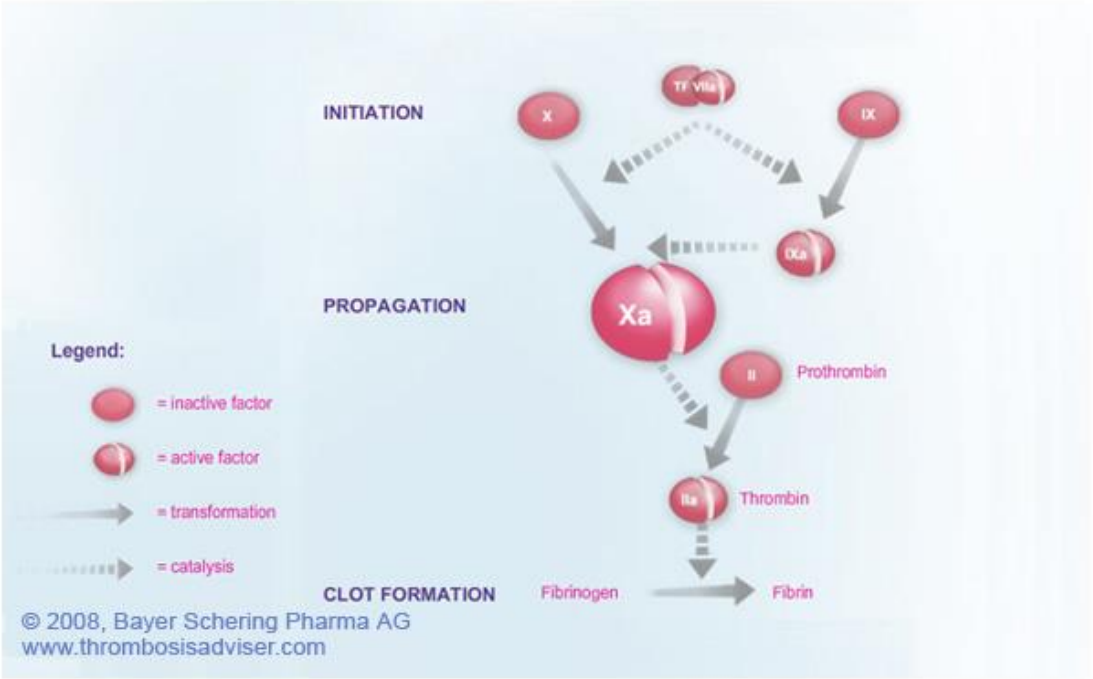
Rivaroxaban (Xarelto®) is een directe factor Xa inhibitor van Bayer AG (Leverkusen, Germany), een van de nieuwe oraal anti-trombose stoffen die zijn goedgekeurd sinds 2008 in Nederland ter preventie van bloedstolsels bij orthopedische chirurgie, zoals bij plaatsing van een kunstheup of knie.
Door de voorspelbare farmacokinetiek van Rivaroxaban is laboratorium monitoring als therapeutische ondersteuning in de meeste gevallen onnodig. In de praktijk zijn echter omstandigheden denkbaar waarbij laboratorium monitoring van rivaroxaban wenselijk is, zoals bijvoorbeeld nierfalen, overdosering of acute wijziging van antistolling medicatie bij chronische gebruikers. Een nadeel van Rivaroxaban is dat er nog geen specifiek antidotum bestaat [3,4].



Afbeelding 1: Rivaroxaban; (5-chloro-N-({(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morpholinyl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl}methyl)-2-thiophenecarboxamide) (C19H18ClN3O5S, MW 435.882 g/mol) [5].

2.3 Stolling cascade

De stolling cascade beschrijft de opeenvolgende stappen die in het lichaam plaats vinden indien er stolling van het bloed plaats vindt. Dit stukje theorie is ter ondersteuning om de werking van Rivaroxaban op de remming van stolling van het bloed te begrijpen. Dit stuk is letterlijk overgenomen van de website www.thrombosisadviser.com [6]. Afbeelding 2 geeft de stolling cascade schematisch weer.



Afbeelding 2: stolling cascade

Initiatie stap:
-Membraangebonden tissue factor (TF) activeert factor VII tot factor VIIa, wat leid tot de vorming van het TF-VIIa complex.
-Membraan gebonden TF-VIIa activeert zowel factor IX als factor X tot factor IXa en factor Xa.
-Factor Xa zet kleine hoeveelheden protrombine (factor II) om tot trombine (factor IIa), welke vervolgens factor V en factor VIII activeert.

Propagatie:
-Aan het oppervlak van geactiveerde bloedplaatjes, factor XIa activeert vrije factor IX, welke vervolgens het tenase complex met factor VIIIa vormt. Dit IXa-VIIIa complex activeert factor X, welk het protrombinase complex vormt met factor Va, fosfolipide (PL) en calcium.
-Factor Xa is de eerste component van het prothrombinase complex, welk grote hoeveelheden protrombine (factor II) tot trombine omzet, omschreven als de 'thrombin burst'. Elk molecuul factor Xa genereert ongeveer 1000 moleculen thrombine.
-Trombine versterkt de stollingscascade door activatie van factor XI tot factor XIa.

Vorming van stolsels:
-Trombine zet fibrinogeen om tot fibrine monomeren, welke fibrine polymeren vormt.
-Trombine activeert factor XIII tot factor XIIIa, welk fibrine strands kruis-linkt, wat leid tot een fibrine netwerk dat samen met bloed cellen een stolsel vormt.
-Trombine activeert stolsel vorming door activatie van bloedplaatjes [6].

2.4 Factor Xa inhibitie (remming)

Inhibitie van factor Xa heeft meer effect op stolsel vorming dan in activatie van trombine. Inhibitie van factor Xa heeft een antitrombotisch effect, zonder de bestaande thrombine concentraties te beïnvloeden. Het voordeel hiervan is dat de bestaande thrombine concentratie voldoende zal zijn om primaire haemostasis te verzekeren.
Rivaroxaban is een synthetisch molecuul wat selectief factor Xa (de actieve vorm van factor X) inhibeert. Het voorkomt de vorming van een 'thrombin burst' door regulatie van het stolling

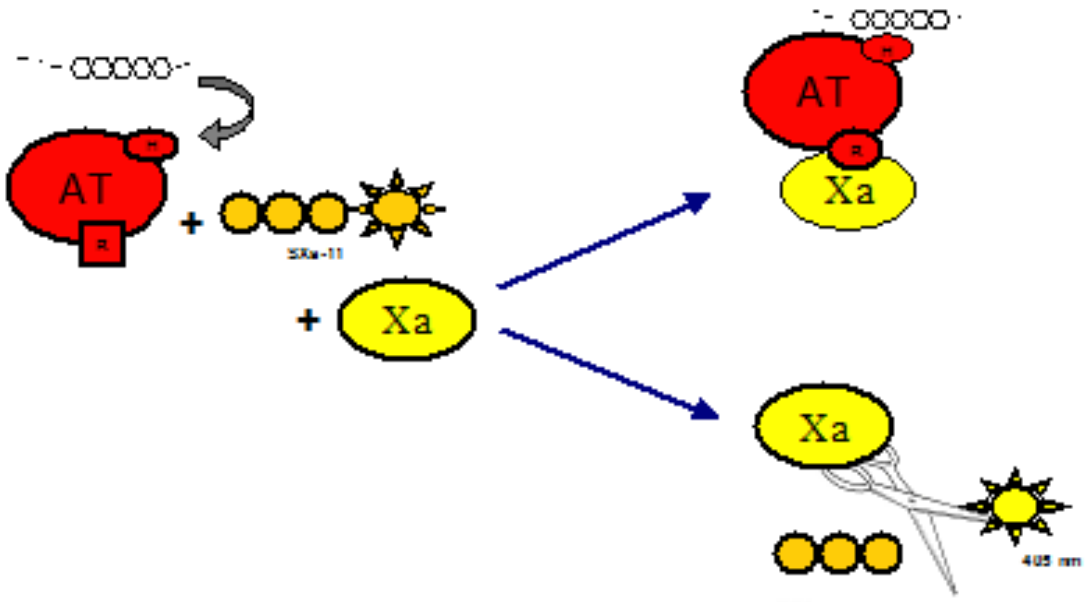
verloop. Rivaroxaban inhibeert zowel vrij als fibrine gebonden factor Xa en protrombinase complex.
Heparines (ongefractioneert UFH en laag molecuul gewicht LMWH) en fondaparinux inhiberen indirect door binding aan antitrombine (AT). Antitrombine (AT) bind vervolgens weer aan stolling factoren (IIa, IXa, Xa, XIa,en XIIa) die niet stolselgebonden of in het protrombinase complex gebonden zitten. Heparines kunnen niet direct aan factor Xa inhiberen als onderdeel van het protrombinase complex, wat de vorming van trombine moleculen katalyseert. De efficiëntie van factor Xa inhibitie is daarom efficiënter dan inhibitie van antitrombine (AT) [7].

2.5 Methode beschrijving anti-Xa bepaling

De Sysmex CS2100i, de gebruikte apparatuur op het HKLC van het OLVG, voert hemostase testen uit gebruikmakend van 3 verschillende meetmethoden op 1 platform. De 3 verschillende meetmethoden zijn de coagulatie methode, de chromogene methode en de immunologische methode.
De anti-Xa bepaling maakt gebruik van de chromogene methode. Door toevoeging en vervolgens omzetting van een substraat wordt een gekleurd product gevormd. Het gekleurd product wordt gemeten als verandering in extinctie bij een bepaalde golflengte per minuut door filters van een Multi-golflengte Filterwiel (340nm, 405 nm, 575nm, 660nm en 800 nm). Doorgelaten licht wordt opgevangen door een fotodiode, die de hoeveelheid gemeten licht omzet in een elektrisch signaal. Hieruit wordt extinctieverandering per minuut berekend. Concentratie van de te meten stof wordt van een standaard curve afgelezen.

2.6 Principe van de anti-Xa bepaling (chromogene methode)

Bij de Biophen Heparin anti-Xa bepaling van de firma Nodia wordt op de Sysmex CS2100i factor Xa toegevoegd aan een mengsel van onverdund plasma en chromogeen substraat Sxa-11. Wanneer met heparine een complex is gevormd, vinden gelijktijdig, in competitie, twee reacties plaats:
1. Remming van factor Xa door [AT.Heparine] complex.
2. Reactie van factor Xa met Sxa-11 resulterend in afscheiding van pNa en een tripeptide.
Het vrijgekomen pNa wordt gemeten bij 405 nm, waarbij de hoeveelheid pNa omgekeerd evenredig is met de hoeveelheid heparine in het monster.
Om invloed van heparine antagonisten zoals bv. plaatjesfactor 4 te minimaliseren, is er dextransulfaat aan de reactie toegevoegd [8,9,10].



Afbeelding 3: Principe van anti factor Xa bepaling (chromogene methode) [8].

2.7 Bepaling van rivaroxaban: aangepaste anti-Xa bepaling.

Voor de rivaroxaban meting in natriumcitraat plasma maakt het HKCL van het OLVG gebruik van een aangepaste anti-Xa bepaling. De normale anti-Xa bepaling wordt gebruikt voor de analyse van LMWH, maar aan de Biophen rivaroxaban assay van Nodia is een buffer toegevoegd die de [AT – heparine] complexvorming tegen gaat, waardoor een anti-Xa bepaling ontstaat die heparine ongevoelig is. Er vinden tegelijktijdig, in competitie twee reacties plaats:
1. Remming van factor Xa door rivaroxaban.
2. Reactie van factor Xa met Sxa-11 resulterend in afscheiding van pNA.
Het vrijgekomen pNA wordt gemeten bij 405 nm waarbij de hoeveelheid pNa omgekeerd evenredig is met de hoeveelheid rivaroxaban in het monster.

De anti-Xa test geeft een specifieke weergave van de hoeveelheid rivaroxaban in het bloed (tabel 1).

anti-Xa	Rivaroxaban		
	(Vrijwel) Afwezig (ug/L)	Therapeutisch (ug/L) Piek na 2-4 uur Dal na 12 uur	Te hoog (ug/L)
anti-Xa * rivaroxaban 1 dd 10 mg	< 5	Piek: 50 – 300** Dal: 0 – 100**	Piek: > 300** Dal: > 100**
anti-Xa * rivaroxaban 2 dd 10 mg	< 5	Piek: 50 – 100*** Dal: 5 – 50***	Piek: > 100*** Dal: > 50***
anti-Xa* rivaroxaban 1 dd 20 mg	< 5	Piek: 150 – 350*** Dal: 5 – 100***	Piek: > 350*** Dal: > 120***

* de directe anti-Xa test voor rivaroxaban is nog niet in alle ziekenhuizen in gebruik en geeft de concentratie van rivaroxaban in het bloed weer

** Mani 2012

*** Mueck 2008

Tabel 1: Rivaroxaban en anti-Xa (kwantitatieve, bevestigende test).
Tabel is samengesteld op basis van verschillende ex vivo studies, meestal met gezonde vrijwilligers of uit orthopedische studies, gebruikmakend van verschillende anti-Xa testen [11].

2.8 Bereik aangepaste anti-Xa bepaling

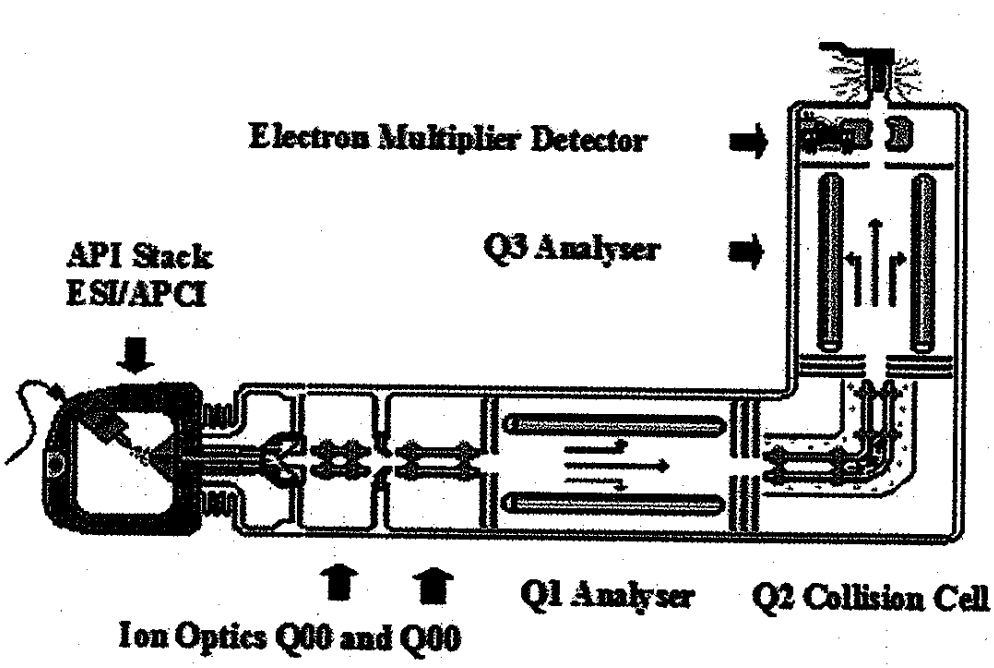
De firma Nodia heeft een Biophen Rivaroxaban plasma calibrator reeks met een bereik van 50-500 µg/l [8].

2.9 LC-MS/MS (Finnigan™ TSQ Quantum Discovery MAX™)

Het LC-MS/MS systeem bestaat uit een HPLC systeem waar door middel van chromatografie scheiding plaats vindt van de componenten in de matrix. De componenten worden vervolgens geanalyseerd met de detector. De detector bestaat uit een triple quadrupool massa spectrometer, welke na ionisatie van de componenten geselecteerde ionen kan detecteren. De software zet dit signaal om in een gekwantificeerde hoeveelheid component. Voordeel is dat met LC-MS/MS selectief, hoge gevoeligheid en hoog dynamisch bereik een specifieke component bepaald kan worden uit een matrix.

2.10 Ionisatie, massa spectrometrie en detectie

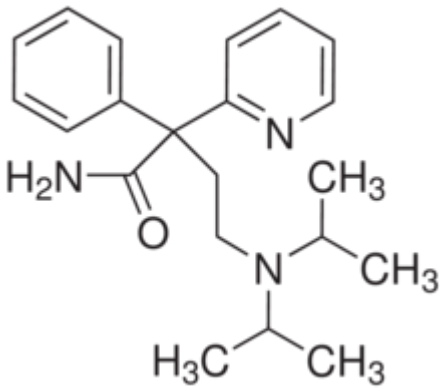
Electrospray ionisatie is een zacht ionisatie proces welke ionen gevormd in de oplossing, omzet in ionen in de gasfase. De monster flow bereikt het ESI mondstuk, welk een positieve of negatieve potentiaal heeft (3-5kV). De eerste stap is vorming van een druppel aan de punt van de naald. Het hoge voltage zorgt ervoor dat ionen met dezelfde lading naar het oppervlak van de druppel komen om een Taylor Cone te vormen. Door het verdampen van de druppel zal de oppervlakte spanning zodanig toenemen dat de druppel uiteen valt. Zo verdampt het oplosmiddel en ontstaan uiteindelijk ionen in de gasfase onder atmosferische druk.
De geladen deeltjes gaan van de ionisatiebron naar de quadrupool regio zonder in contact te komen met de vaste delen van de massaspectrometer, om neutralisatie te voorkomen (afbeelding 4). Dit wordt bereikt door twee ion optica, die een combinatie van DC en RF voltage leveren, onder vacuüm te gebruiken. De selectie en het scannen van ionen wordt bereikt met de quadrupool analysers onder hoog vacuüm. De 90° fragmentatie cel met argon gas zorgt voor een hoge ion transmissie en minimaliseert matrix effecten. Detectie van de ionen wordt verkregen met een conversie dynode en een elektron multiplier detector [12].



Afbeelding 4: schema massaspectrometer Finnigan [12].

2.11 Interne standaard disopyramide voor LC-MS/MS bepaling

Het is aanbevolen volgens de richtlijnen van de EMA om voor massaspectrometrische detectie een stabiele isotoop gelabelde interne standaard te gebruiken die qua structuur overeen komt met de te bepalen component. In ieder geval dient aangetoond te worden dat de interne standaard geschikt is voor gebruik en geen interferentie vertoont tijdens de bepaling [13].
De gekozen interne standaard is geen structuur analoog van rivaroxaban maar een stof die gekozen is op basis van beschikbaarheid, onwaarschijnlijkheid van aanwezigheid in monstermateriaal en betaalbaarheid. Het klinisch farmaceutisch laboratorium maakt gebruik van onder andere disopyramide als interne standaard en deze stof zal dan ook voor de bepaling van rivaroxaban in plasma worden ingezet. Disopyramide zal worden getest op geschiktheid en interferentie.



Afbeelding 5: Disopyramide (α-Diisopropylaminoethyl-α-phenylpyridine-2-acetamide); CAS Number 3737-09-5 ;$C_{21}H_{29}N_3O$;molmassa 339.47g/mol [14].

Hoofdstuk 3: Beschrijving van de experimenten

3.1 Chemicaliën, Instrumentatie en reagentia

In bijlage 19 is het analysevoorschrift rivaroxaban in plasma opgenomen, daar staat een uitgebreide beschrijving van de reagentia en monsteropwerking.

3.1.1 Chemicaliën

De chemicaliën die waren gebruik zijn van analytische kwaliteit.
- Rivaroxaban gecertificeerde referentie was verkregen van Bayer Healthcare AG, Wuppertal, Duitsland.
- De interne standaard disopyramide was verkregen van Sigma.
- Acetonitril (isocratisch graad) voor het eluens was verkregen van Merck KGaA.
- Methanol (HiPerSolv Chromanorm) als oplosmiddel was verkregen van VWR.
- Blanco gebufferd natriumcitraat (0.109M) plasma was via de bloed transfusie afdeling van het OLVG verkregen.
- Pooled plasma was gemaakt door 6 charges blanco natriumcitraat plasma te mengen.
- De gebruikte eluens buffer ammoniumacetaat pH=3,2 bestond uit 2,3 gram Ammoniumacetaat (Sigma-Aldrich), 50ml azijnzuur 100% (Merck) en 3000ml water (Aguettant).
- Het gebruikte neerslag reagens bestond uit 1% zinksulfaat heptahydraat (Sigma) in water/methanol, 20/80 met 0.05% disopyramide.

3.1.2 Instrumentatie

Voor de experimenten met de LC-MS/MS was gebruik gemaakt van de Thermo Fisher Finnigan™ LC-MS/MS (Surveyor Autosampler plus, Surveyor LC pump plus en de TSQ Quantum discovery MAX). De TSQ Quantum discovery MAX was uitgerust met een Electrospray Ionisatie bron (ESI). Data waren verwerkt met Xcalibur Software, dit is de software standaard voor Finnigan™ massa spectrometrie producten.

3.1.3 Kalibratie standaarden en kwaliteit controle (QC) monsters

Voor de stockoplossing rivaroxaban was 2 mg rivaroxaban referentie ingewogen en opgelost in 100 ml methanol. De stockoplossing was 5 en 10 maal door verdund in methanol om twee stamoplossingen te verkrijgen. De kalibratie standaarden waren verkregen door hoeveelheden stock- of stamoplossing te spiken met pooled plasma (mengsel van 6 charges plasma) met een bereik van 20-500 µg/l. Voor de QC monsters was een aparte stockoplossing rivaroxaban bereid. De concentraties van de 3 QC monsters liggen verdeeld over het bereik van de kalibratie curve met een QC op de laagste concentratie (20 µg/l), een op de hoge concentratie (400 µg/l) en een in het midden van de kalibratie curve (200 µg/l) (zie bijlage 1).

3.1.4 Monsteropwerking

Een hoeveelheid van 200 µl standaard, QC standaard, blanco of monster was in een reageerbuis gebracht en 500 µl neerslag reagens, welk de interne standaard bevat, toegevoegd. De suspensie was 10 seconden gemengd op een vortex gevolgd door 10 minuten laten staan. Vervolgens was de suspensie 5 minuten gecentrifugeerd bij 150 * g en de bovenstaande vloeistof vervolgens overgebracht in een HPLC vial.

3.2 Opzetten methode op LC-MS/MS

3.2.1 Inleiding

Opzetten van een nieuwe methode met de LC-MS/MS kan verdeeld worden in 4 segmenten.

- Infusie (ionisatie en fragmentatie)
- Instrument methode (MSD (TSQ Quantum), injector en kolomoven (Surveyor AS) en LC pomp (surveyor LC Pump))
- Data verwerking (Processing method)
- Rapportage

3.2.2 Infusie

Voor infusie was een oplossing van 10 mg/l rivaroxaban in methanol direct gemeten door de syringe met oplossing direct op de ionisatiebron aan te sluiten. In het Programma Quantum Tune was de scanmode op Q1MS ingesteld om de massa van de molecuul ion piek te bepalen. Het signaal was automatisch geoptimaliseerd via Compound optimalisation workspace. Vervolgens was de optie MS+MS/MS gebruikt om te bepalen welke fragmenten ontstaan. De fragmenten waren weer automatisch geoptimaliseerd via Compound optimalisation workspace. Handmatig waren de transities geselecteerd die acceptabele respons gaven.

3.2.3 Instrument methode

De bepaalde optimale transities waren in de instrument methode naar de detector instellingen gekopieerd. De detectietijd was zo ingesteld dat het eluens pas na de eerste minuut na injectie naar de detector gaat. Dit om alle componenten zonder retentie te verwijderen voordat deze de detector kunnen vervuilen.
De instellingen van de autosampler waren ingesteld zoals spoelstappen injectienaald, injectievolume en kolomtemperatuur. De LC pomp was ingesteld op een gradiënt van acetonitril en acetaat buffer pH 3,2, om een optimale scheiding en retentie te genereren.

3.2.4 Data verwerking

In de processing methode waren de opties ingesteld voor identificatie, integratie, detectie, kalibratie, kwantificatie, kwalificatie en rapporten.

3.2.5 Rapportage

De rapportage bestaat uit een sample en een summary rapport. In het sample rapport staan de gegevens van de patiënt, chromatogram, resultaten en kalibratie curve. In het summary rapport staan de kalibratie curve en de samenvatting van de sequence met resultaten. Beide rapporten waren gemaakt door de default rapportage aan te passen en onder de nieuwe methode naam op te slaan.

3.3 Validatie LC-MS/MS methode

3.3.1 Inleiding

De validatie was uitgevoerd volgens de validatie procedure die wordt toegepast in het klinisch farmaceutisch laboratorium van de apotheek binnen het OLVG (Bijlage 20). De validatie parameters en de eisen in deze validatie procedure zijn afkomstig uit de volgende procedures als richtlijnen:
- Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation (FDA) [15].
- EMA, Guideline on bioanalytical method validation [13].

Stabiliteit van rivaroxaban in matrix / opgewerkt monster was niet bepaald, omdat dit niet noodzakelijk is voor de afstudeer opdracht. Dit wordt in een later stadium uitgevoerd (buiten dit onderzoek) en vooralsnog worden de resultaten wat betreft de stabiliteit van rivaroxaban uit de literatuur aangehouden indien noodzakelijk [1].

Statistische berekeningen zijn uitgevoerd met software Microsoft Excel, gegevens analyse / regressie en met behulp van het boek Chemometrie [2]. Orthogonale regressie is uitgevoerd met software Minitab 16, stat / regressie / orthogonale regressie.

3.3.2 Kalibratie curve

De kalibratie curve van de methode voor rivaroxaban was onderzocht op 8 punten in het gedefinieerde bereik. Voor de gehaltebepaling van rivaroxaban waren de gebruikte concentraties: 20, 49, 95, 140, 182, 261, 364 en 522 µg/l. De validatie reeks was gemaakt uit 1 stockoplossing, in duplo opgewerkt in pooled plasma en in duplo gemeten. Zes blanco's met interne standaard (zero monsters) en zes blanco's zonder interne standaard zijn meegenomen voor controle op het snijpunt van de Y-as. Deze waren niet meegenomen als meetpunt in de kalibratie curve.

3.3.3 Juistheid

De juistheid is de mate waarin het gemiddelde van een aantal metingen met behulp van de methode afwijkt van de theoretische waarden. Drie QC monsters (laag, midden, hoog) waren opgewerkt in pooled plasma en in zesvoud gemeten.
Door de uitkomsten van de QC monsters te vergelijken met de kalibratiecurve met acht standaarden, gespiked in pooled plasma, wordt de proportionele systematische fout aangetoond in drie gebieden, namelijk laag, midden en hoog.

3.3.4 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid van de analysemethode om de stof rivaroxaban uit een plasma matrix te bepalen is de mate van spreiding in de meetresultaten in dezelfde run van hetzelfde monster. Inzicht in de herhaalbaarheid was verkregen door uitvoering van de meting in zesvoud op 3 QC monsters (laag, midden, hoog). Dezelfde QC monsters als voor de bepaling van de juistheid waren hiervoor gebruikt.

3.3.5 Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van de analysemethode om de stof rivaroxaban uit een plasma matrix te bepalen is de mate van spreiding in de meetresultaten over verschillende runs van verschillende monsters door verschillende analisten onder verschillende omstandigheden. Inzicht in de reproduceerbaarheid was verkregen door uitvoering van de methode op drie

verschillende dagen met een kalibratie curve op 8 standaarden en 3 QC monsters (laag, midden, hoog).

3.3.6 Recovery (extractie en matrix effect)

De extractie procedure gebruikt tijdens de monstervoorbewerking was de recovery van rivaroxaban bepaald. Indien het neerslag reagens niet voldoende rivaroxaban uit de matrix extraheert, zal voor een ander extractie middel gekozen moeten worden. De matrix natriumcitraat plasma dient geschikt te zijn als materiaal om rivaroxaban in te bepalen. Natriumcitraat plasma van individuele patiënten mag niet storen tijdens de bepaling.
De voor het matrix effect opgewerkte monsters waren vergeleken met academische standaarden van dezelfde concentratie. De extractie recovery was bepaald door matrix te spiken voor extractie, te vergelijken met matrix te spiken na extractie.
De opwerking was op 2 verschillende concentraties uitgevoerd: hoog en laag. Er waren 6 verschillende batches blanco natriumcitraat plasma gebruikt en in duplo opgewerkt.

3.3.7 Selectiviteit (comedicatie en reagentia)

De methode dient selectief genoeg te zijn om rivaroxaban te meten, zonder dat andere stoffen de meting storen. De matrix plasma, reagentia en comedicatie dienen de meting niet te storen. Om te bepalen of comedicatie in relevante maximale concentratie en reagentia storen was de invloed van de volgende stoffen op het signaal van rivaroxaban met flow injectie bepaald: acenocoumarol, acetylsalicylzuur (als salicylzuur), atorvastatin, coffeïne, diclofenac, fenprocoumon, Ibuprofen, ketoconazol, midazolam, morfine, naproxen, pantoprazol, paracetamol, rifampicine en neerslag reagens met interne standaard disopyramide (CH063). Het matrixeffect was apart bepaald bij de recovery test.

3.4 Methodevergelijk LC-MS/MS versus aangepaste anti-Xa bepaling

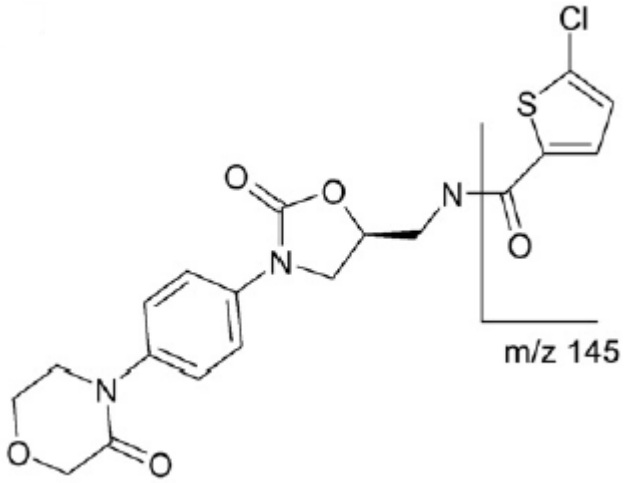
Voor de afstudeer opdracht is besloten om gebruik te maken van een combinatie van gespiked blanco plasma en patiënten materiaal, omdat er op het moment van uitvoering van deze opdracht niet voldoende patiënten materiaal voor handen was. Methodevergelijk zal herhaald worden op het moment dat er voldoende patiënten materiaal voorhanden is. Methodevergelijk was bepaald door middel van 22 monsters te analyseren met zowel de LC-MS/MS als de CS2100i (aangepaste anti-Xa bepaling). De monsters bestonden uit geanonimiseerd patiënten materiaal welke uit de kliniek waren verkregen (4 monsters van 3 patiënten). Dit was aangevuld met 18 monsters rivaroxaban gespiked poolplasma. De resultaten waren verwerkt met orthogonale regressie, waarbij er vanuit was gegaan dat zowel de x- als de y-waarden een fout bevatten. Op de x-as waren de analyse resultaten van de LC-MS/MS uitgezet tegen de analyse resultaten van de CS2100i op de y-as. De waarden waren getest op basis van apart geschatte betrouwbaarheidsintervallen voor de as-afsnede en de helling. Indien deze test geen absolute of systematische fout gaf, zou op basis van het gecombineerde betrouwbaarheidsgebied met 95% betrouwbaarheid worden weergegeven of de methoden gelijk waren.

Hoofdstuk 4: Resultaten

4.1 Opzetten methode op LC-MS/MS

4.1.1 Infusie

Het molecuul ion van rivaroxaban [M+H]+ 436.0 m/z was geselecteerd door de eerste quadrupool (Q1). Er was in eerste instantie op 4 product ionen gescand, waarvan het fragment met massa 144,9 m/z geselecteerd was (zie afbeelding 6) door quadrupool Q3.



Afbeelding 6: fragmentatie rivaroxaban [1].

De overige product ionen waren in een zodanig lage intensiteit aanwezig, dat deze geen meerwaarde toevoegde aan de bepaling (zie bijlagen 2 en 3 voor ionisatie en fragmentatie van rivaroxaban). Van de interne standaard disopyramide was het fragmentatie patroon reeds eerder bepaald en deze is overgenomen in de rivaroxaban methode. Om een optimaal signaal te krijgen waren de instellingen gebruikt zoals beschreven in tabel 2.

Tabel 2: Instellingen parameters voor optimalisatie rivaroxaban (drukken zijn weergegeven in arbitraire eenheid).

parameter	**Instelling rivaroxaban**	**Instelling disopyramide**
Spray voltage (V)	3000	3000
Sheath gas pressure	10	10
Aux gas pressure	35	35
Ion sweep gas pressure	0	0
Capillairy temperature (°C)	325	325
Tube lens offset	175	90
Collision pressure	1.5	1.5
Collision energy (V)	30	17

Voor de detectie waren de volgende transities (SRM) (in amu) met een band breedte van 0,7 amu gebruikt:
Rivaroxaban: m/z 436,0 -> 144,9
Disopyramide: m/z 340,2 -> 239,0

4.2 Instrument methode

De chromatografische instellingen waren zo gekozen dat zowel de interne standaard als rivaroxaban voldoende retentie hadden ten opzichte van de onvertraagde componenten. Om de onvertraagde componenten (zouten e.d.) niet de detector in te sturen was gekozen om de eerste minuut na injectie het eluens buiten de detector om te leiden met de Divert Valve. De gebruikte kolom was een Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 2,1*100mm, 3.5 µm met de volgende HPLC instellingen (tabel 3):

Tabel 3: Instellingen HPLC.

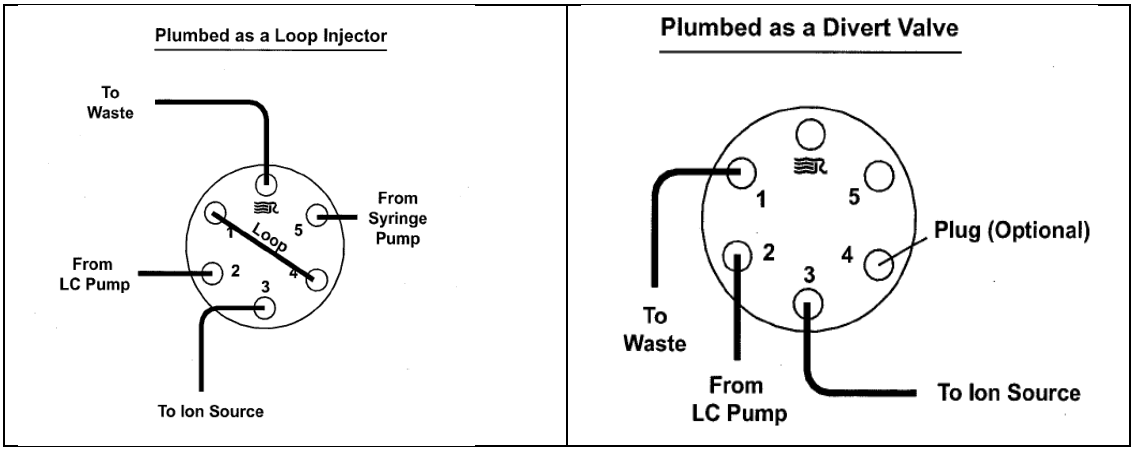
parameter	**instelling**
Kolom temperatuur	50 °C
Flow	0.25 ml/min
% Acetonitril	25
% Buffer pH:3,2	75
Injector volume	10

Na iedere injectie was de naald gespoeld met 1000µl spoelvloeistof (methanol / water, 1/1).

4.2.1 Optimalisatie 1

Om te bevestigen dat de methode voldeed aan de eisen voor validatie was een validatiereeks ingezet bestaande uit een kalibratie curve op 8 standaarden in 4 voud, 3 QC monsters in 6 voud en 2 blanco's in 6 voud.

Resultaat
Uit de resultaten bleek dat het signaal gedurende de validatiereeks geleidelijk afnam (afname interne standaard 550%) (zie bijlage 4). Bij nadere inspectie van het systeem bleek dat de voorpomp druk sterk was afgenomen. De voorpomp druk is een indicatie of het capillair welk de ionen, gevormd met ESI, de detector in brengt verstopt raakt. Dit kwam waarschijnlijk doordat er een relatief groot volume monster (20µl) was geïnjecteerd, waardoor veel matrix in het systeem terecht kwam. De instelling in de methode die de monsteroplossing de eerste minuut via de Divert Valve naar de waste stuurt bleek niet te functioneren. De kraan (Valve) bleek opgebouwd te zijn als Loop Injector (afbeelding 7) waardoor de ingestelde eerste minuut na injectie niet naar de waste ging, maar via de Loop naar de detector. Om dit op te lossen was de kraan omgebouwd naar de Divert Valve, zodat het systeem functioneerde zoals in de Instrument methode was aangegeven.



Afbeelding 7: Loop Injector / Divert Valve [12].

4.2.2 Optimalisatie 2

Dezelfde validatie reeks van de eerste optimalisatie was opnieuw opgewerkt en geanalyseerd, nu met een functionerende Divert Valve.

Resultaat
Zie bijlage 5 voor de data en berekeningen. Door de herhaalbaarheid van de standaarden en QC monsters te beoordelen was bepaald of de methode robuust genoeg was om met de validatie te starten, zie tabel 4A. Eisen herhaalbaarheid: RSD ≤ 20% voor standaard 1 en QC monster 1, RSD ≤ 15 % voor de overige standaarden / QC monsters.

Tabel 4A: Herhaalbaarheid standaarden en QC monsters.

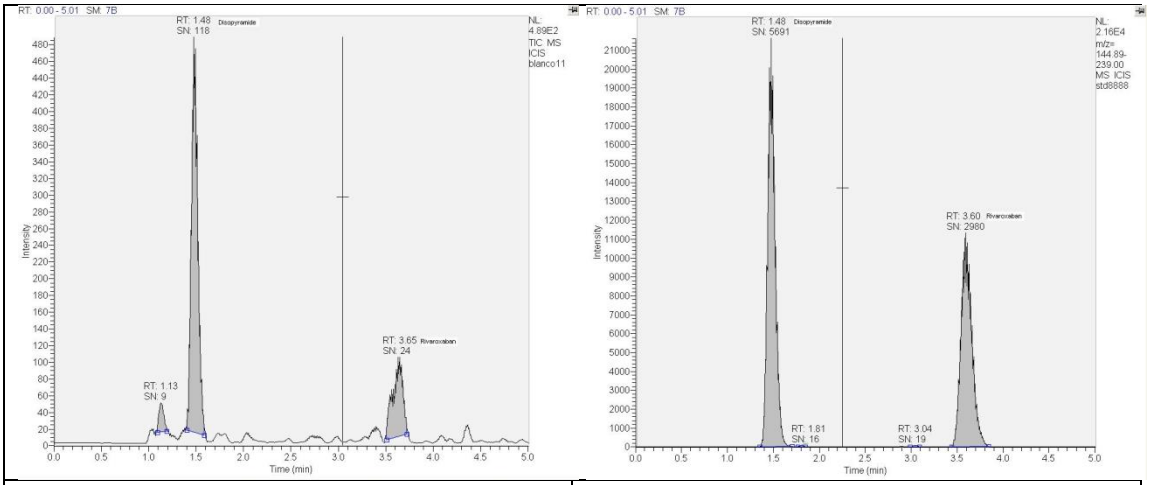
Oplossing	**Spreiding % (ratio rivaroxaban/ISTD)**
Standaard 1, 5 µg/l	65.0
Standaard 2, 25 µg/l	18.6
Standaard 3, 50 µg/l	8.7
Standaard 4, 90 µg/l	4.5
Standaard 5, 190 µg/l	3.7
Standaard 6, 280 µg/l	3.6
Standaard 7, 360 µg/l	5.1
Standaard 8, 520 µg/l	4.1
QC monster 1, 5 µg/l	50.1
QC monster 2, 220 µg/l	4.1
QC monster 3, 440 µg/l	5.3

De blanco met en zonder interne standaard gaven in enkele gevallen signaal op de plaats van rivaroxaban en disopyramide (in geval van de blanco monsters) in het chromatogram, welke qua intensiteit willekeurig maar sterk fluctueerde, zie tabel 4B.

Tabel 4B: Blanco en zero monster

Oplossing	**Rivaroxaban oppervlak**	**ISTD oppervlak**
blanco1	8	129
blanco11	1537	4468
blanco111	53	886
blanco1111	18	0
blanco11111	272	3163
blanco111111	846	2804
zero1	61	232648
zero11	125	218785
zero111	4	229464
zero1111	6	226997
zero11111	175	223852
zero111111	335	228691

In afbeelding 8A is duidelijk te zien dat de blanco signaal heeft op de plaatsen van disopyramide en rivaroxaban in het chromatogram. Afbeelding 8B geeft het chromatogram van de standaard weer met de retentietijden van de disopyramide en rivaroxaban.



Afbeelding 8A: blanco11	Afbeelding 8B: standaard 8.

Discussie
Het signaal van de disopyramide in de blanco zonder interne standaard was dermate laag dat dit weinig invloed had op het signaal van de interne standaard disopyramide in de standaarden (max. 2%). Echter had het signaal van rivaroxaban in enkele blanco's een dermate hoog signaal dat deze het signaal van de standaarden zou kunnen beïnvloeden. Dit kan verklaren waarom de herhaalbaarheid bij de lage standaarden en QC1 een grote spreiding vertoont. Een verklaring voor het willekeurig aanwezig zijn van signaal in de blanco zou kunnen zijn dat er nog componenten uit de matrix van vorige injecties storen. Om deze storende componenten te verwijderen voordat een nieuwe injectie plaats vind, kan gebruik worden gemaakt van een gradiënt om storende componenten na analyse van de kolom af te spoelen.

4.2.3 Optimalisatie 3

Dezelfde validatie reeks van optimalisatie 1 was geanalyseerd. De pomp was zo ingesteld dat na een injectie een gradiënt was gedraaid (tabel 5A).

Tabel 5A: gradiënt pomp

Tijd (minuut)	**% Buffer pH3,2**	**% Acetonitril**
0	70	30
4	70	30
4,1	0	100
5	0	100
5.5	70	30
7	70	30

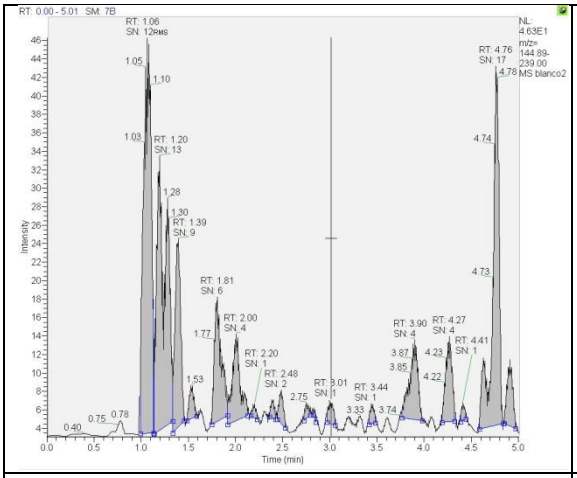
Door de herhaalbaarheid van de standaarden en QC monsters te beoordelen was bepaald of de methode robuust genoeg was om met de validatie te starten. Eisen herhaalbaarheid: RSD ≤ 20% voor standaard 1 en QC monster 1, RSD ≤ 15 % voor de overige standaarden / QC monsters.

Resultaat
Zie bijlage 6 voor data en berekeningen. De herhaalbaarheid van de LLOQ bevond zich op of boven de grens van de eis van ≤ 20%, de overige standaarden en QC monsters vielen binnen de eis, zie tabel 5B. De retentietijden van zowel de rivaroxaban als de interne standaard waren sterk verkort door de toegepaste gradiënt.

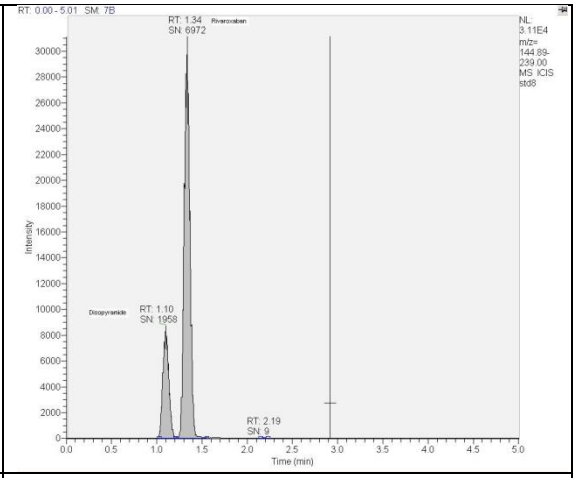
Tabel 5B: Herhaalbaarheid standaarden en QC monsters.

Oplossing	**Spreiding % (ratio rivaroxaban / ISTD)**
Standaard 1, 5 µg/l	20
Standaard 2, 25 µg/l	14
Standaard 3, 50 µg/l	6.9
Standaard 4, 90 µg/l	14
Standaard 5, 190 µg/l	4.7
Standaard 6, 280 µg/l	5.9
Standaard 7, 360 µg/l	14
Standaard 8, 520 µg/l	3.4
QC monster 1, 5 µg/l	24
QC monster 2, 220 µg/l	8.2
QC monster 3, 440 µg/l	7.4

In afbeelding 9A is te zien dat in de blanco nog wel ruis aanwezig is, maar dat dit qua intensiteit lager is dan bij optimalisatie 2. Door de toegepaste gradiënt zijn de retentietijden verkort waardoor disopyramide en rivaroxaban nu binnen 1,5 minuut van de kolom af komen, zie afbeelding 9B.



Afbeelding 9A: blanco 2



Afbeelding 9B: Standaard 8

De blanco met en zonder interne standaard gaven zeer weinig signaal op de plaats van rivaroxaban (max 7 % t.o.v. standaard 1) en disopyramide (max 3% t.o.v. ISTD zero1) in het chromatogram, zie tabel 5C.

Tabel 5C: blanco en zero monster

Oplossing	**Rivaroxaban oppervlak**	**ISTD oppervlak**
blanco1	52	2000
blanco2	56	982
blanco3	11	705
blanco4	67	885
blanco5	52	969
blanco6	37	724
zero1	85	68619
zero2	53	77262
zero3	30	87010
zero4	49	65219
zero5	23	65625
zero6	93	62389

Discussie
Het toevoegen van een gradiënt gaf het gewenste resultaat, een schoner chromatogram, waardoor er minder storing was van onbekende componenten op de bepaling. Dit was terug te zien in de spreiding in de laagste standaard en QC monster, deze waren afgenomen en naderen nu de eis van ≤ 20%. Door de verkorte retentietijden en door de kolom die niet stabiel was na de gradiënt, was vooral bij de interne standaard nog veel ruis te zien. De gradiënt dient zodanig ingesteld te worden dat de retentietijden van de componenten weer op de plaats komen van optimalisatie 2, om zo de ruis aan het begin van het chromatogram te ontlopen.

4.2.4 Optimalisatie 4

Het gradiënt was geoptimaliseerd om voldoende retentie te krijgen voor rivaroxaban en disopyramide (tabel 6A). De flow van de pomp was na de 100% acetonitril stap op 0,4 ml/min gezet om sneller terug te keren naar de 30/70 verhouding zodat de kolom stabiel was wanneer de volgende analyse start. Tevens was de laagste standaard van 5 µg/l naar 20 µg/l gebracht (de laagste kalibratie standaard van de firma Stago voor de chromogene bepaling op de CS2000i).

Tabel 6A: gradiënt pomp

Tijd (min)	**Flow (ml/min)**	**% acetonitril**	**% buffer pH: 3,2**
0	0,25	30	70
4	0,25	30	70
4,1	0,25	100	0
5,1	0,4	100	0
5,5	0,4	30	70
12	0,4	30	70

Naar aanleiding van de gradiënt was de Divert Valve aangepast om naast de eerste minuut na injectie ook de 100% acetonitril fractie direct naar de waste te laten lopen in plaats van naar de detector, zie tabel 6B. De laatste 2 minuten waren weer naar de detector geleid om de ionisatiebron te conditioneren.

Tabel 6B: Divert Valve instellingen.

Tijd (min)	**positie**
0 - 1	Waste
1 - 4,1	Detector
4,1 - 10	Waste
10 - 12	Detector

Resultaat
Zie bijlage 7A voor data en berekeningen. In tabel 6C zijn de resultaten weergegeven voor de herhaalbaarheid van de standaarden en QC monsters. In tabel 6D zijn de resultaten weergegeven van het gevonden piekoppervlak voor rivaroxaban en de interne standaard van de blanco en zero monsters.

Tabel 6C: Herhaalbaarheid standaarden en QC monsters.

Oplossing	**Spreiding % (ratio rivaroxaban/ISTD)**
Standaard 1, 20 µg/l	7.1
Standaard 2, 50 µg/l	3.9
Standaard 3, 95 µg/l	5.8
Standaard 4, 140 µg/l	5.0
Standaard 5, 180 µg/l	2.6
Standaard 6, 260 µg/l	3.1
Standaard 7, 360 µg/l	1.0
Standaard 8, 520 µg/l	2.4
QC monster 1, 22 µg/l	7.9
QC monster 2, 220 µg/l	3.1
QC monster 3, 440 µg/l	2.9

Tabel 6D: blanco en zero monster

Oplossing	Rivaroxaban oppervlak	ISTD oppervlak
blanco1	NF	0
blanco2	NF	0
blanco3	NF	0
blanco4	NF	0
blanco5	NF	0
blanco6	NF	0
zero1	NF	292126
zero2	46	290746
zero3	NF	271525
zero4	NF	290497
zero5	NF	294066
zero6	NF	286271

NF = Not Found

Discussie
Herhaalbaarheid voldeed aan de eisen, ook in het lage gebied. Ook was te zien dat door de optimalisatie van de gradiënt, de retentietijden van de componenten waren toegenomen en de blanco monsters nog schoner waren, zie tabel 6D. De blanco oplossing was direct na het hoogste QC monster geprikt. Er was geen overdracht voor zowel de rivaroxaban als de interne standaard.
Na optimalisatie 4 was de methode zodanig geoptimaliseerd dat deze aan de eisen voor herhaalbaarheid voldeden. De validatie was gestart.

4.3 Validatie LC-MS/MS methode

4.3.1 Kalibratie curve

Inleiding
De respons van de LC-MSMS met betrekking tot de te bepalen component moet over een gespecificeerd concentratie bereik worden geëvalueerd.

Uitvoering
De kalibratie curve van de methode voor rivaroxaban was onderzocht op 8 punten in het gedefinieerde bereik. Voor de gehaltebepaling van rivaroxaban waren de volgende concentraties gebruikt: 20, 49, 95, 140, 182, 261, 364 en 522 µg/l. De validatie reeks was gemaakt uit 1 stockoplossing in pooled plasma, in duplo opgewerkt en in duplo gemeten. De kalibratie curve was 3 maal uitgevoerd door 2 analisten met minimaal 7 dagen tussen de eerste en laatste run. Zes blanco's met interne standaard en zes blanco's zonder interne standaard zijn meegenomen voor controle op het snijpunt van de Y-as. Deze waren niet meegenomen als meetpunt in de kalibratie curve.
De detectie grens en de beslissing grens waren vastgesteld aan de hand van de standaard fout in de as afsnede. Voor de beslissing grens geldt dat indien het signaal hoger is dan deze grens, het signaal afkomstig moet zijn van de component en wanneer het signaal lager is dan deze grens, de component niet aantoonbaar is. De detectie grens is de grens waarboven de component mag worden gekwantificeerd. Deze grens dient onder de laagste standaard te liggen.

Eisen
Correlatiecoëfficiënt $R^2 > 0,99$

De kalibratie curven moeten met de meest eenvoudige en adequaat beschreven relatie beschreven worden. De berekende waarden van de standaarden en QC monsters (precisie) vallen binnen de ≤ 15% afwijking ten opzichte van de nominale waarde, behalve de LLOQ, welk een afwijking van ≤ 20% mag hebben. Van de herhalingen (kalibratie standaarden) valt 50% binnen de ≤ 15% afwijking, of ≤ 20% afwijking voor de LLOQ. Minimaal 6 kalibratie standaarden of 50% van de herhalingen per standaard voldoen aan deze eis. Indien een standaard of herhaling niet aan deze eis voldoet moet deze uit de curve verwijderd worden. Uitzondering zijn de LLOQ of de ULOQ, van deze moeten minimaal 50% van de herhalingen meegenomen worden. De curve dient opnieuw geëvalueerd te worden indien standaarden of herhalingen worden weggelaten. Indien de LLOQ of de ULOQ niet voldoet, dient de hele curve verworpen te worden. Als de volgende validatie run ook faalt, moet de methode aangepast worden en de validatie opnieuw gestart.

Resultaten
Zie bijlagen 7, 8 en 9 voor de data en (statistische) berekeningen.
Kalibratie curve
De curven waren geconstrueerd in lineair verband, waarbij de concentratie rivaroxaban was uitgezet tegen de oppervlak ratio rivaroxaban / interne standaard. De blanco was niet als meetpunt meegenomen. De gevonden curven voldeden aan de gestelde eisen. Bij twee van de drie curven waren enkele herhalingen van de standaarden niet meegenomen, echter niet meer dan 50%.
As afsnede
Om te bepalen of de concentratie 0 µg/l meegenomen mag worden in de kalibratie curve was het 95% betrouwbaarheid interval uitgerekend van de gevonden as-afsneden van de drie validatie kalibratie curven. Het resultaat was dat het punt 0 µg/l in alle gevallen binnen het 95% betrouwbaarheid interval valt. Het punt 0 µg/l mag als meetpunt worden meegenomen in de constructie van de kalibratie curve.
Bereik
Het bereik van de kalibratie curven was 20 µg/l tot en met 522 µg/l. Alle waarden binnen dit gebied kunnen gekwantificeerd worden. De detectie grens was voor de drie kalibratie curven berekend op gemiddeld 12 µg/l. Deze waarde valt lager dan de LLOQ (20µg/l). De beslissing grens was voor de drie kalibratie curven berekend op gemiddeld 6,1 µg/l. Voor de berekening van de detectie en beslissingsgrens was gebruik gemaakt van het boek Chemometrie [13].

4.3.2 Juistheid

Uitvoering
Inzicht in de juistheid was verkregen door uitvoering van de juistheid met 3 QC monsters (laag, midden, hoog), in 6-voud gemeten over 3 dagen. Pooled plasma was gebruikt als matrix.

Eisen
Afwijking van de gemiddelde waarde van de QC monsters ten opzichte van de nominale waarde mag 15% afwijking vertonen, alleen de gemiddelde waarde van het laagste QC monster mag 20% afwijken ten opzichte van de nominale waarde.

Resultaten
Zie bijlage 10 voor berekening. De procentuele afwijkingen ten opzichte van de nominale waarden zijn opgegeven in tabel 7. De inter-run juistheid is de gemiddelde juistheid van 3 dagen.

Tabel 7: juistheid, % afwijking t.o.v. nominale waarde.

	QC 1 (20 µg/l) (%)	**QC 2(200 µg/l) (%)**	**QC 3 (400 µg/l) (%)**
Dag 1	7	3	9
Dag 2	20	2	6
Dag 3	11	8	9
Inter-run juistheid	13	5	8

4.3.3 Herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid

Inleiding
De herhaalbaarheid van de analysemethode om de stof rivaroxaban uit een plasma matrix te bepalen is de mate van spreiding in de meetresultaten in dezelfde run van hetzelfde monster. De reproduceerbaarheid is de mate van spreiding in de meetresultaten over verschillende runs van verschillende monsters door verschillende analisten onder verschillende omstandigheden. Inzicht in de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid was verkregen door uitvoering van de methode in zesvoud op 3 QC monsters (laag, midden, hoog) in pooled plasma op 3 verschillende dagen met 2 analisten. De QC monsters waren dezelfde monsters als die van de bepaling juistheid.

Eisen
Herhaalbaarheid: RSD ≤ 15%, alleen het laagste QC monster mag ≤ 20% afwijken.
Reproduceerbaarheid: RSD ≤ 15%, alleen het laagste QC monster mag ≤ 20% afwijken.
Tussen de eerste en laatste meting dient minimaal 1 week te zitten.
Minstens 2 analisten hebben de methode uitgevoerd.

Resultaat
Zie bijlage 11 en 12 voor berekening. De 3 analyse runs waren in een tijdbestek van 10 dagen uitgevoerd door 2 analisten. In tabel 8 is de herhaalbaarheid weergegeven van elk QC monster in 6-voud bepaald en de reproduceerbaarheid van elk QC monster na 3 validatie runs.

Tabel 8: Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid.

	QC 1 (20 µg/l) (% RSD)	**QC 2(200 µg/l) (% RSD)**	**QC 3 (400 µg/l) (% RSD)**
Dag 1 herhaalbaarheid	6	3	3
Dag 2 herhaalbaarheid	13	3	6
Dag 3 herhaalbaarheid	3	2	3
Reproduceerbaarheid 3 validatie runs	13	3	6

4.3.4 Recovery (extractie en matrix effect)

Inleiding
Het natriumcitraat plasma van individuele patiënten mag geen invloed hebben op de bepaling van rivaroxaban in plasma. Daarom was gekeken naar het effect van verschillende charges natriumcitraat plasma op de extractie recovery en naar het matrix effect.

Uitvoering
De extractie recovery en matrix effect van rivaroxaban waren tegelijk bepaald. 6 charges natriumcitraat plasma waren in duplo opgewerkt op 2 concentraties, hoog (400 µg/l) en laag (20 µg/l). Er waren academische standaarden opgewerkt met dezelfde concentraties rivaroxaban.

Monsteropwerking
Monster gespiked voor extractie:
1000µl plasma + 10µl of 200µl stamoplossing 1, vervolgens 2500µl neerslag reagens toevoegen, 10 seconden vortexen, 10 minuten laten staan en centrifugeren.
Monster gespiked na extractie:
1000µl plasma + 2500µl neerslag reagens, 10 seconden vortexen, 10 minuten laten staan, centrifugeren en 10µ of 200µl stamoplossing 1 toevoegen.
Academische standaard:
1000µl demiwater + 10µl of 200µl stamoplossing 1, vervolgens 2500µl neerslag reagens toevoegen, 10 seconden vortexen, 10 minuten laten staan en centrifugeren.

Het matrix effect kan dan als volgt worden berekend:

$$\text{Matrix effect} = \frac{\text{respons monster gespiked na extractie}}{\text{respons academische standaard}} * 100\ \%$$

De extractie recovery kan dan als volgt worden berekend:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{respons monster gespiked voor extractie}}{\text{respons monster gespiked na extractie}} * 100\ \%$$

Eisen
Matrix effect: RSD van de 6 charges blanco natriumcitraat plasma mag niet groter zijn dan 15%.
Extractie recovery: Minimale recovery moet 50% zijn en RSD mag niet groter zijn dan 15%.

Resultaat
Zie bijlage 13 voor de berekeningen. Het matrix effect en de extractie recovery zijn weergegeven in tabel 9.

Tabel 9: matrix effect en extractie recovery.

	matrix effect (%) laag individueel	matrix effect (%) hoog individueel	extractie recovery (%) laag individueel	extractie recovery (%) hoog individueel
gemiddeld	110,2	104,0	**81,4**	**82,4**
RSD %	**6,3**	**3,4**	**10,1**	**9,1**

Matrix effect: de RSD % van de 6 charges blanco natriumcitraat plasma vielen met 6,3% en 3,4% binnen de eis van 15%. De matrix plasma van individuele patiënten hebben geen invloed op de bepaling.
Na extractie met neerslag reagens was 82% ± 18% rivaroxaban uit het plasma geëxtraheerd. De spreiding van de 6 charges blanco plasma bij de extractie recovery vielen binnen de eis van ≤ 15%, de extractie recovery was onafhankelijk van de individuele matrix plasma.

Discussie
De extractie recovery met neerslag reagens, welk bestaat uit 20% water, 80% methanol waaraan 1% zinksulfaat is toegevoegd, heeft een extraherend vermogen van 82% ± 18% rivaroxaban. Gekozen was voor dit neerslag reagens, omdat dit het meest toegepaste neerslag reagens is binnen het klinisch farmaceutisch laboratorium van de apotheek van het OLVG.
Er zou onderzocht kunnen worden of een ander organisch oplosmiddel zoals bijvoorbeeld 100% methanol, uit literatuur [1], een beter extraherend vermogen heeft. Echter was deze extractie recovery zodanig laat in de validatie uitgevoerd, dat het niet meer mogelijk was om de extractie methode om te zetten zonder de validatie opnieuw te moeten uitvoeren. Bij een volgende methode validatie is het aanbevolen de extractie recovery test aan het begin van de validatie uit te voeren om een zo optimaal mogelijk extractie recovery te verkrijgen.
Extractie recovery van de interne standaard disopyramide was niet bepaald omdat de interne standaard was toegevoegd aan het neerslag reagens. Bij toevoegen van het neerslag reagens aan plasma slaan de eiwitten vrijwel direct neer en zal de disopyramide weinig kans hebben zich te binden aan de eiwitten. Testen welke waarde extractie recovery heeft door toevoegen van disopyramide aan plasma, voordat neerslag reagens wordt toegevoegd, heeft door het toevoegen van de interne standaard aan het neerslag reagens geen meerwaarde.

4.3.5 Selectiviteit

Uitvoering
De selectiviteit was bepaald met flow injectie analyse. De HLPC pomp was ingesteld op 0,25 ml/min met eluens verhouding 70% buffer, 30% acetonitril. Met de syringe pomp was met 20 µl/min een constante flow rivaroxaban oplossing met concentratie 300 µg/l aan het eluens toegevoegd. De geteste component oplossingen waren met de Loop Injector (5 µl) gespiked in het eluens. Het signaal was met de methode instellingen uit tabel 3 opgenomen gedurende 1 minuut. In die minuut was de component oplossing 4 maal gespiked aan het eluens. Zo ontstaat een continu signaal van rivaroxaban waarop afwijkingen te zien zijn indien een component stoort.
De volgende oplossingen waren getest:
Acenocoumarol 90 µg/l, acetylsalicylzuur (als salicylzuur) 300 mg/l, atorvastatin 55µg/l, coffeïne 15 mg/l, diclofenac 500µg/l, fenprocoumon 3 mg/l, Ibuprofen 30 mg/l, ketoconazol 10 mg/l, midazolam 250µg/l, morfine 150 µg/l, naproxen 100 mg/l, pantoprazol 5,5mg/l, paracetamol 20 mg/l, rifampicine 10 mg/l en neerslag reagens met interne standaard disopyramide.

Resultaat
Zie bijlage 14 voor resultaat van acenocoumarol, de overige data zijn niet toegevoegd als bijlage maar vertonen hetzelfde beeld.
Geen van de relevante concentraties comedicatie of het neerslag reagens vertoonde een afwijking in het signaal van rivaroxaban.

Discussie
Er is niet getest of relevante concentraties comedicatie invloed hebben op het signaal van de interne standaard disopyramide. Dit zou wel gedaan moeten worden omdat de ratio rivaroxaban / disopyramide gebruikt wordt om het gehalte rivaroxaban in het monster te berekenen. Echter is het niet waarschijnlijk dat deze componenten storen op het signaal van disopyramide, omdat de componenten waarschijnlijk een ander fragmentatie patroon hebben in de MS/MS en andere retentie op de gebruikte kolom. Dit zal alsnog bepaald moeten worden (buiten het afstudeer project).

4.4 Methodevergelijk LC-MS/MS versus aangepaste anti-Xa bepaling

Uitvoering
Methodevergelijk was bepaald door 22 monsters te bepalen met zowel de LC-MS/MS als de chromogene aangepaste anti-factor Xa bepaling met de CS2100i. De monsters bestonden uit geanonimiseerd patiënten materiaal welke uit de kliniek waren verkregen (4 monsters van 3 patiënten). Dit was aangevuld met 18 monsters rivaroxaban gespiked poolplasma, zie bijlage 15. Statistiek was uitgevoerd met orthogonale regressie, waarbij de blanco monsters niet waren meegenomen als meetpunt.

Resultaat bepaling LC-MS/MS
In bijlage 16 zijn de resultaten beschreven van de bepaling met de LC-MS/MS. De kalibratie curve was bepaald op 8 standaarden, standaarden en QC monsters hadden een maximale afwijking van 10% t.o.v. de nominale waarde. De bepaling voldoet aan de acceptatie criteria van de validatie, de analyse resultaten gevonden voor het rivaroxaban gespiked poolplasma en patiënt monsters mogen gebruikt worden voor de methodevergelijk LC-MS/MS en CS2100i.

Resultaat methodevergelijk
In bijlage 17 zijn de resultaten beschreven van zowel de LC-MS/MS als de CS2100i methode. De verschillen tussen de waarden gevonden met patiënten materiaal is een stuk groter dan die van de monsters gespiked poolplasma, zie tabel 10.

Tabel 10: Verschil tussen methode LC-MS/MS en CS2100i

Monster nummer	**LC-MS/MS concentratie rivaroxaban (µg/l)**	**CS2100i concentratie rivaroxaban (µg/l)**	**Verschil % LC-MS/MS en CS2100i**
patiënt	199	261	31
patiënt	97	178	83
patiënt	93	115	23
patiënt	131	118	10
1	466	503	8
2	414	465	12
3	404	423	5
4	358	396	11
5	321	356	11
6	307	337	10
7	284	307	8
8	238	275	16
9	214	243	13
10	189	213	13
11	156	184	18
12	124	153	24
13	91	112	23
14	66	77	16
15	31	35	11
16	18	21	17
17	0	1	
18	0	11	

Omdat verschillen in de resultaten tussen patiënten materiaal en gespiked poolplasma aanwezig lijkt te zijn, was methodevergelijk met orthogonale regressie toegepast voor alleen rivaroxaban gespiked poolplasma (bijlage 18A) en rivaroxaban gespiked poolplasma met patiënten (bijlage 18B).
In tabel 11A zijn de resultaten weergegeven van de orthogonale regressie met alleen rivaroxaban gespiked poolplasma. Op de x-as waren de analyse resultaten gevonden met de LC-MS/MS uitgezet tegen de analyse resultaten gevonden met de CS2100i op de y-as.

Tabel 11A: Orthogonale regressie (rivaroxaban gespiked poolplasma)

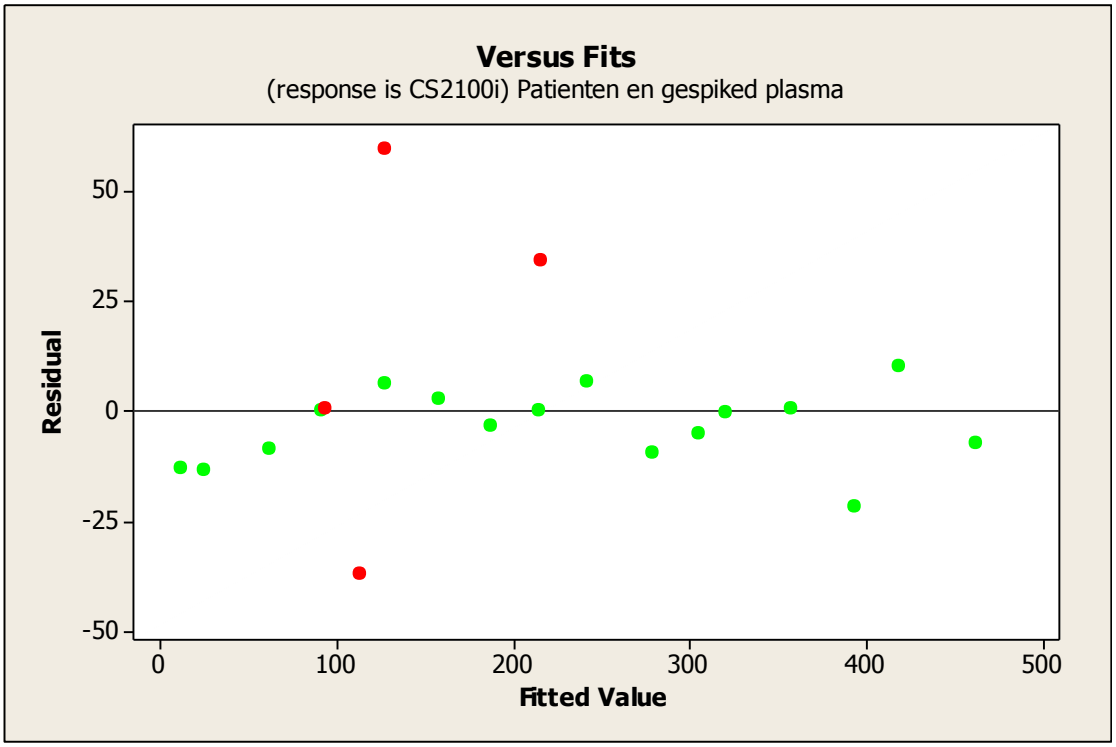
	Waarde	**95% BI laag**	**95% BI hoog**
As afsnede	10,17695	1,85550	18,4984
Variabele X	1,06959	1,03854	1,1006

In tabel 11B zijn de resultaten weergegeven van de orthogonale regressie met rivaroxaban gespiked poolplasma en patiënten. Op de x-as waren de analyse resultaten gevonden met de LC-MS/MS uitgezet tegen de analyse resultaten gevonden met de CS2100i op de y-as.

Tabel 11B: Orthogonale regressie (rivaroxaban gespiked poolplasma en patiënten)

	Waarde	**95% BI laag**	**95% BI hoog**
As afsnede	15,22383	-1,62407	32,0717
Variabele X	1,06314	0,99490	1,1314

Als er alleen rivaroxaban gespiked poolplasma wordt gebruikt voor de orthogonale regressie, valt zowel helling = 1, als as afsnede = 0 buiten het betrouwbaarheid interval.
Als de patiënten monsters en rivaroxaban gespiked poolplasma worden meegenomen in de orthogonale regressie, vallen de waarden van de helling = 1 en de as afsnede = 0 binnen het betrouwbaarheid interval. Als echter naar de residuen wordt gekeken, zie afbeelding 10, was de reden waarom de helling en as afsnede wel aan de eis voldeden voornamelijk te danken aan de grote afwijking bij 3 van de 4 patiënten monsters (rode punten in afbeelding 10), waardoor het betrouwbaarheid interval verdubbelde.



Afbeelding 10: residuen gespiked plasma (groen) en patiënten monsters (rood).

Discussie

In het ideale geval dient methodevergelijk plaats te vinden met (geanonimiseerd) patiënten plasma. Rivaroxaban wordt in het lichaam afgebroken en deze metabolieten kunnen van invloed zijn op de bepaling. Bovendien komen in het ziekenhuis patiënten die een afwijkend metabolisme hebben omdat ze bijvoorbeeld ouder zijn en de nier- of leverfunctie verslechterd is. Hierdoor kan het zijn dat metabolieten zich ophopen in het lichaam en de bepaling extra beïnvloeden. Gespiked blanco plasma met rivaroxaban bevat geen metabolieten en geeft zo niet de werkelijke omstandigheden weer.

Als de resultaten worden geëvalueerd zijn er sterke aanwijzingen dat rivaroxaban, welk via het menselijk lichaam was opgenomen, verschillend resultaat geeft bij de twee methoden. Het verschil in resultaat tussen de methoden was veel groter bij patiënt monsters, dan wanneer er rivaroxaban gespiked blanco plasma werd gebruikt. Om te kunnen bewijzen dat de verschillen veel groter zijn tussen gespiked plasma en patiënten plasma, dient een grotere groep patiënten plasma bepaald te worden met beide methoden.

Een reden zou kunnen zijn voor de afwijking in de resultaten tussen de twee methoden dat de monster opwerking van de LC-MS/MS methode een extractie recovery heeft voor rivaroxaban gespiked plasma van 82% ± 18% rivaroxaban. Dit houdt waarschijnlijk in dat een deel van het rivaroxaban wat eiwit gebonden is, samen met de eiwitten neerslaat wanneer neerslag reagens wordt toegevoegd. In welke verhouding, vrij of gebonden, rivaroxaban voorkomt in plasma kan verschillen bij gespiked plasma, patiënt plasma en patiënten onderling. Het is denkbaar dat patiënten plasma een andere extractie recovery geeft dan rivaroxaban gespiked plasma door een andere verhouding eiwit gebonden rivaroxaban. Omdat zowel de kalibratie curve als de QC monsters met rivaroxaban gespiked plasma waren gemaakt was er geen afwijking van de juistheid binnen de analytische run op de LC-MS/MS waarneembaar.

Om dit vraagstuk op te lossen lijkt een extractie recovery van 100% noodzakelijk te zijn, zodat zeker is dat al het rivaroxaban (vrij en gebonden) in oplossing blijft en geanalyseerd kan worden. Volgens literatuur [1] was de extractie recovery bij gebruik van methanol 100%. Methanol als neerslag reagens zou getest kunnen worden als vervanging van het gebruikte neerslag reagens. Bij veranderen van neerslag reagens dient de methode validatie opnieuw uitgevoerd te worden.

Hoofdstuk 5: Conclusie

5.1 Opzetten methode op LC-MS/MS

Het ionisatie proces voor detectie en de chromatografie waren geoptimaliseerd om rivaroxaban en interne standaard disopyramide te kunnen meten met voldoende herhaalbaarheid in het gehele bereik.
Voor de detectie met de massaspectrometer waren de volgende transities (SRM) met een band breedte van 0,7 amu gebruikt:
Rivaroxaban: m/z 436,0 -> 144,9
Disopyramide: m/z 340,2 -> 239,0
Rivaroxaban en de interne standard disopyramide waren chromatografisch gescheiden op een Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 2,1*100mm, 3.5 µm kolom met een eluens verhouding van 30% acetonitril en 70% ammoniumacetaat buffer pH 3,2. Om te zorgen dat componenten die geen retentie hadden de detector zo min mogelijk vervuilen, was het eluens de eerste minuut na injectie omgeleid naar het afval vat in plaats van naar de detector. Na elutie van de interne standaard disopyramide en rivaroxaban was een gradiënt met 100% acetonitril ingesteld om de overige componenten van de kolom te spoelen. Tijdens dit gradiënt was het eluens wederom omgeleid naar het afval vat. Gevolg van deze omleidingen en het gradiënt was dat er een schoon chromatogram ontstond waardoor er zelfs in het lage gebied herhaalbaar gemeten kon worden.

5.2 Validatie LC-MS/MS methode

De kalibratie curven waren geconstrueerd in lineair verband op 8 standaarden zonder de blanco over het gehele bereik, waarbij de concentratie rivaroxaban was uitgezet tegen de oppervlak ratio rivaroxaban / interne standaard. Om te bepalen of de concentratie 0 µg/l meegenomen mag worden in de kalibratie curve was het 95% betrouwbaarheid interval uitgerekend van de gevonden as-afsneden van de drie validatie kalibratie curven. Het resultaat was dat het punt 0 µg/l in alle gevallen binnen het 95% betrouwbaarheid interval viel. Het punt 0 µg/l mag als meetpunt worden meegenomen in de constructie van de kalibratie curve.
Het bereik van de kalibratie curven was 20 µg/l tot en met 522 µg/l. Alle waarden binnen dit gebied kunnen gekwantificeerd worden. De detectie grens was voor de drie kalibratie curven berekend op gemiddeld 12 µg/l. De beslissing grens was voor de drie kalibratie curven berekend op gemiddeld 6,1 µg/l. Waarden lager dan de LLOQ en groter dan de beslissing grens worden gekwantificeerd als < 20 µg/l. Waarden lager dan 6,1 µg/l worden gekwantificeerd als niet aantoonbaar.
Binnen het bereik van de kalibratie curve was de juistheid < 15% en ≤ 20% voor de LLOQ.
Precisie en herhaalbaarheid waren < 15% over het gehele bereik.
De matrix plasma van individuele patiënten waren niet van invloed op de bepaling.
Na extractie met neerslag reagens was 82% rivaroxaban uit het plasma geëxtraheerd, de extractie recovery was onafhankelijk van de individuele matrix plasma.
Relevante concentraties co-medicatie of het neerslag reagens hadden geen invloed op het signaal van rivaroxaban.

5.3 Methodevergelijk LC-MS/MS versus aangepaste anti-Xa bepaling

Methodevergelijk met orthogonale regressie op 18 monsters rivaroxaban gepiked poolplasma gaf als resultaat dat de helling ≠ 1 en de as afsnede ≠ 0. Dit houd in dat er een absolute en een systematische fout is in een of beide methoden en de methoden niet gelijk aan elkaar zijn. Indien de 4 patiënten monsters worden meegenomen met de 18 monsters gespiked poolplasma bij de orthogonale regressie, viel de helling = 1 en as afsnede = 0 binnen het BI.

Deze waarden vielen binnen het BI, omdat de patiënten zodanig veel afwijking vertoonde, dat het Betrouwbaarheid Interval verdubbelde. Om deze reden bleef de uitkomst van de methodevergelijk dat de methoden niet gelijk aan elkaar waren.
Een verklaring waarom de LC-MS/MS methode een afwijking in de juistheid zou kunnen veroorzaken bij de methodevergelijk, was de extractie recovery van 82 ± 18 % rivaroxaban. De eiwitten, waaronder een deel van het eiwit gebonden rivaroxaban, slaan neer na toevoegen van het neerslag reagens bij de monsteropwerking. Als bij de standaarden de extractie recovery gelijk is aan die van de monsters, zal er geen afwijking in het nominale gehalte rivaroxaban gevonden worden bij de monsters. Patiënten plasma waarbij de patiënt rivaroxaban is toegediend en rivaroxaban gespiked plasma kunnen verschillen in de hoeveelheid eiwit gebonden rivaroxaban. De extractie recovery kan verschillend zijn voor patiënten plasma en rivaroxaban gespiked plasma. Dit kan een verklaring zijn waarom het gehalte rivaroxaban in patiënten plasma een grotere afwijking geeft dan rivaroxaban gespiked plasma bij de methodevergelijk. Om uit te sluiten dat de extractie recovery invloed heeft op de uitkomst van de methodevergelijk, dient het neerslag reagens aangepast te worden, zodat de extractie recovery de 100% nadert.
Pas als is aangetoond dat de extractie recovery bij de LC-MS/MS methode 100% is en de methode foutloos word verondersteld, kan met methodevergelijk bepaald worden of de methoden overeen komen en de juistheid van patiënt monsters met de aangepaste anti-factor Xa bepaling van rivaroxaban binnen de gestelde eisen valt.

Hoofdstuk 6: Literatuur

[1]. G.Rohde, Determination of Rivaroxaban – a novel, oral direct FACTOR Xa inhibitor – in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B, 872 (2008), 43-50

[2]. Drs. J.P.M. Andries,/ Dr.A.B.de Vries, Chemometrie, derde druk, Syntax media, Arnhem, 2007

[3]. P.J.Molenaar, J. Dinkelaar and A. Leyte, Measuring Rivaroxaban in a clinical laboratory setting, using common coagulation assays, Xa inhibition and thrombin generation, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2012, 50 (10)

[4]. http://www.fk.cvz.nl/, zoekterm Rivaroxaban, 31-12-2012, 09:40

[5]. http://www.alsachim.com/product-C2138-drugs.metabolites-Rivaroxaban.html, 09-12-2012, 14:12

[6] http://www.thrombosisadviser.com/en/understanding-thrombosis/haemostasis/coagulation-cascade/index.php, 28-01-2013, 12:39

[7] http://www.xarelto.com/en/targeting-factor-Xa/the-central-role-of-factor-Xa/, 28-01-2013, 16:11

[8]. http://www.nodia.be/node/15, 04-01-2013, 11:14

[9]. http://www.stago.com/haemostasis/coagulation-pathways/, 04-01-2013, 11:15

[10]. http://www.nvkc.nl/publicaties/documents/NTKCokt08Anti-factor-Xa-activiteitsbepaling.pdf, 13-04-2013,12:15

[11] Werkgroep NOAC's van de wetenschappelijke verenigingen en Orde van Medisch Specialisten, Leidraad begeleide introductie nieuwe orale antistollings middelen, 2012

[12] Thermo electron european training institute, TSQ Quantum Operations, Course manual.

[13].http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

[14]. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d7644?lang=en&region=NL, 15-02-2013, 09:14

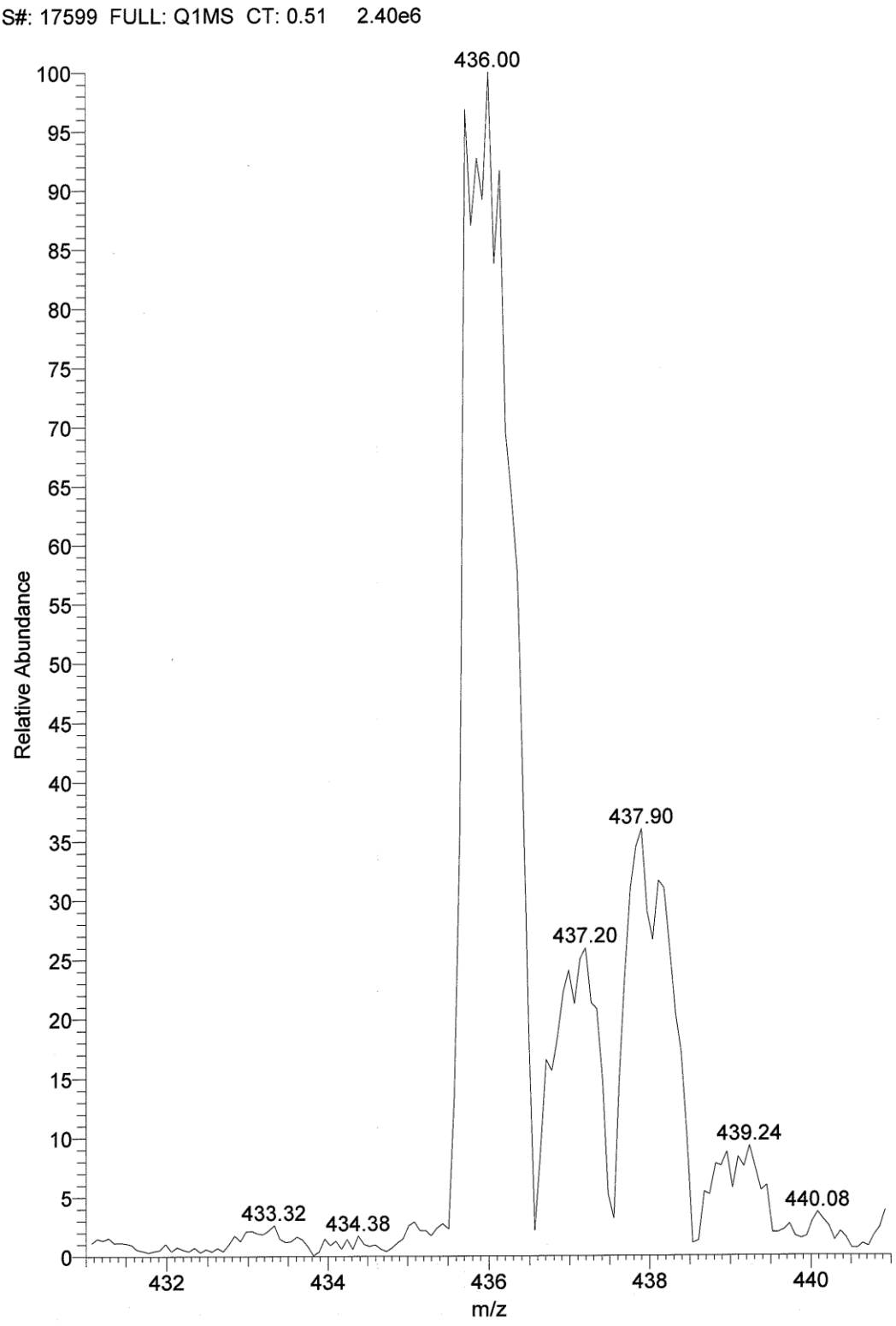
[15]. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf, 07-02-2013, 11:44

Bijlage 1

Titel:	**Rekenblad standaarden en QC monsters**							
Rivaroxaban stockoplossing								
inweeg	2,000	mg						
maatkolf	100,0	ml						
Rivaroxaban stamoplossing 1								
stockoplossing	1,0	ml						
maatkolf	10,0	ml						
Rivaroxaban stamoplossing 2								
inweeg	2,0	ml						
maatkolf	10,0	ml						
Standaarden								
Standaarden zijn gespiked in plasma								
standaard	1	2	3	4	5	6	7	8
gepipetteerd uit	stam 1	stam 1	stam 1	stam 1	stam 1	stam 1	stam 2	stam 2
volume (µl)	10	25	50	75	100	150	100	150
volume plasma (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
concentratie (µg/l)	20	49	95	140	182	261	364	522
QC monsters								
QC monsters zijn in maatkolven gemaakt								
QC monster	1	2	3					
gepipetteerd uit	stam 1	stock	stock					
volume (µl)	100	100	200					
volume plasma (µl)	9900	9900	9800					
concentratie (µg/l)	20	200	400					

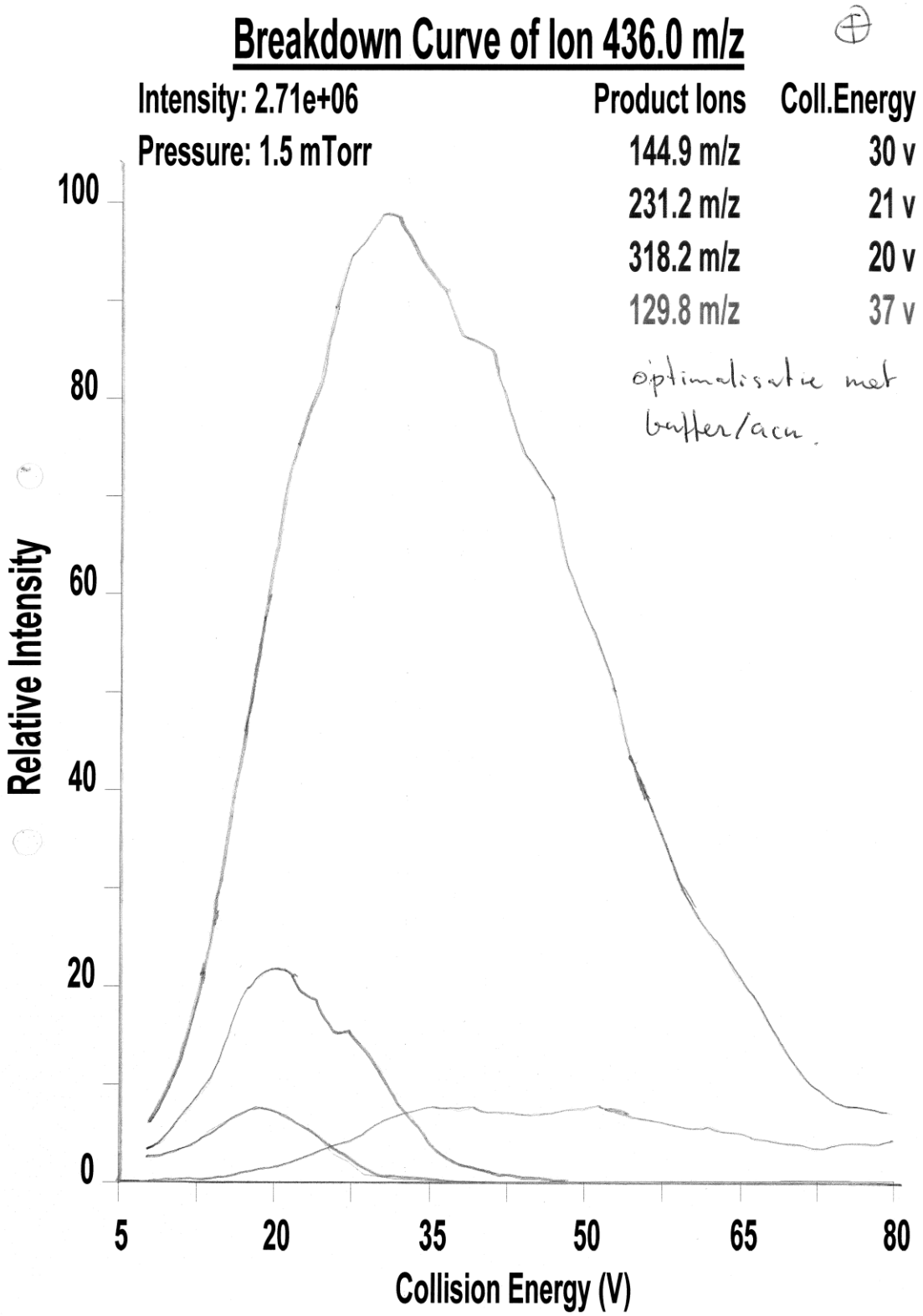
Bijlage 2

Titel: ESI ionisatie Rivaroxaban



Bijlage 3

Titel: Fragmentatie van rivaroxaban ion.



Bijlage 4

Titel:	Optimalisatie 1							
Afname interne standaard								
Filename	**Sample Type**	**ISTD Area**						
std1	Unknow n Sample	314834						
std1_2	Std Bracket Sample	279634						
std1_3	Std Bracket Sample	257294						
std1_4	Std Bracket Sample	240879						
std1_5	Std Bracket Sample	231870						
std1_6	Std Bracket Sample	222546						
std1_7	Std Bracket Sample	225716						
std1_8	Std Bracket Sample	210131						
std1_9	Std Bracket Sample	198815						
std2_1	Std Bracket Sample	183334						
std2_2	Std Bracket Sample	179649						
std2_3	Std Bracket Sample	172768						
std2_4	Std Bracket Sample	174233						
std3_1	Std Bracket Sample	165654						
std3_2	Std Bracket Sample	153386						
std3_3	Std Bracket Sample	156564						
std3_4	Std Bracket Sample	159347						
std4_1	Std Bracket Sample	152022						
std4_2	Std Bracket Sample	154575						
std4_3	Std Bracket Sample	138408						
std4_4	Std Bracket Sample	137746						
std5_1	Std Bracket Sample	129854						
std5_2	Std Bracket Sample	135149						
std5_3	Std Bracket Sample	123855						
std5_4	Std Bracket Sample	123731						
std6_1	Std Bracket Sample	126083						
std6_2	Std Bracket Sample	128498						
std6_3	Std Bracket Sample	107048						
std6_4	Std Bracket Sample	116912						
std7-1	Std Bracket Sample	100937						
std7_2	Std Bracket Sample	103728						
std7_3	Std Bracket Sample	99668						
std7_4	Std Bracket Sample	91769						
std8_1	Std Bracket Sample	86519						
std8_2	Std Bracket Sample	56907						
std8_3	Std Bracket Sample	53847						
std8_4	Std Bracket Sample	58064						

Bijlage 4

Titel:	Optimalisatie 1							
Afname interne standaard								
Filename	**Sample Type**	**ISTD Area**						
qc1_1	QC Sample	49712						
qc1_2	QC Sample	52315						
qc1_3	QC Sample	50512						
qc1_4	QC Sample	50744						
qc1_5	QC Sample	52409						
qc1_6	QC Sample	52041						
qc2_1	QC Sample	50337						
qc2_2	QC Sample	57528						
qc2_3	QC Sample	53379						
qc2_4	QC Sample	45202						
qc2_5	QC Sample	52063						
qc2_6	QC Sample	58953						
qc3_1	QC Sample	48339						
qc3_2	QC Sample	42495						
qc3_3	QC Sample	38293						
qc3_4	QC Sample	39826						
qc3_5	QC Sample	39696						
qc3_6	QC Sample	41875						
blanco1_1	Blank Sample	42856						
blanco1_2	Blank Sample	43855						
blanco1_3	Blank Sample	47537						
blanco1_4	Blank Sample	43395						
blanco1_5	Blank Sample	44603						
blanco1_6	Blank Sample	48719						
Afname interne standaard %:		**546**						

Bijlage 5

Titel:	**Optimalisatie 2**					
Component Name	**Curve Index**	**Weighting Index**	**Origin Index**			
rivaroxaban	Quadratic	Equal	Ignore			
Equation						
Y = 0.000456296+0.00139131*X+2.95912e-007*X^2 R^2 = 0.9960						
				Specified		
Filename	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**RT**	
std1	1239	288748	0,00429	4,950	3,64	
std11	2566	291905	0,00879	4,950	3,62	
std111	5839	314053	0,01859	4,950	3,62	
std1111	3558	286096	0,01243	4,950	3,60	
std11111	2724	272186	0,01001	4,950	3,61	
std111111	1430	251350	0,00569	4,950	3,61	
std1111111	667	254628	0,00262	4,950	3,61	
std11111111	937	250481	0,00374	4,950	3,61	
spreiding %			**65,0**			
std2	5331	240440	0,02217	24,260	3,60	
std22	5616	242944	0,02312	24,260	3,61	
std222	6163	243297	0,02533	24,260	3,61	
std2222	7775	237186	0,03278	24,260	3,60	
spreiding %			**18,6**			
std3	14302	241606	0,05920	47,360	3,61	
std33	16401	245985	0,06667	47,360	3,61	
std333	15410	243496	0,06329	47,360	3,62	
std3333	17982	247691	0,07260	47,360	3,61	
spreiding %			**8,7**			
std4	34466	244949	0,14071	90,410	3,61	
std44	35907	245534	0,14624	90,410	3,61	
std444	35743	246096	0,14524	90,410	3,61	
std4444	40171	257093	0,15625	90,410	3,61	
spreiding %			**4,5**			
std5	68110	248202	0,27441	189,430	3,61	
std55	71995	250079	0,28789	189,430	3,62	
std555	68153	256723	0,26548	189,430	3,60	
std5555	68750	241564	0,28460	189,430	3,61	
spreiding %			**3,7**			
std6	101106	248747	0,40646	277,530	3,61	
std66	95706	242693	0,39435	277,530	3,60	
std666	98179	248737	0,39471	277,530	3,61	
std6666	101188	237895	0,42535	277,530	3,61	
spreiding %			**3,6**			
std7	127396	240749	0,52917	361,640	3,61	
std77	130560	245041	0,53281	361,640	3,61	
std777	128677	256087	0,50247	361,640	3,61	
std7777	135452	237979	0,56918	361,640	3,61	
spreiding %			**5,1**			
std8	193339	236663	0,81694	518,870	3,60	
std88	200387	237261	0,84458	518,870	3,61	
std888	179670	225181	0,79789	518,870	3,61	
std8888	176473	230138	0,76681	518,870	3,61	
spreiding %			**4,1**			

Bijlage 5

Titel:	Optimalisatie 2					
				Specified		
Filename	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**RT**	
qc1	757	216749	0,00349	5,510	3,61	
qc11	1022	217824	0,00469	5,510	3,61	
qc111	1586	244429	0,00649	5,510	3,61	
qc1111	1600	242306	0,00660	5,510	3,61	
qc11111	1196	232846	0,00513	5,510	3,61	
qc111111	3036	237834	0,01277	5,510	3,57	
spreiding %			**50,1**			
qc2	77634	244405	0,31765	220,300	3,61	
qc22	82628	244957	0,33732	220,300	3,61	
qc222	81148	260274	0,31178	220,300	3,61	
qc2222	77349	235414	0,32857	220,300	3,60	
qc22222	83039	238482	0,34820	220,300	3,61	
qc222222	77006	238218	0,32326	220,300	3,61	
spreiding %			**4,1**			
qc3	143319	231699	0,61856	440,600	3,61	
qc33	154524	219980	0,70244	440,600	3,61	
qc333	149674	227494	0,65792	440,600	3,60	
qc3333	148385	228119	0,65047	440,600	3,61	
qc33333	144978	233694	0,62038	440,600	3,60	
qc333333	144901	236381	0,61300	440,600	3,61	
spreiding %			**5,3**			
blanco1	8	129	0,06222	NA	3,89	
blanco11	1537	4468	0,34407	NA	3,62	
blanco111	53	886	0,05929	NA	3,59	
blanco1111	18	0	0,00000	NA	3,77	
blanco11111	272	3163	0,08596	NA	3,62	
blanco111111	846	2804	0,30193	NA	3,61	
zero1	61	232648	0,00026	NA	3,75	
zero11	125	218785	0,00057	NA	3,56	
zero111	4	229464	0,00002	NA	3,95	
zero1111	6	226997	0,00003	NA	3,23	
zero11111	175	223852	0,00078	NA	3,61	
zero111111	335	228691	0,00146	NA	3,60	
spreiding % ofwel %RSD:		standaard deviatie	* 100%			
		gemiddelde				

Bijlage 6

Titel:	**Optimalisatie 3**							
Component Name		**Curve Index**	**Weighting Index**	**Origin Index**				
rivaroxaban		Linear	Equal	Ignore				
Equation								
Y = -0.0238866+0.00671512*X R^2 = 0.9884								
				Specified				
Filename	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**RT**			
std111	2136	115147	0,019	NA	1,30			
std1111	2131	100177	0,021	NA	1,33			
std11111	2553	114862	0,022	4,950	1,30			
std111111	1803	82700	0,022	4,950	1,31			
std1111111	1484	75354	0,020	4,950	1,31			
std11111111	2508	79870	0,031	4,950	1,33			
		spreiding %	**20,3**					
std2	12436	82322	0,151	24,260	1,33			
std22	10684	90145	0,119	24,260	1,35			
std222	11755	70259	0,167	24,260	1,33			
std2222	11741	76267	0,154	24,260	1,33			
		spreiding %	**14,018**					
std3	21611	74577	0,290	47,360	1,33			
std33	25077	75774	0,331	47,360	1,33			
std333	25989	77586	0,335	47,360	1,33			
std3333	24901	82133	0,303	47,360	1,31			
		spreiding %	**6,933**					
std4	44699	94679	0,472	90,410	1,26			
std44	46281	81246	0,570	90,410	1,31			
std444	46892	70405	0,666	90,410	1,33			
std4444	42450	76444	0,555	90,410	1,31			
		spreiding %	**14,047**					
std5	94940	73268	1,296	189,430	1,33			
std55	97098	69973	1,388	189,430	1,33			
std555	95083	76487	1,243	189,430	1,31			
std5555	92666	69277	1,338	189,430	1,33			
		spreiding %	**4,667**					
std6	125088	69991	1,787	277,530	1,33			
std66	132551	84196	1,574	277,530	1,26			
std666	128779	77511	1,661	277,530	1,31			
std6666	129548	73019	1,774	277,530	1,31			
		spreiding %	**5,923**					
std7	168625	87236	1,933	361,640	1,31			
std77	173478	74124	2,340	361,640	1,31			
std777	192496	72848	2,642	361,640	1,31			
std7777	175124	85190	2,056	361,640	1,28			
		spreiding %	**14,104**					
std8	260676	76219	3,420	518,870	1,33			
std88	259822	70169	3,703	518,870	1,33			
std888	260962	74180	3,518	518,870	1,31			
std8888	267175	76163	3,508	518,870	1,31			
		spreiding %	**3,359**					

Bijlage 6

Titel:	Optimalisatie 3							
				Specified				
Filename	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**RT**			
qc1	1885	67896	0,028	5,510	1,33			
qc11	2577	68486	0,038	5,510	1,31			
qc111	1672	74276	0,023	5,510	1,31			
qc1111	1865	70151	0,027	5,510	1,31			
qc11111	1856	67606	0,027	5,510	1,31			
qc111111	1323	71408	0,019	5,510	1,31			
		spreiding %	**24,0**					
qc2	111657	71183	1,569	220,300	1,30			
qc22	108013	70945	1,522	220,300	1,31			
qc222	106311	78940	1,347	220,300	1,30			
qc2222	111266	70254	1,584	220,300	1,33			
qc22222	105031	75508	1,391	220,300	1,30			
qc222222	108891	65048	1,674	220,300	1,33			
		spreiding %	**8,2**					
qc3	206073	70294	2,932	440,600	1,31			
qc33	204889	85153	2,406	440,600	1,26			
qc333	208172	72832	2,858	440,600	1,31			
qc3333	201294	73163	2,751	440,600	1,31			
qc33333	215353	73050	2,948	440,600	1,30			
qc333333	207168	71119	2,913	440,600	1,31			
		spreiding %	**7,4**					
blanco1	52	2000	0,026	NA	1,51			
blanco2	56	982	0,057	NA	1,38			
blanco3	11	705	0,015	NA	1,10			
blanco4	67	885	0,076	NA	1,16			
blanco5	52	969	0,053	NA	1,15			
blanco6	37	724	0,051	NA	1,11			
zero1	85	68619	0,001	NA	1,48			
zero2	53	77262	0,001	NA	1,13			
zero3	30	87010	0,000	NA	1,48			
zero4	49	65219	0,001	NA	1,11			
zero5	23	65625	0,000	NA	1,13			
zero6	93	62389	0,001	NA	1,11			
		gemiddeld	**0,000808**					
max respons rivaroxaban zero1 tov std111:			6,6	%				
max respons disopyramide blanco1 tov zero 1:			2,9	%				

Bijlage 7A

Titel:	Validatie run 1: Kalibratie curve; Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid											
Component Name		**Curve Index**	**Weighting Index**	**Origin Index**	**Equation**							
rivaroxaban		Linear	Equal	Ignore	Y = -0.00618763+0.00152513*X R^2 = 0.9982							
						Specified	**Calculated**					
Filename	**Sample Type**	**Integ. Type**	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**Amount**	**%Diff**	**Level**	**Units**	**RT**	
std111	Std Bracket Sample	Method Settings	9972	382028	0,0261	21,480	21,172	-1,4%	1	ug/l	3,52	
std1111	Std Bracket Sample	Method Settings	9651	362706	0,0266	21,480	21,505	0,1%	1	ug/l	3,52	
std11111	Std Bracket Sample	Method Settings	10369	375233	0,0276	21,480	22,176	3,2%	1	ug/l	3,51	
std111111	Std Bracket Sample	Method Settings	11062	362821	0,0305	21,480	24,048	12,0%	1	ug/l	3,51	
spreiding %					**7,1**							
gemiddeld			**10264**									
std2	Std Bracket Sample	Method Settings	26118	343368	0,076	52,900	53,932	2,0%	2	ug/l	3,52	
std22	Std Bracket Sample	Method Settings	27025	353585	0,076	52,900	54,171	2,4%	2	ug/l	3,52	
std222	Std Bracket Sample	Method Settings	23761	335719	0,071	52,900	50,464	-4,6%	2	ug/l	3,51	
std2222	Std Bracket Sample	Method Settings	23832	331376	0,072	52,900	51,213	-3,2%	2	ug/l	3,52	
spreiding %					**3,9**							
std3	Std Bracket Sample	Method Settings	49723	324291	0,153	103,290	104,592	1,3%	3	ug/l	3,51	
std33	Std Bracket Sample	Method Settings	51754	325001	0,159	103,290	108,471	5,0%	3	ug/l	3,51	
std333	Std Bracket Sample	Method Settings	49962	328762	0,152	103,290	103,701	0,4%	3	ug/l	3,49	
std3333	Std Bracket Sample	Method Settings	44399	320578	0,138	103,290	94,866	-8,2%	3	ug/l	3,51	
spreiding %					**5,8**							
std4	Std Bracket Sample	Method Settings	68320	314417	0,217	151,330	146,530	-3,2%	4	ug/l	3,51	
std44	Std Bracket Sample	Method Settings	69998	317884	0,220	151,330	148,438	-1,9%	4	ug/l	3,51	
std444	Std Bracket Sample	Method Settings	66476	310030	0,214	151,330	144,646	-4,4%	4	ug/l	3,51	
std4444	Std Bracket Sample	Method Settings	61919	315145	0,196	151,330	132,885	-12,2%	4	ug/l	3,51	
spreiding %					**5,0**							
std5	Std Bracket Sample	Method Settings	97992	315687	0,310	197,180	207,586	5,3%	5	ug/l	3,49	
std55	Std Bracket Sample	Method Settings	92220	316840	0,291	197,180	194,902	-1,2%	5	ug/l	3,51	
std555	Std Bracket Sample	Method Settings	95468	316498	0,302	197,180	201,835	2,4%	5	ug/l	3,51	
std5555	Std Bracket Sample	Method Settings	94180	313483	0,300	197,180	201,044	2,0%	5	ug/l	3,51	
spreiding %					**2,6**							
std6	Std Bracket Sample	Method Settings	127089	306461	0,415	282,910	275,967	-2,5%	6	ug/l	3,51	
std66	Std Bracket Sample	Method Settings	133209	300466	0,443	282,910	294,748	4,2%	6	ug/l	3,51	
std666	Std Bracket Sample	Method Settings	133008	301008	0,442	282,910	293,786	3,8%	6	ug/l	3,51	
std6666	Std Bracket Sample	Method Settings	130776	296915	0,440	282,910	292,851	3,5%	6	ug/l	3,49	
spreiding %					**3,1**							
std7	Std Bracket Sample	Method Settings	175658	296621	0,592	394,360	392,349	-0,5%	7	ug/l	3,51	
std77	Std Bracket Sample	Method Settings	182914	305095	0,600	394,360	397,159	0,7%	7	ug/l	3,49	
std777	Std Bracket Sample	Method Settings	169670	287723	0,590	394,360	390,713	-0,9%	7	ug/l	3,49	
std7777	Std Bracket Sample	Method Settings	179080	297722	0,602	394,360	398,450	1,0%	7	ug/l	3,49	
spreiding %					**1,0**							

Bijlage 7A

Titel:	Validatie run 1, Kalibratie curve; Juistheid; herhaalbaarheid; reproduceerbaarheid										
						Specified	Calculated				
Filename	**Sample Type**	**Integ. Type**	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**Amount**	**%Diff**	**Level**	**Units**	**RT**
std8	Std Bracket Sample	Method Settings	258089	300686	0,858	565,830	566,851	0,2%	8	ug/l	3,49
std88	Std Bracket Sample	Method Settings	250710	294497	0,851	565,830	562,249	-0,6%	8	ug/l	3,49
std888	Std Bracket Sample	Method Settings	256882	293443	0,875	565,830	578,046	2,2%	8	ug/l	3,49
std8888	Std Bracket Sample	Method Settings	247622	299716	0,826	565,830	545,773	-3,5%	8	ug/l	3,49
spreiding %					**2,4**						
qc1	QC Sample	Method Settings	9538	283259	0,034	21,750	26,137	20,2%	QC1	ug/l	3,49
qc11	QC Sample	Method Settings	8418	305609	0,028	21,750	22,117	1,7%	QC1	ug/l	3,49
qc111	QC Sample	Method Settings	8023	285925	0,028	21,750	22,455	3,2%	QC1	ug/l	3,51
qc1111	QC Sample	Method Settings	8457	300459	0,028	21,750	22,513	3,5%	QC1	ug/l	3,51
qc11111	QC Sample	Method Settings	8471	297920	0,028	21,750	22,700	4,4%	QC1	ug/l	3,49
qc111111	QC Sample	Method Settings	8898	294834	0,030	21,750	23,846	9,6%	QC1	ug/l	3,51
spreiding %					**7,9**						
qc2	QC Sample	Method Settings	89196	298700	0,299	217,500	199,854	-8,1%	QC2	ug/l	3,51
qc22	QC Sample	Method Settings	96027	301676	0,318	217,500	212,769	-2,2%	QC2	ug/l	3,51
qc222	QC Sample	Method Settings	98592	312193	0,316	217,500	211,124	-2,9%	QC2	ug/l	3,51
qc2222	QC Sample	Method Settings	98204	299937	0,327	217,500	218,737	0,6%	QC2	ug/l	3,51
qc22222	QC Sample	Method Settings	91510	296197	0,309	217,500	206,630	-5,0%	QC2	ug/l	3,51
qc222222	QC Sample	Method Settings	89744	284062	0,316	217,500	211,208	-2,9%	QC2	ug/l	3,51
spreiding %					**3,1**						
qc3	QC Sample	Method Settings	169546	287463	0,590	435,000	390,779	-10,2%	QC3	ug/l	3,51
qc33	QC Sample	Method Settings	190785	304632	0,626	435,000	414,698	-4,7%	QC3	ug/l	3,51
qc333	QC Sample	Method Settings	191239	320882	0,596	435,000	394,830	-9,2%	QC3	ug/l	3,51
qc3333	QC Sample	Method Settings	177497	306565	0,579	435,000	383,689	-11,8%	QC3	ug/l	3,51
qc33333	QC Sample	Method Settings	178179	297061	0,600	435,000	397,339	-8,7%	QC3	ug/l	3,51
qc333333	QC Sample	Method Settings	172968	297632	0,581	435,000	385,106	-11,5%	QC3	ug/l	3,52
spreiding %					**2,9**						
blanco1	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
blanco2	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
blanco3	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
blanco4	Blank Sample	Method Settings	NF	0	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
blanco5	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
blanco6	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
zero1	Blank Sample	Manual Integration	NF	292126	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
zero2	Blank Sample	Method Settings	46	290746	0,000	NA	4,160	NA	NA	ug/l	3,51
zero3	Blank Sample	Manual Integration	NF	271525	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
zero4	Blank Sample	Manual Integration	NF	290497	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
zero5	Blank Sample	Manual Integration	NF	294066	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF
zero6	Blank Sample	Manual Integration	NF	286271	NF	NA	NF	NF	NA	ug/l	NF

Bijlage 7B

Titel:	**Validatie run 1: Kalibratie curve**					
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.					
Gegevensanalyse \ regressie						
X-waarden:	Specified amount					
Y-waarden:	Area ratio rivaroxaban / disopyramide (ISTD)					
SAMENVATTING UITVOER						
Gegevens voor de regressie						
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,999117598					
R-kwadraat	**0,998235974**					
Aangepaste kleinste kwadraat	0,998177173					
Standaardfout	0,011472057					
Waarnemingen	32					
Variantie-analyse						
	Vrijheidsgraden	*Kwadratensom*	*Gemiddelde kwadraten*	*F*	*Significantie F*	
Regressie	1	2,234251512	2,234251512	16976,55103	7,20602E-43	
Storing	30	0,003948243	0,000131608			
Totaal	31	2,238199755				
	Coëfficiënten	*Standaardfout*	*T- statistische gegevens*	*P-waarde*	*Laagste 95%*	*Hoogste 95%*
Snijpunt	**-0,006187627**	0,003288515	-1,881587105	0,069627224	**-0,01290367**	**0,000528416**
Variabele X 1	**0,001525129**	1,17053E-05	130,2940944	7,20602E-43	0,001501224	0,001549035

Bijlage 7C

Titel:	**Validatie run 1: Kalibratie curve**								
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.								
Detectiegrens: kwantificeerbaar vanaf detectie grens.									
Detectie grens									
Ld= b0 + 2t*Sb0									
t w aarde enkelzijdig									
b0=asafsnede									
Sb0=standaardfout van b0									
b1	0,001525129								
b0	-0,006187627								
Sb0	0,003288515								
t									
n: aantal standaarden	8								
p: aantal parameters	2								
t(n-p)enkelzijdig	1,943								
detectiegrens Ld	0,00659								
bijbehorende concentratie									
Xd=(Ld-bo)/b1									
detectiegrens µg/l:	**8,4**								

Bijlage 7D

Titel:	Validatie run 1: Kalibratie curve
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.
Beslissingsgrens: wel aantoonbaar of niet aantoonbaar	
Lc= b0 + t*Sb0	
t waarde enkelzijdig	
b0=asafsnede	
Sb0=standaardfout van b0	
b1	0,001525129
b0	-0,006187627
Sb0	0,003288515
t	
n: aantal standaarden	8
p: aantal parameters	2
t(n-p)enkelzijdig	1,943
beslissingsgrens Lc	0,00020
bijbehorende concentratie	
Xc=(Lc-bo)/b1	
beslissinggrens µg/l:	**4,190**

Bijlage 8A

Titel:	Validatie run 2: Kalibratie curve; Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid											
Component Name		**Curve Index**	**Weighting Index**	**Origin Index**	**Equation**							
rivaroxaban		Linear	Equal	Ignore	Y = -0.00894063+0.00149347*X		R^2 = 0.9965					
						Specified	**Calculated**					
Filename	**Sample Type**	**Integ. Type**	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**Amount**	**%Diff**	**Peak Status**	**Level**	**Units**	**RT**
std111	Std Bracket Sample	Method Settings	8765	425744	0,021	21,480	19,772	-8%	Excluded	1	ug/l	3,42
std1111	Std Bracket Sample	Method Settings	7851	435913	0,018	21,480	18,045	-16%	Excluded	1	ug/l	3,42
std11111	Std Bracket Sample	Method Settings	12761	499147	0,026	21,480	23,105	8%		1	ug/l	3,44
std111111	Std Bracket Sample	Method Settings	10630	448164	0,024	21,480	21,868	2%		1	ug/l	3,44
std2	Std Bracket Sample	Method Settings	22174	374292	0,059	52,900	45,653	-14%	Excluded	2	ug/l	3,44
std22	Std Bracket Sample	Method Settings	23272	355340	0,065	52,900	49,839	-6%		2	ug/l	3,44
std222	Std Bracket Sample	Method Settings	20105	334911	0,060	52,900	46,183	-13%	Excluded	2	ug/l	3,46
std2222	Std Bracket Sample	Method Settings	22463	333721	0,067	52,900	51,056	-3%		2	ug/l	3,46
std3	Std Bracket Sample	Method Settings	42043	306527	0,137	103,290	97,824	-5%	Excluded	3	ug/l	3,46
std33	Std Bracket Sample	Method Settings	43882	310114	0,142	103,290	100,735	-2%		3	ug/l	3,46
std333	Std Bracket Sample	Method Settings	44152	299226	0,148	103,290	104,786	1%		3	ug/l	3,44
std3333	Std Bracket Sample	Method Settings	42288	301775	0,140	103,290	99,816	-3%		3	ug/l	3,46
std4	Std Bracket Sample	Method Settings	61148	289236	0,211	151,330	147,544	-3%	Excluded	4	ug/l	3,46
std44	Std Bracket Sample	Method Settings	63396	289231	0,219	151,330	152,750	1%		4	ug/l	3,44
std444	Std Bracket Sample	Method Settings	62616	286402	0,219	151,330	152,377	1%		4	ug/l	3,46
std4444	Std Bracket Sample	Method Settings	63808	296435	0,215	151,330	150,114	-1%		4	ug/l	3,44
std5	Std Bracket Sample	Method Settings	85806	304911	0,281	197,180	194,415	-1%		5	ug/l	3,46
std55	Std Bracket Sample	Method Settings	86352	295011	0,293	197,180	201,976	2%		5	ug/l	3,44
std555	Std Bracket Sample	Method Settings	80678	286877	0,281	197,180	194,293	-1%		5	ug/l	3,44
std5555	Std Bracket Sample	Method Settings	80216	273427	0,293	197,180	202,423	3%		5	ug/l	3,46
std6	Std Bracket Sample	Method Settings	119948	287108	0,418	282,910	285,724	1%		6	ug/l	3,44
std66	Std Bracket Sample	Method Settings	117841	290550	0,406	282,910	277,554	-2%		6	ug/l	3,44
std666	Std Bracket Sample	Method Settings	113564	284377	0,399	282,910	273,379	-3%		6	ug/l	3,44
std6666	Std Bracket Sample	Method Settings	116018	270848	0,428	282,910	292,803	3%		6	ug/l	3,44
std7	Std Bracket Sample	Method Settings	165678	269554	0,615	394,360	417,535	6%		7	ug/l	3,44
std77	Std Bracket Sample	Method Settings	163424	276489	0,591	394,360	401,754	2%		7	ug/l	3,44
std777	Std Bracket Sample	Method Settings	154044	281080	0,548	394,360	372,946	-5%		7	ug/l	3,44
std7777	Std Bracket Sample	Method Settings	158999	272376	0,584	394,360	396,854	1%		7	ug/l	3,44

Bijlage 8A

Titel:	Validatie run 2: Kalibratie curve; Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid											
						Specified	Calculated					
Filename	**Sample Type**	**Integ. Type**	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**Amount**	**%Diff**	**Peak Status**	**Level**	**Units**	**RT**
std8	Std Bracket Sample	Method Settings	226746	259247	0,875	565,830	591,623	5%	Response High	8	ug/l	3,44
std88	Std Bracket Sample	Method Settings	220870	262881	0,840	565,830	568,559	0%	Response High	8	ug/l	3,44
std888	Std Bracket Sample	Method Settings	222406	275002	0,809	565,830	547,504	-3%		8	ug/l	3,44
std8888	Std Bracket Sample	Method Settings	217096	268214	0,809	565,830	547,952	-3%		8	ug/l	3,44
qc1	QC Sample	Method Settings	7912	270051	0,029	21,750	25,604	18%		QC1	ug/l	3,44
qc11	QC Sample	Method Settings	7772	285145	0,027	21,750	24,237	11%		QC1	ug/l	3,46
qc111	QC Sample	Method Settings	13298	330245	0,040	21,750	32,948	51%	QC Failed	QC1	ug/l	3,44
qc1111	QC Sample	Method Settings	8487	293510	0,029	21,750	25,348	17%		QC1	ug/l	3,46
qc11111	QC Sample	Method Settings	7744	278134	0,028	21,750	24,630	13%		QC1	ug/l	3,46
qc111111	QC Sample	Method Settings	7868	286320	0,027	21,750	24,386	12%		QC1	ug/l	3,46
qc2	QC Sample	Method Settings	81466	264172	0,308	217,500	212,473	-2%		QC2	ug/l	3,46
qc22	QC Sample	Method Settings	84710	269938	0,314	217,500	216,109	-1%		QC2	ug/l	3,47
qc222	QC Sample	Method Settings	87350	273623	0,319	217,500	219,740	1%		QC2	ug/l	3,46
qc2222	QC Sample	Method Settings	84843	271306	0,313	217,500	215,379	-1%		QC2	ug/l	3,46
qc22222	QC Sample	Method Settings	77597	268890	0,289	217,500	199,215	-8%		QC2	ug/l	3,46
qc222222	QC Sample	Method Settings	84270	270620	0,311	217,500	214,491	-1%		QC2	ug/l	3,46
qc3	QC Sample	Method Settings	175776	270119	0,651	435,000	441,705	2%		QC3	ug/l	3,46
qc33	QC Sample	Method Settings	154033	271133	0,568	435,000	386,381	-11%		QC3	ug/l	3,46
qc333	QC Sample	Method Settings	160179	254378	0,630	435,000	427,612	-2%		QC3	ug/l	3,46
qc3333	QC Sample	Method Settings	153355	250840	0,611	435,000	415,344	-5%		QC3	ug/l	3,46
qc33333	QC Sample	Method Settings	162281	263949	0,615	435,000	417,657	-4%		QC3	ug/l	3,46
qc333333	QC Sample	Method Settings	147712	266467	0,554	435,000	377,158	-13%		QC3	ug/l	3,46
blanco1	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
blanco2	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
blanco3	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
blanco4	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
blanco5	Blank Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
blanco6	Blank Sample	Manual Integration	NF	56	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
zero1	Blank Sample	Manual Integration	NF	259552	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
zero2	Blank Sample	Manual Integration	NF	280417	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
zero3	Blank Sample	Manual Integration	NF	273746	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
zero4	Blank Sample	Manual Integration	4	274340	0,000	NA	5,996	NA	Response Low	NA	ug/l	3,44
zero5	Blank Sample	Manual Integration	NF	275188	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
zero6	Blank Sample	Manual Integration	NF	268788	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
std1	Unknow n Sample	Manual Integration	NF	0	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
std11	Unknow n Sample	Method Settings	6528	385166	0,017	NA	17,334	NA	Response Low	NA	ug/l	3,37

Bijlage 8B

Titel	**Validatie run 2: Kalibratie curve**					
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid					
Gegevensanalyse \ regressie						
X-waarden:	Specified amount					
Y-Waarden	Area ratio rivaroxaban / disopyramide (ISTD)					
SAMENVATTING UITVOER						
Gegevens voor de regressie						
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,998245941					
R-kwadraat	**0,996494958**					
Aangepaste kleinste kwadraat	0,996348915					
Standaardfout	0,015892025					
Waarnemingen	26					
Variantie-analyse						
	Vrijheidsgraden	*Kwadratensom*	*Gemiddelde kwadraten*	*F*	*Significantie F*	
Regressie	1	1,72326313	1,72326313	6823,279023	5,55053E-31	
Storing	24	0,006061355	0,000252556			
Totaal	25	1,729324485				
	Coëfficiënten	*Standaardfout*	*T- statistische gegevens*	*P-waarde*	*Laagste 95%*	*Hoogste 95%*
Snijpunt	**-0,008940631**	0,005590272	-1,59931957	0,122832868	**-0,020478386**	**0,002597123**
Variabele X 1	**0,001493474**	1,80801E-05	82,60314173	5,55053E-31	0,001456158	0,001530789

Bijlage 8C

Titel:	**Validatie run 2: Kalibratie curve**								
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.								
Detectiegrens: kwantificeerbaar vanaf detectie grens.									
Ld= b0 + 2t*Sb0									
t w aarde enkelzijdig									
b0=asafsnede									
Sb0=standaardfout van b0									
b1	0,001493474								
b0	-0,008940631								
Sb0	0,005590272								
t									
aantal standaarden	8								
aantal parameters	2								
t(n-p)enkelzijdig	1,9432								
detectiegrens Ld	0,0128								
bijbehorende concentratie									
Xd=(Ld-bo)/b1									
detectiegrens µg/l:	**14,5**								

Bijlage 8D

Titel:	**Validatie run 2: Kalibratie curve**								
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.								
Beslissingsgrens: wel aantoonbaar of niet aantoonbaar									
Lc= b0 + t*Sb0									
t waarde enkelzijdig									
b0=asafsnede									
Sb0=standaardfout van b0									
b1	0,001493474								
b0	-0,008940631								
Sb0	0,005590272								
t									
n: aantal standaarden	8								
p: aantal parameters	2								
t(n-p)enkelzijdig	1,943								
beslissingsgrens Lc	0,00192								
bijbehorende concentratie									
Xc=(Lc-bo)/b1									
beslissinggrens µg/l:	**7,3**								

Bijlage 9A

Titel:	Validatie run 3: Kalibratie curve; Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid												
Component Name		**Curve Index**	**Weighting Index**	**Origin Index**	**Equation**								
rivaroxaban		Linear	Equal	Ignore	Y = 0.00294308+0.00303252*X		R^2 = 0.9952						
						Specified	**Calculated**						
Filename	**Sample Type**	**Integ. Type**	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**Amount**	**%Diff**	**%RSD-AMT**	**Peak Status**	**Level**	**Units**	**RT**
std111	Std Bracket Sample	Method Settings	19400	376742	0,051	20,810	16,010	-23,1%	NA	Excluded	1	ug/l	3,51
std1111	Std Bracket Sample	Method Settings	18293	381565	0,048	20,810	14,839	-28,7%	NA	Excluded	1	ug/l	3,51
std11111	Std Bracket Sample	Method Settings	20311	367317	0,055	20,810	17,264	-17,0%	1,7%	Response Low	1	ug/l	3,51
std111111	Std Bracket Sample	Method Settings	19963	369124	0,054	20,810	16,864	-19,0%	1,7%	Response Low	1	ug/l	3,49
std2	Std Bracket Sample	Method Settings	51173	365505	0,140	51,270	45,198	-11,8%	3,0%		2	ug/l	3,49
std22	Std Bracket Sample	Method Settings	50451	370588	0,136	51,270	43,922	-14,3%	3,0%		2	ug/l	3,49
std222	Std Bracket Sample	Method Settings	53066	378318	0,140	51,270	45,285	-11,7%	3,0%		2	ug/l	3,49
std2222	Std Bracket Sample	Method Settings	53068	363486	0,146	51,270	47,173	-8,0%	3,0%		2	ug/l	3,49
std3	Std Bracket Sample	Method Settings	96520	353892	0,273	100,100	88,967	-11,1%	7,5%		3	ug/l	3,51
std33	Std Bracket Sample	Method Settings	102824	362929	0,283	100,100	92,456	-7,6%	7,5%		3	ug/l	3,49
std333	Std Bracket Sample	Method Settings	104662	355203	0,295	100,100	96,194	-3,9%	7,5%		3	ug/l	3,49
std3333	Std Bracket Sample	Method Settings	106006	327769	0,323	100,100	105,679	5,6%	7,5%		3	ug/l	3,49
std4	Std Bracket Sample	Method Settings	141830	345440	0,411	146,650	134,422	-8,3%	4,4%		4	ug/l	3,51
std44	Std Bracket Sample	Method Settings	149574	335568	0,446	146,650	146,015	-0,4%	4,4%		4	ug/l	3,49
std444	Std Bracket Sample	Method Settings	149945	329700	0,455	146,650	149,001	1,6%	4,4%		4	ug/l	3,49
std4444	Std Bracket Sample	Method Settings	151105	340988	0,443	146,650	145,159	-1,0%	4,4%		4	ug/l	3,49
std5	Std Bracket Sample	Method Settings	184722	313970	0,588	191,090	193,041	1,0%	3,1%		5	ug/l	3,49
std55	Std Bracket Sample	Method Settings	198841	315686	0,630	191,090	206,735	8,2%	3,1%		5	ug/l	3,49
std555	Std Bracket Sample	Method Settings	193971	310114	0,625	191,090	205,289	7,4%	3,1%		5	ug/l	3,49
std5555	Std Bracket Sample	Method Settings	194952	315253	0,618	191,090	202,952	6,2%	3,1%		5	ug/l	3,49
std6	Std Bracket Sample	Method Settings	277438	314096	0,883	274,170	290,302	5,9%	3,0%		6	ug/l	3,49
std66	Std Bracket Sample	Method Settings	258062	308873	0,835	274,170	274,542	0,1%	3,0%		6	ug/l	3,49
std666	Std Bracket Sample	Method Settings	263360	294161	0,895	274,170	294,260	7,3%	3,0%		6	ug/l	3,49
std6666	Std Bracket Sample	Method Settings	262652	304171	0,864	274,170	283,777	3,5%	3,0%		6	ug/l	3,49
std7	Std Bracket Sample	Method Settings	348184	312660	1,114	382,180	366,255	-4,2%	3,4%		7	ug/l	3,49
std77	Std Bracket Sample	Method Settings	339027	292843	1,158	382,180	380,795	-0,4%	3,4%		7	ug/l	3,49
std777	Std Bracket Sample	Method Settings	337821	279364	1,209	382,180	397,792	4,1%	3,4%		7	ug/l	3,49
std7777	Std Bracket Sample	Method Settings	343049	294592	1,164	382,180	383,031	0,2%	3,4%		7	ug/l	3,49

Bijlage 9A

Titel:	Validatie run 3: Kalibratie curve; Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid												
						Specified	Calculated						
Filename	**Sample Type**	**Integ. Type**	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Amount**	**Amount**	**%Diff**	**%RSD-AMT**	**Peak Status**	**Level**	**Units**	**RT**
std8	Std Bracket Sample	Method Settings	464623	290381	1,600	548,350	526,659	-4,0%	NA	Excluded	8	ug/l	3,49
std88	Std Bracket Sample	Method Settings	463841	293096	1,583	548,350	520,892	-5,0%	NA	Excluded	8	ug/l	3,49
std888	Std Bracket Sample	Method Settings	458613	286631	1,600	548,350	526,648	-4,0%	1,9%		8	ug/l	3,49
std8888	Std Bracket Sample	Method Settings	463712	282069	1,644	548,350	541,143	-1,3%	1,9%		8	ug/l	3,51
qc1	QC Sample	Method Settings	18171	292250	0,062	19,970	19,532	-2,2%	4,1%	Response Low	QC1	ug/l	3,51
qc11	QC Sample	Method Settings	17082	283400	0,060	19,970	18,906	-5,3%	4,1%	Response Low	QC1	ug/l	3,49
qc111	QC Sample	Method Settings	16685	281287	0,059	19,970	18,590	-6,9%	4,1%	Response Low	QC1	ug/l	3,51
qc1111	QC Sample	Method Settings	17603	278948	0,063	19,970	19,839	-0,7%	4,1%	Response Low	QC1	ug/l	3,51
qc11111	QC Sample	Method Settings	17455	284732	0,061	19,970	19,245	-3,6%	4,1%	Response Low	QC1	ug/l	3,51
qc111111	QC Sample	Method Settings	17229	268790	0,064	19,970	20,166	1,0%	4,1%	Response Low	QC1	ug/l	3,49
qc2	QC Sample	Method Settings	163996	274983	0,596	199,700	195,693	-2,0%	2,5%		QC2	ug/l	3,49
qc22	QC Sample	Method Settings	165146	260550	0,634	199,700	208,043	4,2%	2,5%		QC2	ug/l	3,49
qc222	QC Sample	Method Settings	161850	270945	0,597	199,700	196,012	-1,8%	2,5%		QC2	ug/l	3,49
qc2222	QC Sample	Method Settings	164624	268253	0,614	199,700	201,400	0,9%	2,5%		QC2	ug/l	3,49
qc22222	QC Sample	Method Settings	154950	260232	0,595	199,700	195,378	-2,2%	2,5%		QC2	ug/l	3,49
qc222222	QC Sample	Method Settings	163672	267602	0,612	199,700	200,719	0,5%	2,5%		QC2	ug/l	3,49
qc3	QC Sample	Method Settings	332244	278109	1,195	399,400	392,978	-1,6%	3,0%		QC3	ug/l	3,49
qc33	QC Sample	Method Settings	311617	259070	1,203	399,400	395,674	-0,9%	3,0%		QC3	ug/l	3,51
qc333	QC Sample	Method Settings	316659	256483	1,235	399,400	406,157	1,7%	3,0%		QC3	ug/l	3,51
qc3333	QC Sample	Method Settings	306741	266962	1,149	399,400	377,924	-5,4%	3,0%		QC3	ug/l	3,51
qc33333	QC Sample	Method Settings	313549	257575	1,217	399,400	400,451	0,3%	3,0%		QC3	ug/l	3,51
qc333333	QC Sample	Method Settings	311963	248420	1,256	399,400	413,138	3,4%	3,0%		QC3	ug/l	3,51
blanco1	Blank Sample	Method Settings	0	0	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,92
blanco2	Blank Sample	Method Settings	0	0	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,06
blanco3	Blank Sample	Method Settings	0	0	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,99
blanco4	Blank Sample	Method Settings	0	0	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,09
blanco5	Blank Sample	Method Settings	0	0	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,67
blanco6	Blank Sample	Method Settings	0	0	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,26
zero1	Blank Sample	Method Settings	0	254074	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,18
zero2	Blank Sample	Method Settings	0	245770	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,23
zero3	Blank Sample	Method Settings	0	250221	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,67
zero4	Blank Sample	Method Settings	0	249563	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,95
zero5	Blank Sample	Method Settings	0	250938	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,18
zero6	Blank Sample	Method Settings	0	260889	0,000	NA	NA	NA	NA		NA	ug/l	3,31

Bijlage 9B

Titel:	**Validatie run 3: Kalibratie curve**					
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.					
Gegevensanalyse \ regressie						
X-waarden:	Specified amount					
Y-Waarden	Area ratio rivaroxaban / disopyramide (ISTD)					
SAMENVATTING UITVOER						
Gegevens voor de regressie						
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,997573894					
R-kwadraat	**0,995153674**					
Aangepaste kleinste kwadraat	0,994967277					
Standaardfout	0,032181833					
Waarnemingen	28					
Variantie-analyse						
	Vrijheidsgraden	*Kwadratensom*	*Gemiddelde kwadraten*	*F*	*Significantie F*	
Regressie	1	5,529328955	5,529328955	5338,888882	1,26364E-31	
Storing	26	0,026927429	0,00103567			
Totaal	27	5,556256385				
	Coëfficiënten	*Standaardfout*	*T- statistische gegevens*	*P-waarde*	*Laagste 95%*	*Hoogste 95%*
Snijpunt	**0,002943082**	0,010434369	0,282056585	0,780133157	**-0,018505069**	**0,024391234**
Variabele X 1	**0,003032515**	4,15028E-05	73,06770068	1,26364E-31	0,002947205	0,003117825

Bijlage 9C

Titel:	Validatie run 3: Kalibratie curve						
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.						
Detectiegrens: kwantificeerbaar vanaf detectie grens.							
Ld= b0 + 2t*Sb0							
t w aarde enkelzijdig							
b0=asafsnede							
Sb0=standaarddeviatie van b0							
b1	0,003032515						
b0	0,002943082						
Sb0	0,010434369						
t							
n: aantal standaarden	8						
p: aantal parameters	2						
t(n-p)enkelzijdig	1,9432						
detectiegrens Ld	0,0435						
bijbehorende concentratie							
Xd=(Ld-bo)/b1							
detectiegrens µg/l:	**13,4**						

Bijlage 9D

Titel:	**Validatie run 3: Kalibratie curve**								
	Juistheid; Herhaalbaarheid; Reproduceerbaarheid.								
Beslissingsgrens: wel aantoonbaar of niet aantoonbaar									
Lc= b0 + t*Sb0									
t w aarde enkelzijdig									
b0=asafsnede									
Sb0=standaarddeviatie van b0									
b1	0,003032515								
b0	0,002943082								
Sb0	0,010434369								
t									
n: aantal standaarden	8								
p: aantal parameters	2								
t(n-p)enkelzijdig	1,943								
beslissingsgrens Lc	0,0232								
bijbehorende concentratie									
Xc=(Lc-bo)/b1									
beslissinggrens µg/l:	**6,7**								

Bijlage 10

Titel: Juistheid

Gegevens QC´s (Juistheid dag 1)					
QC	nominaal gehalte µg/l	herhaling nr	gehalte µg/l	afwijking tov nominale waarde (%)	voldoet ja / nee
laag	21,75	1	26,14	20,2	
		2	22,12	1,7	
		3	22,45	3,2	
		4	22,51	3,5	
		5	22,70	4,4	
		6	23,85	9,6	
		gemiddelde (Xgem)	23,29	7,10	ja
midden	217,5	1	199,85	-8,1	
		2	212,77	-2,2	
		3	211,12	-2,9	
		4	218,74	0,6	
		5	206,63	-5,0	
		6	211,21	-2,9	
		gemiddelde (Xgem)	210,05	-3,42	ja
hoog	435	1	390,78	-10,2	
		2	414,70	-4,7	
		3	394,83	-9,2	
		4	383,69	-11,8	
		5	397,34	-8,7	
		6	385,11	-11,5	
		gemiddelde (Xgem)	394,41	-9,33	ja

JUISTHEID QC LAAG:	VOLDOET
JUISTHEID QC MIDDEN:	VOLDOET
JUISTHEID QC HOOG:	VOLDOET

Gegevens QC´s (Juistheid dag 2)					
QC	nominaal gehalte µg/l	herhaling nr	gehalte µg/l	afwijking tov nominale waarde (%)	voldoet ja / nee
laag	21,75	1	25,60	17,7	
		2	24,24	11,4	
		3	32,95	51,5	
		4	25,35	16,5	
		5	24,63	13,2	
		6	24,39	12,1	
		gemiddelde (Xgem	26,19	20,42	ja
midden	217,5	1	212,47	-2,3	
		2	216,11	-0,6	
		3	219,74	1,0	
		4	215,38	-1,0	
		5	199,21	-8,4	
		6	214,49	-1,4	
		gemiddelde (Xgem	212,90	-2,11	ja
hoog	435	1	441,70	1,5	
		2	386,38	-11,2	
		3	427,61	-1,7	
		4	415,34	-4,5	
		5	417,66	-4,0	
		6	377,16	-13,3	
		gemiddelde (Xgem	410,98	-5,52	ja

JUISTHEID QC LAAG:	VOLDOET
JUISTHEID QC MIDDEN:	VOLDOET
JUISTHEID QC HOOG:	VOLDOET

Gegevens QC´s (Juistheid dag 3)					
QC	nominaal gehalte µg/l	herhaling nr	gehalte µg/l	afwijking tov nominale waarde (%)	voldoet ja / nee
laag	19,97	1	19,53	-10,2	
		2	18,91	-13,1	
		3	18,59	-14,5	
		4	19,84	-8,8	
		5	19,25	-11,5	
		6	20,17	-7,3	
		gemiddelde (Xgem	19,38	-10,90	ja
midden	199,7	1	195,69	-10,0	
		2	208,04	-4,3	
		3	196,01	-9,9	
		4	201,40	-7,4	
		5	195,38	-10,2	
		6	200,72	-7,7	
		gemiddelde (Xgem	199,54	-8,26	ja
hoog	399,4	1	392,98	-9,7	
		2	395,67	-9,0	
		3	406,16	-6,6	
		4	377,92	-13,1	
		5	400,45	-7,9	
		6	413,14	-5,0	
		gemiddelde (Xgem	397,72	-8,57	ja

JUISTHEID QC LAAG:	VOLDOET
JUISTHEID QC MIDDEN:	VOLDOET
JUISTHEID QC HOOG:	VOLDOET

Bijlage 11

Titel: Herhaalbaarheid

Aantal analisten	2	
Aantal dagen	10	

Gegevens QC´s (Precisie-herhaalbaardheid)				
QC	Run	Meting	gemeten gehalte µg/l	voldoet ja / nee
laag	1	1	26,14	
		2	22,12	
		3	22,45	
		4	22,51	
		5	22,70	
		6	23,85	
		Xgem	23,29	
		s	1,5125	
		CV (%)	6,49	JA
	2	1	25,60	
		2	24,24	
		3	32,95	
		4	25,35	
		5	24,63	
		6	24,39	
		Xgem	26,19	
		s	3,3534	
		CV (%)	12,80	JA
	3	1	19,53	
		2	18,91	
		3	18,59	
		4	19,84	
		5	19,25	
		6	20,17	
		Xgem	19,38	
		s	0,5864	
		CV (%)	3,03	JA

Gegevens QC´s (Precisie-herhaalbaardheid)				
QC	Run	Meting	gemeten gehalte µg/l	voldoet ja / nee
midden	1	1	199,85	
		2	212,77	
		3	211,12	
		4	218,74	
		5	206,63	
		6	211,21	
		Xgem	210,05	
		s	6,3407	
		CV (%)	3,02	JA
	2	1	212,47	
		2	216,11	
		3	219,74	
		4	215,38	
		5	199,21	
		6	214,49	
		Xgem	212,90	
		s	7,1166	
		CV (%)	3,34	JA
	3	1	195,69	
		2	208,04	
		3	196,01	
		4	201,40	
		5	195,38	
		6	200,72	
		Xgem	199,54	
		s	4,9337	
		CV (%)	2,47	JA

Gegevens QC´s (Precisie-herhaalbaardheid)				
QC	Run	Meting	gemeten gehalte µg/l	voldoet ja / nee
hoog	1	1	390,78	
		2	414,70	
		3	394,83	
		4	383,69	
		5	397,34	
		6	385,11	
		Xgem	394,41	
		s	11,2700	
		CV (%)	2,86	JA
	2	1	441,70	
		2	386,38	
		3	427,61	
		4	415,34	
		5	417,66	
		6	377,16	
		Xgem	410,98	
		s	24,6306	
		CV (%)	5,99	JA
	3	1	392,98	
		2	395,67	
		3	406,16	
		4	377,92	
		5	400,45	
		6	413,14	
		Xgem	397,72	
		s	12,1235	
		CV (%)	3,05	JA

Bijlage 12

Titel: Reproduceerbaarheid

Gegevens QC´s (Precisie-reproduceerbaarheid)						
QC	Run	Meting	gemeten gehalte µg/l	factor	gecorr. gehalte µg/l	voldoet ja / nee
laag	1	1	26,14	1,00	26,14	
		2	22,12	1,00	22,12	
		3	22,45	1,00	22,45	
		4	22,51	1,00	22,51	
		5	22,70	1,00	22,70	
		6	23,85	1,00	23,85	
	2	1	25,60	1,00	25,60	
		2	24,24	1,00	24,24	
		3	32,95	1,00	32,95	
		4	25,35	1,00	25,35	
		5	24,63	1,00	24,63	
		6	24,39	1,00	24,39	
	3	1	19,53	1,09	21,27	
		2	18,91	1,09	20,59	
		3	18,59	1,09	20,25	
		4	19,84	1,09	21,61	
		5	19,25	1,09	20,96	
		6	20,17	1,09	21,96	
		Xgem			23,53	
		s			2,9484	
		CV (%)			12,53	JA

Gegevens QC´s (Precisie-reproduceerbaarheid)						
QC	Run	Meting	emeten gehalt µg/l	factor	gecorr. gehalte µg/l	voldoet ja / nee
midden	1	1	199,85	1,00	199,85	
		2	212,77	1,00	212,77	
		3	211,12	1,00	211,12	
		4	218,74	1,00	218,74	
		5	206,63	1,00	206,63	
		6	211,21	1,00	211,21	
	2	1	212,47	1,00	212,47	
		2	216,11	1,00	216,11	
		3	219,74	1,00	219,74	
		4	215,38	1,00	215,38	
		5	199,21	1,00	199,21	
		6	214,49	1,00	214,49	
	3	1	195,69	1,09	213,14	
		2	208,04	1,09	226,59	
		3	196,01	1,09	213,48	
		4	201,40	1,09	219,35	
		5	195,38	1,09	212,79	
		6	200,72	1,09	218,61	
		Xgem			213,43	
		s			6,6854	
		CV (%)			3,13	JA

Gegevens QC´s (Precisie-reproduceerbaarheid)						
QC	Run	Meting	gemeten gehalte µg/l	factor	gecorr. gehalte µg/l	voldoet ja / nee
hoog	1	1	390,78	1,00	390,78	
		2	414,70	1,00	414,70	
		3	394,83	1,00	394,83	
		4	383,69	1,00	383,69	
		5	397,34	1,00	397,34	
		6	385,11	1,00	385,11	
	2	1	441,70	1,00	441,70	
		2	386,38	1,00	386,38	
		3	427,61	1,00	427,61	
		4	415,34	1,00	415,34	
		5	417,66	1,00	417,66	
		6	377,16	1,00	377,16	
	3	1	392,98	1,09	428,01	
		2	395,67	1,09	430,94	
		3	406,16	1,09	442,36	
		4	377,92	1,09	411,61	
		5	400,45	1,09	436,14	
		6	413,14	1,09	449,96	
		Xgem			412,85	
		s			23,1106	
		CV (%)			5,60	JA

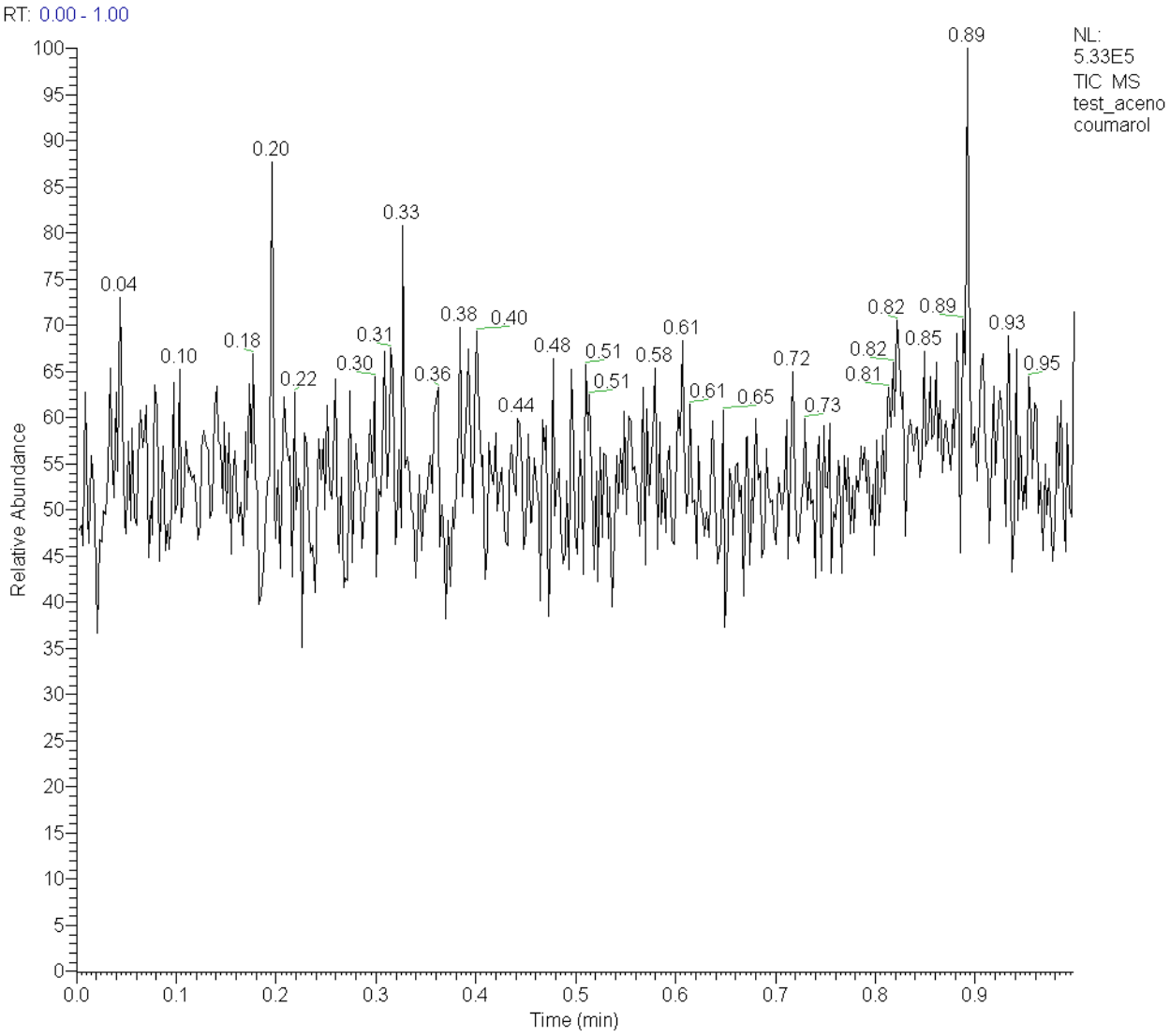
De factor corrigeerd voor de verschillende inwegen. De factor rekent terug naar de inweeg van de eerste validatie run.
De eerste en tweede validatie run zijn met dezelfde inweeg voor de QC monsters gedaan.

Bijlage 13

Titel:	**Matrix effect en extractie recovery rivaroxaban.**						
	patient			**matrix effect (%)**	**matrix effect (%)**	**extractie recovery (%)**	**extractie recovery (%)**
		area ratio (20,81 µg/l)	area ratio (350,33 µg/l)	laag individueel	hoog individueel	laag individueel	hoog individueel
academische standaard (A)		0,0603	1,3614				
		0,0584	1,3113				
		0,0614	1,3874				
		0,0714	1,3914				
gemiddeld		0,0629	1,3629				
RSD%		9,3	2,7				
matrix, gespiked na extractie (B)	1	0,0714	1,4441	113,5	106,0		
	1	0,0623	1,4775	99,2	108,4		
	2	0,0702	1,3785	111,7	101,1		
	2	0,0739	1,4576	117,5	107,0		
	3	0,0676	1,4502	107,5	106,4		
	3	0,0723	1,3241	115,0	97,2		
	4	0,0728	1,4069	115,8	103,2		
	4	0,0718	1,3694	114,1	100,5		
	5	0,0655	1,4406	104,1	105,7		
	5	0,0670	1,3662	106,5	100,2		
	6	0,0619	1,4197	98,5	104,2		
	6	0,0751	1,4678	119,4	107,7		
gemiddeld		0,0693	1,417	110,2	104,0		
RSD%		6,3	3,4	**6,3**	**3,4**		
Matrix, gespiked voor extractie ('C)	1	0,0560	1,1969			78,5	82,9
	1	0,0575	1,2188			92,2	82,5
	2	0,0540	1,2345			76,9	89,6
	2	0,0540	1,1883			73,0	81,5
	3	0,0592	1,1739			87,5	80,9
	3	0,0590	1,2251			81,6	92,5
	4	0,0498	0,9178			68,4	65,2
	4	0,0592	1,1685			82,5	85,3
	5	0,0624	1,0308			95,3	71,6
	5	0,0559	1,2114			83,5	88,7
	6	0,0534	1,1797			86,2	83,1
	6	0,0534	1,2418			71,2	84,6
gemiddeld		0,0561	1,1656			**81,4**	**82,4**
RSD%		6,2	8,2			**10**	**9**
BI						**18**	**17**
Matrix effect ((B/A*100%)							
Extractie recovery (C/B*100%)							
Betrouwbaarheid interval (X ± t*s)							

Bijlage 14

Titel: Selectiviteit acenocoumarol



Bijlage 15

Titel:	**Methodevergelijk juistheid LC-MS/MS vs CS2100i (chromogene methode)**		
Verdunningsschema gespikte monsters			
Stam A: 14ml pooled plasma + 0,035 ml rivaroxaban stock A			
Stam B: 14ml pooled plasma + 0,035 ml methanol			
Bereiding stockoplossing A:			
2,062 mg rivaroxaban in 10,0 ml methanol.			
Concentratie stam A:	515,5 µg/l		
verdunningsschema			
monster nummer	µl stamoplossing A	µl stamoplossing B	concentratie rivaroxaban µg/l
1	1500	0	515,5
2	1400	100	481,1
3	1300	200	446,8
4	1200	300	412,4
5	1100	400	378,0
6	1000	500	343,7
7	900	600	309,3
8	800	700	274,9
9	700	800	240,6
10	600	900	206,2
11	500	1000	171,8
12	400	1100	137,5
13	300	1200	103,1
14	200	1300	68,7
15	100	1400	34,4
16	50	1450	17,2
17	0	1500	0,0

monster nummer	monster
18	Pooled plasma (zonder methanol)
19	patiënt 112378836301
20	patiënt 112401567001
21	patiënt 113058057911
22	patiënt 113058057916

Bijlage 16

Titel: **Kalibratie curve LC-MS/MS methodevergelijk**

Component Name		Curve Index	Weighting Index	Origin Index	Equation							
rivaroxaban		Quadratic	Equal	Ignore	Y = -0.00695948+0.00432887*X-1.04328e-006*X^2 R^2 = 0.9996							
Filename	**Sample Type**	**Integ. Type**	**Area**	**ISTD Area**	**Area Ratio**	**Specified Amount**	**Calculated Amount**	**%Diff**	**Peak Status**	**Level**	**Units**	**RT**
std1	Std Bracket Sample	Method Settings	21397	280327	0,076	19,910	19,330	-3%	Response Low	1	ug/l	3,52
std11	Std Bracket Sample	Method Settings	23803	284110	0,084	19,910	21,068	6%		1	ug/l	3,51
std111	Std Bracket Sample	Method Settings	21440	285464	0,075	19,910	19,045	-4%	Response Low	1	ug/l	3,49
std2	Std Bracket Sample	Method Settings	57757	296177	0,195	49,050	47,193	-4%		2	ug/l	3,49
std3	Std Bracket Sample	Method Settings	114806	286039	0,401	95,760	96,574	1%		3	ug/l	3,49
std4	Std Bracket Sample	Method Settings	167896	291199	0,577	140,300	139,489	-1%		4	ug/l	3,49
std5	Std Bracket Sample	Method Settings	216191	278128	0,777	182,300	189,858	4%		5	ug/l	3,49
std6	Std Bracket Sample	Method Settings	296374	286234	1,035	262,300	256,677	-2%		6	ug/l	3,49
std7	Std Bracket Sample	Method Settings	413921	288721	1,434	365,640	364,873	0%		7	ug/l	3,47
std8	Std Bracket Sample	Method Settings	569729	287723	1,980	524,610	525,615	0%	Response High	8	ug/l	3,49
qc1	QC Sample	Method Settings	26077	305829	0,085	20,790	21,415	3%		QC1	ug/l	3,49
qc11	QC Sample	Method Settings	26994	304846	0,089	20,790	22,182	7%		QC1	ug/l	3,51
qc2	QC Sample	Method Settings	239653	311466	0,769	207,900	187,858	-10%		QC2	ug/l	3,51
qc22	QC Sample	Method Settings	244376	305149	0,801	207,900	195,852	-6%		QC2	ug/l	3,51
qc3	QC Sample	Method Settings	455550	300215	1,517	411,680	388,519	-6%		QC3	ug/l	3,49
qc33	QC Sample	Method Settings	464978	292959	1,587	411,680	408,467	-1%		QC3	ug/l	3,49
blanco(zero)	Blank Sample	Manual Integration	NF	300589	NF	NA	NF	NF	Not Found	NA	ug/l	NF
Melkert1124015670	Unknown Sample	Method Settings	251133	308841	0,813	NA	198,993	NA		NA	ug/l	3,49
Ombre113058057911	Unknown Sample	Method Settings	126497	312610	0,405	NA	97,369	NA		NA	ug/l	3,49
Ombre113058057916	Unknown Sample	Method Settings	120352	311081	0,387	NA	93,068	NA		NA	ug/l	3,51
spike1	Unknown Sample	Method Settings	547801	307259	1,783	515,500	465,738	-10%		NA	ug/l	3,49
spike10	Unknown Sample	Method Settings	231510	298647	0,775	206,200	189,322	-8%		NA	ug/l	3,49
spike11	Unknown Sample	Method Settings	190567	295975	0,644	171,833	156,227	-9%		NA	ug/l	3,49
spike12	Unknown Sample	Method Settings	156399	305171	0,512	137,467	123,685	-10%		NA	ug/l	3,51
spike13	Unknown Sample	Method Settings	119087	315089	0,378	103,100	90,908	-12%		NA	ug/l	3,49
spike14	Unknown Sample	Method Settings	83412	303553	0,275	68,733	66,139	-4%		NA	ug/l	3,49
spike15	Unknown Sample	Method Settings	39386	307779	0,128	34,367	31,407	-9%		NA	ug/l	3,51
spike16	Unknown Sample	Method Settings	20516	291956	0,070	17,183	17,918	4%	Response Low	NA	ug/l	3,51
spike17	Unknown Sample	Manual Integration	NF	302775	NF	0,000	NF		Not Found	NA	ug/l	NF
spike18	Unknown Sample	Manual Integration	NF	317924	NF	0,000	NF		Not Found	NA	ug/l	NF
spike2	Unknown Sample	Method Settings	508167	316560	1,605	481,133	413,683	-14%		NA	ug/l	3,49
spike3	Unknown Sample	Method Settings	489336	311259	1,572	446,767	404,141	-10%		NA	ug/l	3,49
spike4	Unknown Sample	Method Settings	435189	309186	1,408	412,400	357,572	-13%		NA	ug/l	3,47
spike5	Unknown Sample	Method Settings	389535	305551	1,275	378,033	320,933	-15%		NA	ug/l	3,49
spike6	Unknown Sample	Method Settings	377608	308185	1,225	343,667	307,431	-11%		NA	ug/l	3,49
spike7	Unknown Sample	Method Settings	333038	292975	1,137	309,300	283,586	-8%		NA	ug/l	3,47
spike8	Unknown Sample	Method Settings	295861	306869	0,964	274,933	237,977	-13%		NA	ug/l	3,49
spike9	Unknown Sample	Method Settings	266581	305584	0,872	240,567	214,187	-11%		NA	ug/l	3,49
SteeinzVogels1123788363	Unknown Sample	Method Settings	166985	308044	0,542	NA	130,966	NA		NA	ug/l	3,49

Bijlage 16

Titel:	**Kalibratie curve LC-MS/MS methodevergelijk**					
Gegevensanalyse \ regressie						
X-waarden:	Specified amount					
Y-waarden:	Area ratio					
SAMENVATTING UITVOER						
Gegevens voor de regressie						
Meervoudige correlatiecoëfficiënt R	0,999804364					
R-kwadraat	0,999608766					
Aangepaste kleinste kwadraat	0,999496985					
Standaardfout	0,014574774					
Waarnemingen	10					
Variantie-analyse						
	Vrijheidsgraden	*Kwadratensom*	*Gemiddelde kwadraten*	*F*	*Significantie F*	
Regressie	2	3,799229206	1,899614603	8942,559061	1,18448E-12	
Storing	7	0,001486968	0,000212424			
Totaal	9	3,800716174				
	Coëfficiënten	*Standaardfout*	*T- statistische gegevens*	*P-waarde*	*Laagste 95%*	*Hoogste 95%*
Snijpunt	-0,006959479	0,008667061	-0,802980207	0,448387584	-0,027453822	0,013534865
Variabele X 1	0,00432887	9,90077E-05	43,72257047	8,54863E-10	0,004094754	0,004562986
Variabele X 2	-1,04328E-06	1,90721E-07	-5,470187797	0,000935674	-1,49426E-06	-5,92296E-07

Bijlage 16

Titel:	Kalibratie curve LC-MS/MS methodevergelijk				
Kalibratie curve					
Detectiegrens: kwantificeerbaar vanaf detectie grens.					
Detectie grens					
Ld= b0 + 2t*Sb0					
t w aarde enkelzijdig					
b0=asafsnede					
Sb0=standaardfout van b0					
b2	-1,04328E-06				
b1	0,00432887				
b0	-0,006959479				
Sb0	0,008667061				
t					
n: aantal standaarden	8				
p: aantal parameters	3				
t(n-p)enkelzijdig	2,015				
detectiegrens Ld	0,02797				
bijbehorende concentratie					
D = b1²-4*b2*(b0-Ld)	1,85934E-05				
Xd = -b1+√D/2*b2	8,084624107				
Xd = -b1-√D/2*b2	4141,209793				
detectiegrens µg/l:	**8,1**				

Bijlage 16

Titel:	Kalibratie curve LC-MS/MS methodevergelijk				
Kalibratie curve					
Beslissingsgrens: wel aantoonbaar of niet aantoonbaar					
beslissingsgrens					
Lc= b0 + t*Sb0					
t waarde enkelzijdig					
b0=asafsnede					
Sb0=standaardfout van b0					
b2	-1,04328E-06				
b1	0,00432887				
b0	-0,006959479				
Sb0	0,008667061				
t					
n: aantal standaarden	8				
p: aantal parameters	3				
t(n-p)enkelzijdig	2,015				
beslissingsgrens Lc	0,01051				
bijbehorende concentratie					
D = b1²-4*b2*(b0-Lc)	1,86662E-05				
Xc = -b1+√D/2*b2	4,038366281				
Xc = -b1-√D/2*b2	4145,25605				
beslissingsgrens µg/l:	**4,0**				

Bijlage 17

Titel:	resultaten metingen LC-MS/MS en CS2100i			
	theoretische	LC-MS/MS	CS2100i	Verschil %
	concentratie	concentratie	concentratie	LC-MS/MS en CS2100i
monster nummer	rivaroxaban µg/l	rivaroxaban µg/l	rivaroxaban µg/l	
patiënt		199	261	31
patiënt		97	178	83
patiënt		93	115	23
patiënt		131	118	10
1	515,5	466	503	8
2	481,1	414	465	12
3	446,8	404	423	5
4	412,4	358	396	11
5	378,0	321	356	11
6	343,7	307	337	10
7	309,3	284	307	8
8	274,9	238	275	16
9	240,6	214	243	13
10	206,2	189	213	13
11	171,8	156	184	18
12	137,5	124	153	24
13	103,1	91	112	23
14	68,7	66	77	16
15	34,4	31	35	11
16	17,2	18	21	17
17	0	0	1	
18	0	0	11	

Bijlage 18A

18-4-2013 10:59:19

Orthogonal Regression Analysis: LC-MS/MS versus CS2100i

Gespiked plasma

Regression Equation
Y = 10,18 + 1,070 X

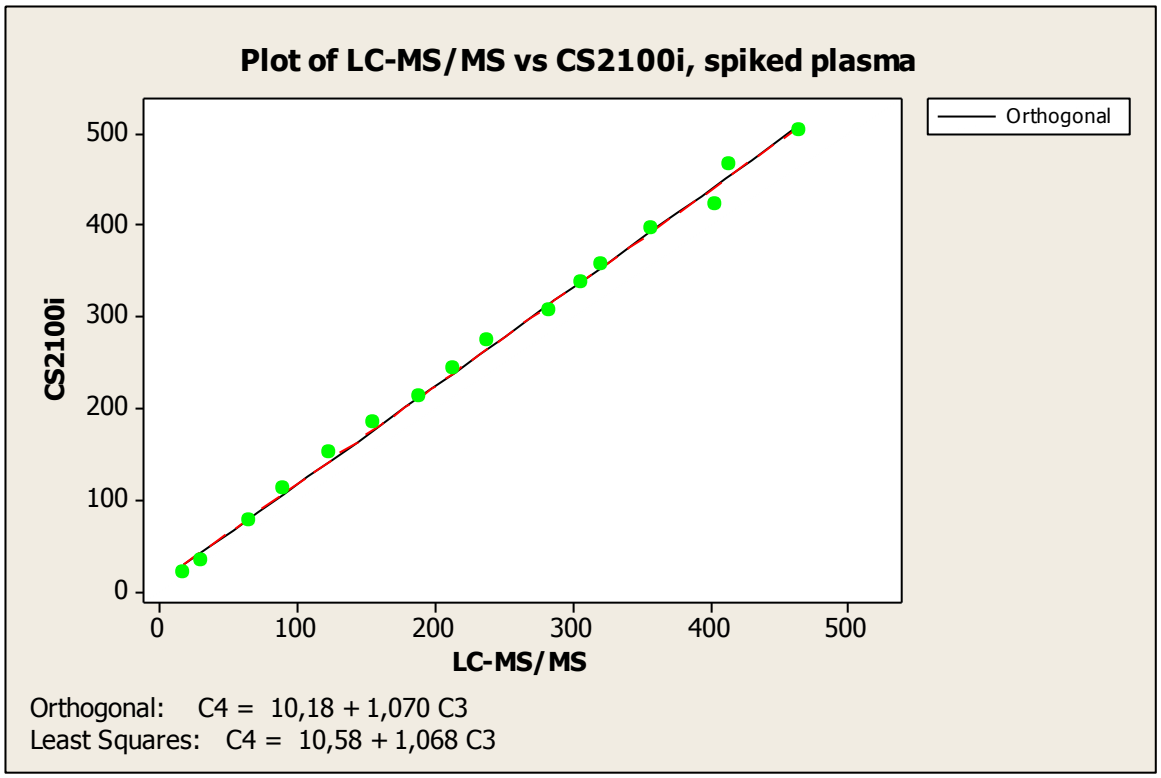
Coefficients

Predictor	Coef	SE Coef	Z	P	Approx 95% CI
Constant	10,17695	4,24571	2,3970	0,017	(1,85550; 18,4984)
X	1,06959	0,01584	67,5078	0,000	(1,03854; 1,1006)

Fitted Values and Residuals

Obs	LC-MS/MS	Fit	CS2100i	Fit	Residuals	St Resid
1	466	463,203	503	505,615	-5,6069	-0,66648
2	414	419,992	465	459,398	12,0119	1,42783
3	404	394,376	423	431,998	-19,2922	-2,29322
4	358	359,451	396	394,643	2,9090	0,34579
5	321	322,239	356	354,841	2,4840	0,29526
6	307	306,231	337	337,719	-1,5417	-0,18326
7	284	280,537	307	310,237	-6,9411	-0,82508
8	238	243,118	275	270,215	10,2601	1,21960
9	214	215,961	243	241,167	3,9303	0,46719
10	189	189,334	213	212,687	0,6701	0,07966
11	156	159,475	184	180,751	6,9667	0,82811
12	124	129,085	153	148,246	10,1936	1,21169
13	91	93,240	112	109,906	4,4902	0,53374
14	66	64,119	77	78,758	-3,7700	-0,44814
15	31	26,842	35	38,887	-8,3343	-0,99068
16	18	13,795	21	24,932	-8,4296	-1,00201

Bijlage 18A


Plot of LC-MS/MS vs CS2100i, spiked plasma
Orthogonal
CS2100i
LC-MS/MS
0
100
200
300
400
500
Orthogonal: C4 = 10,18 + 1,070 C3
Least Squares: C4 = 10,58 + 1,068 C3

Bijlage 18B

18-4-2013 10:59:19

Orthogonal Regression Analysis: LC-MS/MS versus CS2100i

Gespiked plasma en patiënten monsters

Regression Equation
Y = 15,22 + 1,063 X

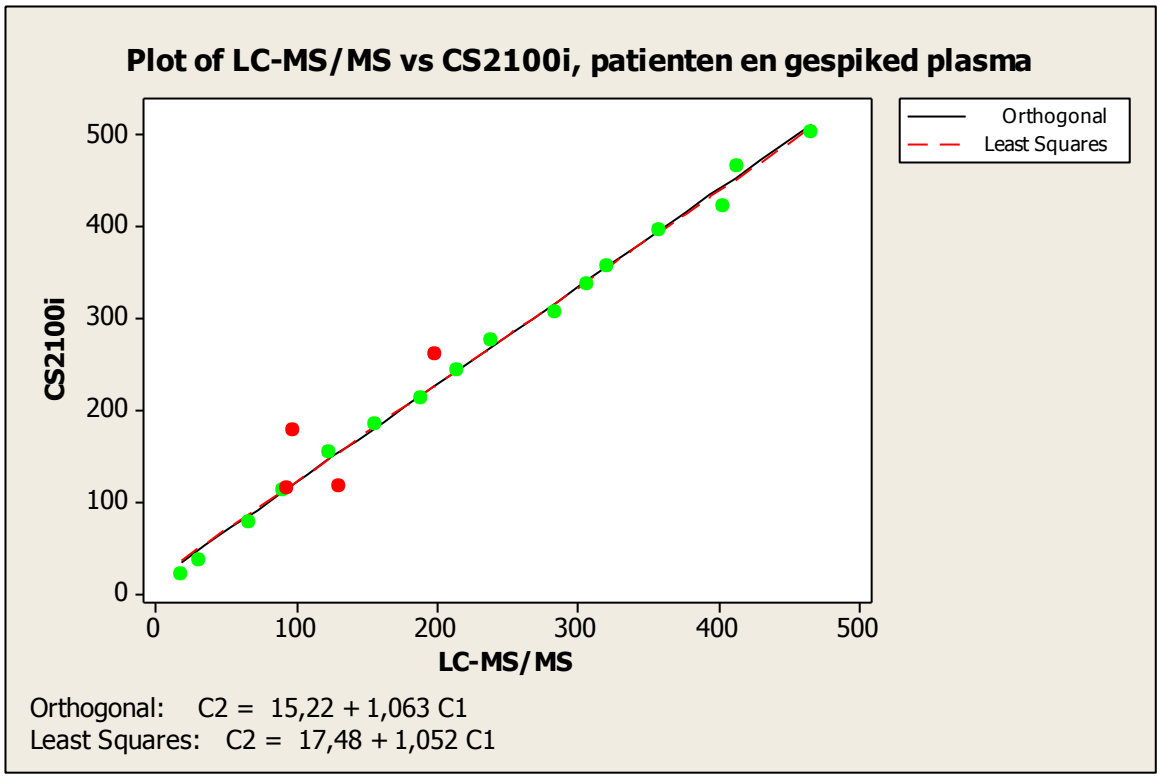
Coefficients

Predictor	Coef	SE Coef	Z	P	Approx 95% CI
Constant	15,22383	8,59602	1,7710	0,077	(-1,62407; 32,0717)
X	1,06314	0,03482	30,5326	0,000	(0,99490; 1,1314)

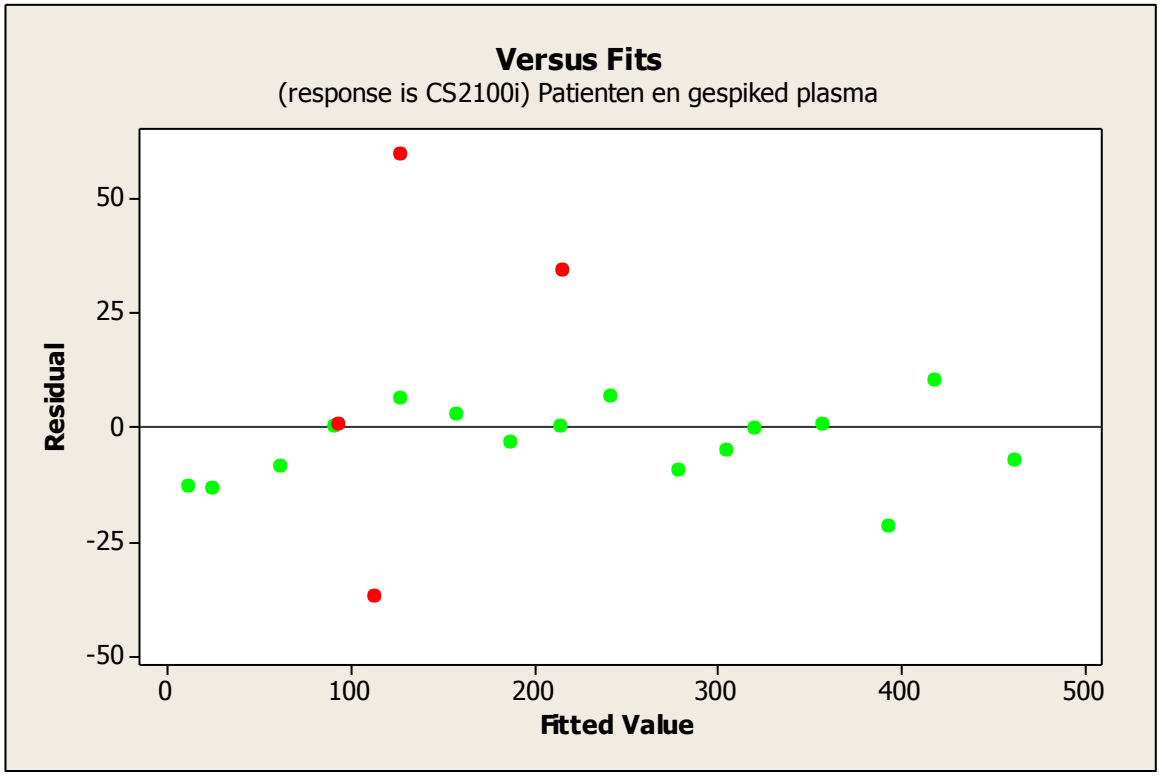
Fitted Values and Residuals

Obs	LC-MS/MS	Fit	CS2100i	Fit	Residuals	St Resid
1	198,993	216,070	261,0	244,937	34,2180	1,74081
2	97,369	126,943	178,0	150,182	59,2589	3,01473
3	93,068	93,233	114,5	114,344	0,3319	0,01689
4	130,966	112,521	117,5	134,850	-36,9593	-1,88026
5	465,738	462,060	503,0	506,459	-7,3695	-0,37492
6	413,683	418,660	465,0	460,318	9,9730	0,50737
7	404,141	393,220	423,0	433,273	-21,8834	-1,11330
8	357,572	357,885	396,0	395,706	0,6267	0,03188
9	320,933	320,723	356,0	356,198	-0,4210	-0,02142
10	307,431	304,902	337,0	339,378	-5,0660	-0,25773
11	283,586	278,737	307,0	311,561	-9,7161	-0,49430
12	237,977	241,357	275,0	271,821	6,7731	0,34458
13	214,187	214,219	243,0	242,969	0,0652	0,00332
14	189,322	187,575	213,0	214,643	-3,4999	-0,17805
15	156,227	157,567	184,0	182,740	2,6850	0,13659
16	123,685	126,820	153,0	150,051	6,2816	0,31957
17	90,908	90,972	112,0	111,940	0,1283	0,00653
18	66,139	61,878	77,0	81,009	-8,5392	-0,43442
19	31,407	24,613	35,0	41,391	-13,6141	-0,69260
20	17,918	11,294	21,0	27,231	-13,2733	-0,67526

Bijlage 18B



Orthogonal: C2 = 15,22 + 1,063 C1
Least Squares: C2 = 17,48 + 1,052 C1



Bijlage 19

Document nr

KFA 032

Titel

Rivaroxaban in plasma m.b.v. LC-MS/MS

Doel

Het bepalen van Rivaroxaban in plasma met behulp van LC-MS/MS.

Klinische relevantie
Bloedspiegelbepalingen van geneesmiddelen kunnen van belang zijn bij het vaststellen of er sprake is van overdosering dan wel onderdosering.
De klinische relevantie van bloedspiegelbepalingen is in TDM protocollen vastgelegd:
www.nvza.nl (TDM protocollen)
Bij verdenkingen op intoxicatie kunnen bloedspiegelbepalingen uitsluitsel bieden. Hierbij hanteren wij de NVIC/NVZA www.toxicologie.org protocollen als leidraad voor klinische relevantie.

Toepassingsgebied

Te bepalen componenten + eventuele metabolieten	Rivaroxaban
Analyseapparatuur	LC-MS/MS, BRO 215
Monstermateriaal	Buis natriumcitraat 0,109M BD, bepaling in plasma
Opslagcondities monster	Diepvries, -20˚C
Stabiliteit monster	Bekend na houdbaarheid onderzoek.
Stabiliteit opgewerkt monster	Bekend na houdbaarheid onderzoek.
Concentraties gebruikte standaarden	20 - 500 µg/l
Concentraties gebruikte interne QC monsters	20 – 200 – 400 µg/l
Concentratie gebruikte externe QC monsters	Nvt

Doelgroep

Dit analysevoorschrift is bestemd voor de analisten van de apotheek.

Locatie

OLVG, klinisch farmaceutisch laboratorium van de apotheek.

Verantwoordelijkheden

Verantwoordelijken	Verantwoordelijkheden
Analist	Uitvoeren van de analyse zoals beschreven in dit analysevoorschrift
Hoofdanalist	Toezien op de juiste uitvoering van de analyse

Bijlage 19

Afkortingen en definities

BRO	Bediening, Reiniging en Onderhoud
H&P	Hazard en Precaution
KFA	Klinisch Farmaceutische Analyse
LC-MS/MS	Vloeistofchromatografie met tandem massa spectrometrische detector
PR	Procedure
QC monster	Kwaliteit controle monster
WI	Werkinstructie

ARBO & Milieu

Werkplek
Naast de geldende veiligheidsmaatregelen voor het laboratorium (WI 394 Kleding en hygiëne laboratorium) zijn geen andere maatregelen noodzakelijk.

Materiaal
Werk volgens werkinstructie Omgaan met biologisch materiaal (WI 022).

Reagentia en chemicaliën

Gevaren aanduiding code (H-code)	
H225	Licht ontvlambare vloeistof en damp
H301	Giftig bij inslikken
H302	Schadelijk bij inslikken
H311	Giftig bij contact met de huid
H312	Schadelijk bij contact met de huid
H319	Veroorzaakt ernstige oogirritatie
H331	Giftig bij inademing
H332	Schadelijk bij inademing
H370	Veroorzaakt schade aan organen
Preventieve code (P-code)	
P210	Verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken. – Niet roken
P260	Stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel niet inademen
P280	Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen
P301+ P310	NA INSLIKKEN: onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen
P305+ P351+ P338	BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen
P311	Een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen

Afvalverwerking
Het afval dient te worden verwerkt conform PR 079 Afvalverwerking laboratorium.

Bijlage 19

Benodigdheden

1. Reagentia, hulpstoffen en chemicaliën

Alle benodigde reagentia, hulpstoffen en chemicaliën

Naam stof	Labnummer
Acetonitril	A9
Blanco natriumcitraat plasma	N.v.t.
Eluensbuffer pH 3.2	EB030
Neerslagvloeistof	CH063
QC monsters rivaroxaban	QC158
Stockoplossing rivaroxaban	ST158

Bereidingswijze verse reagentia en stockoplossingen

Stockoplossing Rivaroxaban (ST158)
Weeg nauwkeurig 2.0 mg Rivaroxaban af in een 100 ml maatkolf. Los op in methanol door de oplossing 15 minuten te ultrasoneren en vul aan.

ISTD Disopyramide 2.5mg/l (IS009)
Weeg 2,5 mg disopyramide af in een maatkolf van 50ml. Los op in en vul aan met methanol. Breng 5.0 ml van deze oplossing over in een maatkolf van 100 ml en vul aan met methanol.

Neerslagvloeistof CH063
Los 5 gram zinksulfaat heptahydraat op in 100ml water. Voeg 400ml methanol toe. Voeg aan het geheel 500µl 2.5mg/l disopyramide (IS009) toe.

Eluensbuffer pH 3,2 (EB030)
Vul een glazen fles van 3 liter met 3000 ml gedemineraliseerd water en voeg 2,31 gram ammoniumacetaat toe en los op. Voeg 50ml azijnzuur 100% toe en meng. De pH is nu 3,2.

Bereidingswijze standaarden

Stamoplossing 1 Rivaroxaban
Pipetteer 1000 µl stockoplossing Rivaroxaban (ST158) in een 10 ml maatkolf. Los op in, en vul aan met methanol.

Stamoplossing 2 Rivaroxaban
Pipetteer 2000 µl stockoplossing Rivaroxaban (ST158) in een 10 ml maatkolf. Los op in, en vul aan met methanol.

Standaarden Rivaroxaban
Pipetteer 10, 25, 50, 75, 100 en 150 µl stamoplossing 1 en 100 en 150 µl stamoplossing 2 in plastic reageerbuizen. Voeg aan alle buizen 1000µl blanco plasma toe. De concentraties zijn nu ongeveer 20, 49, 95, 140, 182, 261, 364, 522 µg/l.

Bereidingswijze QC monsters (QC158)

Stamoplossing 1 Rivaroxaban
Pipetteer 1000 µl stockoplossing Rivaroxaban (ST158) in een 10 ml maatkolf. Los op in, en vul aan met methanol.

Bijlage 19

QC monsters Rivaroxaban (QC158)
Pipetteer 100 µl stamoplossing 1 en 100 µl en 200 µl stockoplossing in drie aparte 10 ml maatkolven. Vul de maatkolven aan met blanco plasma. De concentraties zijn nu ongeveer 20, 200 en 400 µg/l.

Bereidingswijze blanco
De blanco bestaat uit blanco citraat plasma.

2. Apparatuur

LC-MS/MS

Injectievolume	10 µl
Kolom	Agilent Zorbax XDB-C18, 2.1*100mm, 3,5µ
Kolomtemperatuur	50° C
Methode	Rivaroxaban.met
Detector	transitie rivaroxaban : 436.1 – 144.9 m/z transitie disopyramide: 340.2– 239.0 m/z
Ionisatie	Positief

Gradiënt pomp

Tijd (min)	**Flow (ml/min)**	**% acetonitril**	**% buffer pH: 3,2**
0	0,25	30	70
4	0,25	30	70
4,1	0,25	100	0
5,1	0,4	100	0
5,5	0,4	30	70
12	0,4	30	70

Werkwijze

Uitvoering

-	Pipetteer 200 µl van de standaarden, blanco en patiëntenmonsters en QC‘s in een glazen reageerbuisje.
-	Voeg 500 µl neerslagvloeistof CH063 toe.
-	Vortex 10 seconden.
-	Laat de buizen 10 minuten staan.
-	Werk volgens BRO 103 Centrifuge.
-	Centrifugeer de oplossingen 5 minuten bij 5000 tpm.
-	Breng zo veel mogelijk van de bovenste laag over in een injectievial.
-	Werk volgens BRO 215 LC-MS/MS.
-	Injecteer de oplossingen op de LC-MS/MS
-	Injecteer de eerste oplossing 3 maal om de gradiënt in te stellen op de kolom

Berekeningen / verwerking van de resultaten
Door de methode en sequence instellingen in de gebruikte apparatuur worden standaarden, blanco’s, QC’s en samples automatisch herkend en als zodanig behandeld.

Uit de validatie bleek dat de kalibratie curve door de oorsprong ging. De functie include / force zero in de Quan Browser mag toegepast worden. De weging van de standaarden is gelijk.
Het resultatenrapport toont alle meetresultaten en een grafische weergave van de kalibratie curve. Berekeningen worden op piek oppervlakte uitgevoerd.

Bijlage 19

Kwantificering
Valt de berekende waarde tussen de laagste en hoogste standaard, dan wordt de berekende waarde gerapporteerd. Indien de berekende waarde voor het monster beneden de laagste standaard valt, tussen de 6 µg/l en 20 µg/l, wordt de waarde gerapporteerd als < 20 µg/l. Indien de berekende waarde voor het monster beneden de 6 µg/l valt, wordt de waarde als NAB (Niet Aantoonbaar) gerapporteerd.

Eisen
Minimaal 6 standaarden mogen niet meer dan ≤ 15%, ≤ 20% voor de laagste standaard, afwijken van de nominale waarde.
QC monsters mogen niet meer dan ≤ 15%, ≤ 20% voor de laagste QC, afwijken van de nominale waarde.

Opmerkingen
geen

Bijlagen en verwijzingen

Documenten zijn terug te vinden in het documentbeheer en kwaliteit systeem van het OLVG.
Reagentia zij terug te vinden in de registratie en beheer voorschriften van het OLVG.
PR 079 Afvalverwerking laboratorium
PR 154 Klinisch farmaceutische analyse
BRO 103 Centrifuge
BRO 215 LC-MS/MS

Literatuur en referenties

R. Brands, Afstudeer verslag: Rivaroxaban in plasma met LC-MS/MS, 28-05-2013

Auteur(s)

R. Brands (klinisch farmaceutisch analist)

Verificator(en)

J. Dijk (gespecialiseerd klinisch farmaceutisch analist)
A. Kruise (gespecialiseerd klinisch farmaceutisch analist)

Autorisator

E.J.F. Franssen (ziekenhuisapotheker)

Bijlage 20

Document nr

VAL KFA 4032

Titel

Rivaroxaban in plasma m.b.v. LC-MS/MS.

Doel

Dit validatieprotocol omvat het verzamelen en beoordelen van de noodzakelijke meet- en analyseresultaten, zodat met zekerheid gesteld kan worden dat de methode voor de gehaltebepaling van rivaroxaban in humane matrix voldoet aan de gestelde eisen.

Toepassingsgebied

Dit validatieprotocol is van toepassing op de analyse van rivaroxaban in natriumcitraat plasma die vanuit het OLVG of via externe wegen op het laboratorium terecht komen. De analyse wordt uitgevoerd met behulp van vloeistofchromatografie met massa spectrometrische detectie.

Doelgroep

Dit protocol is bestemd voor de analisten van de apotheek.

Verantwoordelijkheden

Verantwoordelijken	Verantwoordelijkheden
Analisten	Het juist toepassen van dit protocol
Hoofdanalist	Toezien op de juiste toepassing van dit protocol
Ziekenhuisapotheker kwaliteit	Het autoriseren van dit protocol

Afkortingen en definities

BRO	Bediening, Reiniging en Onderhoud
KFA	Klinisch Farmaceutische Analyse
LC-MS/MS	Vloeistofchromatografie met tandem massa spectrometrische detector
LLOQ	Lower Limit of Quantitation
QC monster	Kwaliteit controle monster
RSD	Relatieve Standaard Deviatie
ULOQ	Upper Limit Of Quantitation
VAL	Validatie Protocol

Bijlage 20

Benodigdheden

Benodigde apparatuur
- Balans Sartorius
- LC-MS/MS Thermo
- Vortex

Chemicaliën
- Rivaroxaban
- Disopyramide
- Relevante comedicatie en reagentia, zie selectiviteit.
- Blanco natriumcitraat (0.109M) plasma, 6 charges.
- Pooled plasma (6 charges blanco natriumcitraat 0.109M plasma mengen)

Werkwijze

Bepalingsgrenzen en bereik

Validatie wordt uitgevoerd aan de hand van de richtlijnen van de European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation [1] en de Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical method validation [2].
De methode wordt gevalideerd over een bereik van 20 µg/l tot 500 µg/l rivaroxaban in plasma. De volgende parameters worden gevalideerd: Kalibratie curve, Juistheid, Herhaalbaarheid, Reproduceerbaarheid en Selectiviteit.

Kalibratie curve

Inleiding
De kalibratie curve van de analyse methode voor rivaroxaban wordt onderzocht op acht punten in het gedefinieerde bereik. Voor de gehaltebepaling van rivaroxaban worden de concentraties 20, 49, 95, 140, 182, 261, 364 en 522 µg/l gebruikt. Gebruik pooled blanco plasma als matrix .

Uitvoering
- Voer de bepaling ‘kalibratie curve’ tegelijk uit met de bepaling ‘juistheid’ en ‘precisie – herhaalbaarheid’.
- Maak een validatie reeks door de standaardoplossingen in duplo te bereiden uit 1 stockoplossing volgens analysevoorschrift: Rivaroxaban in plasma m.b.v. LC-MS/MS.
- Bereid twee blanco’s met interne standaard (zero monsters) en twee blanco’s zonder interne standaard en neem die mee als controle op het snijpunt met de y-as. Neem deze blanco NIET mee als meetresultaat voor de kalibratie curve.
- Ga na of de te gebruiken apparatuur gevalideerd is en voldoet aan de gestelde eisen.
- Analyseer de acht standaarden (in duplo opgewerkt) in duplo en de blanco’s zonder en met IS (in duplo opgewerkt) in 3 voud volgens de analysemethode beschreven in het analysevoorschrift ‘Rivaroxaban in plasma m.b.v. LC-MS/MS’.
- Bepaal de beste en meest eenvoudige lijn door de standaarden. Neem de blanco niet mee als meetpunt.

Eisen
Correlatiecoëfficiënt > 0,99 (Huisnorm)
De berekende waarden van de standaarden en QC monsters (precisie) vallen binnen de ≤ 15% afwijking ten opzichte van de nominale waarde, behalve de LLOQ, welk een afwijking van ≤ 20% mag hebben. Van de herhalingen (kalibratie standaarden) valt 50% binnen de ≤15% afwijking, of ≤ 20% afwijking voor de LLOQ. Minimaal 6 kalibratie standaarden voldoen aan deze eis. Indien een standaard niet aan deze eis voldoet moet deze uit de curve verwijderd worden, met uitzondering van de LLOQ of de ULOQ en dient de curve opnieuw geëvalueerd te worden. Indien

de LLOQ of de ULOQ niet voldoet, dient de hele curve verworpen te worden. Als de volgende validatie run ook faalt, moet de methode aangepast worden en de validatie opnieuw gestart [1].

Juistheid (recovery-onderzoek)

Inleiding
De juistheid van de methode wordt met behulp van de recovery van de te kwantificeren component uit de humane matrix bepaald. De juistheid is de mate waarin het gemiddelde van een aantal metingen met behulp van de methode afwijkt van de theoretische waarden. Inzicht in de juistheid wordt verkregen door uitvoering van de methode in zesvoud op 3 QC monsters (laag, midden, hoog) [2]. Gebruik pooled blanco plasma als matrix.

Uitvoering
- Voer de bepaling 'juistheid (recovery)' tegelijk uit met de bepaling 'kalibratie curve' en 'precisie – herhaalbaarheid'.
- Voer de meting in zesvoud uit.
- Ga na of de te gebruiken apparatuur gevalideerd is en voldoet aan de gestelde eisen.
- Bepaal het gehalte van rivaroxaban volgens de analysemethode beschreven in het analysevoorschrift 'Rivaroxaban in plasma m.b.v. LC-MS/MS'.
- Bereken de gemiddelde waarde van elk QC monster en bereken de afwijking ten opzichte van de nominale waarde.

Eisen
Afwijking van de gemiddelde waarde van de QC monsters ten opzichte van de nominale waarde: ≤ 15%. De gemiddelde waarde van het laagste QC monster mag ≤ 20% afwijking vertonen ten opzichte van de nominale waarde [2].

Precisie – Herhaalbaarheid

Inleiding
De herhaalbaarheid van de analysemethode om de stof rivaroxaban uit een plasma matrix te bepalen is de mate van spreiding in de meetresultaten in dezelfde run van hetzelfde monster. Inzicht in de herhaalbaarheid wordt verkregen door uitvoering van de methode in zesvoud op 3 QC monsters (laag, midden, hoog). Gebruik pooled blanco plasma als matrix.

Uitvoering
- Voer de bepaling 'Precisie - Herhaalbaarheid' tegelijk uit met de bepaling 'kalibratie curve' en 'juistheid'. De hier beschreven monsters zijn dezelfde als beschreven in 'Juistheid (recovery-onderzoek)'.
- Bereken en beoordeel de relatieve standaard deviatie (RSD) van het gemiddelde van elk QC monster.

Eisen
RSD ≤ 15%, alleen het laagste QC monster mag ≤ 20% RSD vertonen [2].

Precisie – Reproduceerbaarheid
Inleiding
De reproduceerbaarheid van de analysemethode om de stof rivaroxaban uit een plasma matrix te bepalen is de mate van spreiding in de meetresultaten over verschillende runs van verschillende monsters door verschillende analisten onder verschillende omstandigheden. Inzicht in de reproduceerbaarheid wordt verkregen door uitvoering van de methode op drie verschillende dagen met een ijklijn op 8 standaarden en 3 QC monsters (laag, midden, hoog). Gebruik pooled plasma als matrix.

Bijlage 20

Uitvoering

- Voer ‘Precisie – Reproduceerbaarheid’ uit op drie dagen. De gegevens voor de eerste dag zijn gelijk aan de gegevens verkregen in de sectie ‘Precisie – Herhaalbaarheid’.
- Maak elke dag nieuwe standaarden en QC monsters.
- Laat minimaal één andere analist een dag de opwerkingen en bepalingen uitvoeren.
- Maak elke dag een nieuwe kalibratie curve op dezelfde werkwijze beschreven bij ‘Kalibratie curve’.
- Ga na of de te gebruiken apparatuur gevalideerd is en voldoet aan de gestelde eisen.
- Bepaal het gehalte van rivaroxaban volgens het analysevoorschrift ‘Rivaroxaban in plasma m.b.v. LC-MS/MS’.
- Tussen de eerste en de laatste run moet minimaal 1 week zitten.
- Beoordeel de berekende relatieve standaard deviatie (RSD) van de QC monsters.

Eisen
RSD ≤ 15%, alleen laagste QC mag ≤ 20% RSD vertonen [2].
Tussen de eerste en laatste meting dient minimaal 1 week te zitten.
Minimaal 2 analisten hebben de methode uitgevoerd.

Selectiviteit
Inleiding
De methode dient selectief genoeg te zijn om rivaroxaban te meten, zonder dat andere stoffen de meting storen. De matrix plasma, reagentia en comedicatie dienen de meting niet te storen. Om te bepalen of comedicatie in relevante maximale concentratie en reagentia storen, wordt de invloed van de volgende stoffen op het signaal van rivaroxaban met flow injectie bepaald: acenocoumarol, acetylsalicylzuur (als salicylzuur), atorvastatin, coffeïne, diclofenac, fenprocoumon, Ibuprofen, ketoconazol, midazolam, morfine, naproxen, pantoprazol, paracetamol, rifampicine en neerslag reagens met interne standaard disopyramide.
Matrixeffect en extractie recovery worden bepaald bij de recovery test.

Comedicatie

Uitvoering

- Bepaal de selectiviteit met flow injectie analyse.
- Maak een academische standaard rivaroxaban met concentratie 300 µg/l.
- Maak de volgende oplossingen: Acenocoumarol 90 µg/l, acetylsalicylzuur (als salicylzuur) 300 mg/l, atorvastatin 55µg/l, coffeïne 15 mg/l, diclofenac 500µg/l, fenprocoumon 3 mg/l, Ibuprofen 30 mg/l, ketoconazol 10 mg/l, midazolam 250µg/l, morfine 150 µg/l, naproxen 100 mg/l, pantoprazol 5,5mg/l, paracetamol 20 mg/l, rifampicine 10 mg/l en neerslag reagens met interne standaard disopyramide.
- Ga na of de te gebruiken apparatuur gevalideerd is en voldoet aan de gestelde eisen.
- Stel de HLPC pomp in op 0,25 ml/min met eluens verhouding 70% buffer, 30% acetonitril.
- Voeg de Rivaroxaban standaard toe aan het eluens met de syringe pomp (20 µl/min)
- Meet de oplossingen door deze in het eluens te injecteren met de inject valve.
- Injecteer iedere oplossing vier maal.
- Beoordeel afwijkingen in het signaal van rivaroxaban .

Eisen
Comedicatie en neerslag reagens mogen geen invloed hebben op het signaal van rivaroxaban [1].

Bijlage 20

Recovery (extractie) en matrix effect

Uitvoering
matrix effect

- Werk een matrix extract op waarbij het plasma wordt neergeslagen met de neerslag reagens en vervolgens gespiked wordt met standaard.
- Werk plasma gespiked met standaard op, wat vervolgens wordt neergeslagen met neerslag reagens.
- Werk een academische standaard rivaroxaban op met dezelfde concentratie.
- Voer de opwerkingen op 2 verschillende concentraties uit: hoog en laag, en met 6 verschillende batches blanco plasma, in duplo.
- Bereken de extractie recovery en het matrix effect met onderstaande berekeningen.

Berekening

$$\text{Matrix effect} = \frac{\text{Respons monster gespiked na extractie}}{\text{Respons academische standaard}} * 100\ \%$$

$$\text{Recovery} = \frac{\text{Respons monster gespiked voor extractie}}{\text{Respons monster gespiked na extractie}} * 100\ \%$$

Eisen:
Matrix effect: RSD van de 6 charges blanco plasma mag niet groter zijn dan 15% [1].
Extractie recovery: Minimale recovery moet 50% zijn en RSD mag niet groter zijn dan 15% [2].

Robuustheid

Inleiding
De analysemethode om de stof rivaroxaban in een humane matrix te bepalen behoort robuust te zijn. Als er eigenschappen en variabelen zijn die kritisch zijn, dan moet dit duidelijk vermeld worden op de werkinstructie van de analyse methode. Tijdens het proces van de ontwikkeling en optimalisering van de analyse methode zijn deze veelal aan het licht gekomen.

Uitvoering

- Noteer alle kritische eigenschappen en variabelen van de methode
-

Verwijzingen en literatuur

Documenten zijn terug te vinden in het documentbeheer en kwaliteit systeem van het OLVG.
Reagentia zij terug te vinden in de registratie en beheer voorschriften van het OLVG.
PR 079 Afvalverwerking laboratorium
PR 154 Klinisch farmaceutische analyse
BRO 103 Centrifuge
BRO 215 LC-MS/MS
[1]:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, 22-12-2012, 16:16
[2]: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf, 07-02-2013, 11:44
R. Brands, Afstudeer verslag: Rivaroxaban in plasma met LC-MS/MS, 28-05-2013

Bijlage 20

Auteur(s)

R. Brands (klinisch farmaceutisch analist)

Verificator(en)

J. Dijk (gespecialiseerd klinisch farmaceutisch analist)
A. Kruise (gespecialiseerd klinisch farmaceutisch analist)

Autorisator

E.J.F. Franssen (ziekenhuisapotheker)