

**Figuur 1.** Chromatogrammen van chilipeper extract en urine van proefpersonen met en zonder capsaicinoïde-rijk dieet, (A): peperextract beschreven zoals in materiaal en methode met storende component met RT=11,26 min; (B) mix van nor-metanefrine (NM) met RT=5,49 min, metanefrine (M) met RT= 8,13 min en IS met RT= 11,29 min; (C) urine van proefpersoon zonder capsaicinoïde-rijk dieet: piekhoogte NMN=11653 mV, piekhoogte MN=24643 mV en piekhoogte IS=35705 mV; (D) urine van proefpersoon na het volgen van een capsaicinoïde-rijk dieet: piekhoogte NMN=1024425 mV, piekhoogte MN=23552 mV en piekhoogte IS=73440 mV. Hierbij is duidelijk te zien dat de piek van IS hoger wordt na het volgen van een capsaicinoïde-rijk dieet.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2014; 39: 170-173

## Sporenmetalen analyse met behulp van inductief gekoppeld plasma massaspectrometrie (ICP-MS): validatie en implementatie

M. WEEINK, H.J. WANSCHERS en R.G.H.J. MAATMAN

In het kader van vervanging van de AAS is na uitgebreide inventarisatie besloten voor de aanschaf van een ICP-MS. Motivatie voor dit besluit waren de mogelijkheid om meerdere elementen in kortere tijd, tegen geringere kosten te kunnen analyseren en tevens het beschikken over meer diagnostische mogelijkheden voor eventuele toekomstige vraagstellingen. Binnen de klinische chemie is ICP-MS geen standaard methodiek, een goede reden om kennis en ervaringen tot dusver te delen.

ICP-MS is sinds de introductie in 1980 uitgegroeid tot

*Klinisch Chemisch Laboratorium Medlon BV, Enschede*

E-mail: r.maatman@medlon.nl

een detectie methode met een hoge gevoeligheid, een groot lineair bereik en een grote specificiteit voor het meten van metalen en metaalverbindingen. Tevens zijn de analytische mogelijkheden sterk gegroeid door de koppeling van ICP-MS met o.a. gaschromatografie, capillaire elektroforese, vloeistof chromatografie en laser ablatie (1-6).

Dit artikel beschrijft de implementatie en validatie van sporenmetalen analyses met behulp van ICP-MS zonder gekoppelde apparatuur als hierboven beschreven. Een ICP-MS bestaat uit drie delen, een deel waar ionisatie plaats vindt, de verstuiverkamer, een deel waar de ionen worden gescheiden, de massaspectrometer

**Tabel 1.** Specificaties van de diverse sporenelementen verkregen met behulp van EP5, EP6 en EP17 protocollen. De bij EP5 vermelde variatie coëfficiënten (CV) zijn totaal CV's. Referentiewaarden zijn vastgesteld in eigen beheer (8).

Bepaling	Referentie-waarden	LOQ (EP17)	Lineaire bereik EP6	EP5: lage conc: CV%	EP5: hoge conc: CV%
mangaan plasma (nmol/l)	2,5-25,0	6,7	941	13 7,8%	120 4,1%
nikkel plasma (nmol/l)	< 40	15,0	912	14 14,8%	111 5,7%
lood volbloed (umol/l)	0,06-0,60	0,06	8,41	0,51 3,3%	3,01 1,6%
lood urine (umol/l)	<0,50 µmol/24 h	0,05	7,56	0,47 2,5%	4,28 2,4%
thallium volbloed (nmol/l)	<50	6,2	814	39 3,0%	201 2,1%
thallium urine(nmol/l)	<50 nmol/24 h	5,5	853	41 2,5%	295 1,4%
aluminium plasma (umol/l)	< 0,45	0,20	5,02	0,48 14,3%	2,50 10,9%
cadmium volbloed(nmol/l)	<30	2,47	140,6	26 2,5%	103 2,3%
arsen urine (umol/l)	< 0,7	0,02	20,77	0,74 2,8%	3,32 3,0%
kobalt urine (nmol/l)	<2 µmol/mol kreat.	3,47	910,2	13 4,5%	101 3,7%
koper urine (umol/l)	< 1,2 µmol/24 h	0,11	88,5	0,35 4,5%	5,23 3,4%
zink urine (umol/l)	< 10 µmol/24 h	0,23	94,0	7,6 3,1%	31,8 3,0%
kobalt plasma (nmol/l)	0-20	3,6	900	14 4,0%	103 2,7%
chrom plasma (nmol/l)	0-40	15,0	5400	18 11,9%	355 3,4%
koper plasma (umol/l)	10-24	0,27	110	12 3,1%	38 3,1%
zink plasma (umol/l)	10-20	0,3	100	14 2,9%	43 2,0%
seleen plasma (umol/l)	0,7-1,4	0,15	6,37	1,03 4,7%	2,12 2,8%
koper urine (umol/l)	0-1,2 µmol/24 h	0,12	85	0,35 4,5%	5 3,4%
zink urine (umol/l)	0-10 µmol/24 h	0,23	94	7,6 3,1%	32 3,0%

en een deel waar de verschillende ionen worden gedetecteerd, de electron multiplier. Voor de analyse van een plasma of urine monster wordt deze na verdunning in de verstuiverkamer in gasvormige fase gebracht bij zeer hoge temperatuur ~6000 K. Hierdoor zullen alle aanwezige verbindingen waaronder de metalen worden geïoniseerd. De geïoniseerde metalen worden door een argon dragergas van de verstuiverkamer het vacuüm van de massaspectrometer in worden geleid. De ionen worden hier onder invloed van de wisselende elektrische spanning op de quadropolen gescheiden op lading en massa en vervolgens gedetecteerd met behulp van de electronmultiplier. Door de reactie van het argon dragergas met de matrix kunnen verbindingen ontstaan welke interfereren bij de meting van een aantal metalen. Huidige ICP-MS apparatuur beschikt over een zogenaamde dynamic reaction cell (DRC) waar een reactiegas (H<sub>2</sub>, He, Xe, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> of NH<sub>3</sub>) kan worden ingelaten. Het reactiegas botst hierbij met de interfererende verbinding, het zogenaamde kinetic energy discharge (KED) of reageert met de verbinding, afhankelijk van het soort reactiegas. Beide methoden resulteren in een reductie van de hoeveelheid interfererende verbinding.

Voor de in gebruik name van de ICP-MS zijn de ontwikkelde methoden grondig gevalideerd middels de NCCLS protocollen, EP-5, EP-6, EP-9 en EP17 voor analyse van respectievelijk de precisie, lineariteit, kwantitatieve vergelijking en detectielimiet (LOQ) (7).

## Materiaal en Methoden

Voor de analyse van de diverse sporenmatalen werd gebruik gemaakt van een Nexion 300X van de firma Perkin Elmer.

De analyse van cadmium, lood en thallium vinden in de zogenaamde standaard modus plaats, hetgeen betekent dat er geen gebruik wordt gemaakt van een botsingsgas in de DRC. Alle andere metalen arseen, koper, mangaan, nikkel ijzer, zink, aluminium, chroom, kobalt en seleen werden gemeten in de zogenaamde KED modus waarbij gebruik wordt gemaakt van helium als botsingsgas in de DRC.

Voor de uitvoering van de NCCLS protocollen (7) werd waar mogelijk gebruikt gemaakt van natuurlijke bloed en urine monsters om de invloed van matrix-effecten mee te kunnen beoordelen. Waar dit niet mogelijk was werd gebruik gemaakt van fresh frozen plasma (FFP) waaraan een bepaald hoeveelheid van het betreffende sporenmetaal werd toegevoegd. Door het geringe aantal beschikbare monsters was niet voor alle sporenmatalen kwantitatieve vergelijking mogelijk.

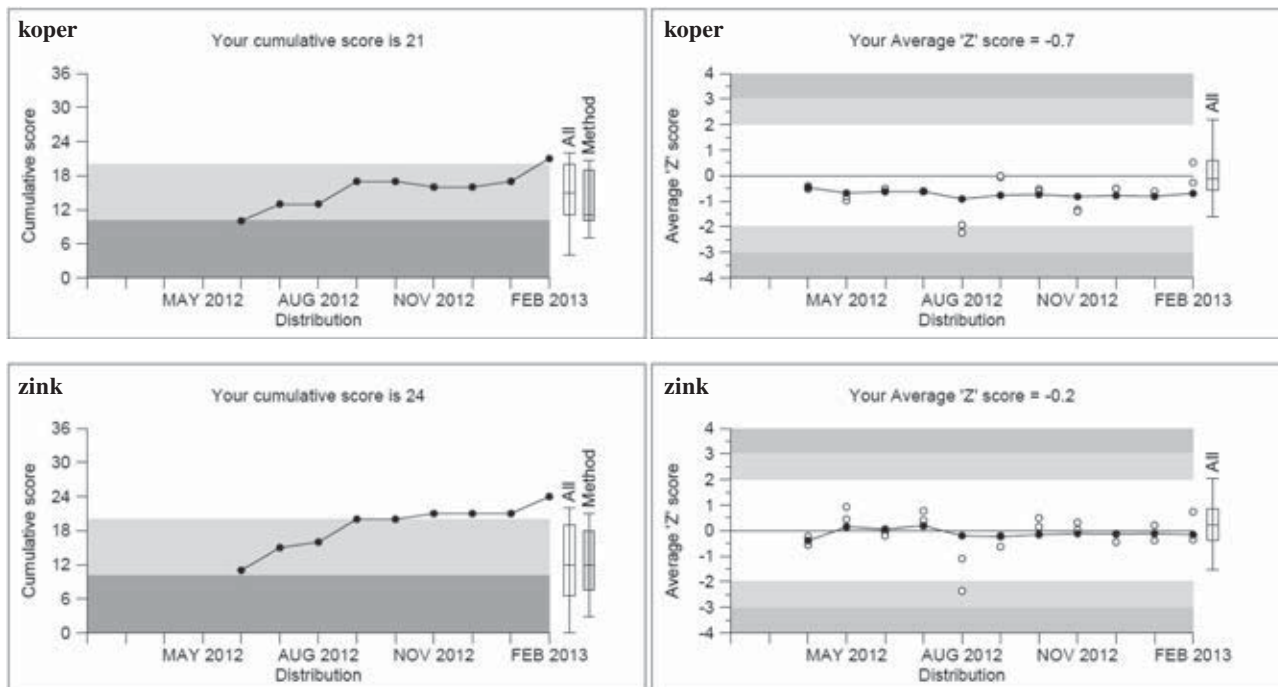
## Resultaten

### Inrichting

De introductie van de ICP-MS binnen Medlon vereiste aanpassingen aan de ruimte waarin de apparatuur werd geplaatst. In de ruimte werd overdruk aangebracht om contaminatie van buiten de ruimte te vermijden. Gasleidingen werden geplaatst voor de aanvoer van

**Tabel 2.** EP9 Kwantitatieve vergelijking van sporenelementen tussen ICP-MS apparaten. Regressie werd berekend volgens Passing Bablok.

Bepaling in plasma	referentiewaarden	correlatie	as afsnede	helling
Kobalt (nmol/l)	0-20	0,999	0,6	1,02
Chroom (nmol/l)	0-40	0,999	2,0	1,00
Zink (umol/l)	10-20	0,986	1,34	0,91



**Figuur 1.** Externe kwaliteitscontrole rapportage voor de sporenelementen koper en zink. De grafieken aan de linkerzijde laten de cumulatieve score zien met aan de rechterzijde van de grafiek de cumulatieve score van alle gebruikers en gebruikers die eveneens ICP-MS gebruiken voor analyse. De grafieken aan de rechterzijde tonen de Z-score een maat voor het aantal sigma afwijking van de gerapporteerde waarde ten opzichte van de doelwaarde. Aan de rechterzijde de Z score van alle gebruikers.

het argon dragergas onder voldoende druk. Monsters voor analyse werden bereid in een laminaire flowkast welke gestationeerd werd buiten de ruimte waar de ICP-MS is gestationeerd. De aanpassingen om contaminatie te vermijden zouden ook nodig zijn geweest wanneer besloten zou zijn voor de aanschaf van een nieuwe AAS.

#### Chemicaliën

Voor analyse van sporenmetalen met behulp van ICP-MS werd gebruik gemaakt van chemicaliën van hoogste zuiverheidsgraad. Verdunningen werd uitgevoerd met ultra zuiver milliQ water (18,2 MΩ.cm bij 25°C).

#### Kennis

Binnen Medlon is uitgebreide massaspectrometrische kennis aanwezig. Kennis voor het opzetten van ICP-MS methoden is echter zeer specifiek en vereiste aanvullende opleiding. Met name de kennis over welke sporenmetalen hinder ondervinden van interfererende verbindingen, welke monster voorbereiding en in welke apparaat modus de beste resultaten werden verkregen. De beschikbare literatuur voor het opzetten van de diverse applicaties bleek niet altijd bruikbaar door de afwijkende matrix van klinische monsters en meest waarschijnlijk door geringe technologische verschillen in de ICP-MS apparatuur van de diverse firmas.

#### Routinegebruik

In vergelijking met de AAS waar per sporenelement een methode diende te worden ontwikkeld zijn er voor de ICP-MS slechts drie methoden ontwikkeld waarmee tegelijkertijd meerdere sporenelementen kunnen worden gemeten. Tevens is de analysetijd aanzienlijk korter. Routine productie kan met minder "hands-on-time" in ongeveer de helft van de tijd worden verwerkt.

#### Validatie

Voor de validatie van de diverse methoden werden de NCCLS EP5 (precisie), EP6 (lineariteit), EP9 (kwantitatieve vergelijking) en EP17 (detectielimiet) protocollen uitgevoerd. De resultaten van deze validaties, met uitzondering van de EP-9 resultaten, staan vermeld in tabel I. De EP5 validatie liet voor alle sporenmetalen totaal CVs zien <5,0% met uitzondering van de lage concentratie nikkel, mangaan, chroom en de lage en hoge concentratie van aluminium. De lage concentratie welke gebruikt is voor de validatie van nikkel, mangaan en chroom liggen dichtbij de LOQ hetgeen de hogere CVs verklaart. De analyse van Aluminium in plasma is gevoelig voor interfererende verbindingen en laat voor beide concentraties hogere maar acceptabele VCs zien. Verdere optimalisatie van de aluminium bepaling is beoogd voor de nabije toekomst. De EP6 en EP17 validatie lieten zien dat de ICP-MS metingen voor sporenmetalen een groot lineair bereik hebben van zeer laag tot zeer hoog. Waarbij het meetbereik het klinisch relevante meetbereik omvat. Door een gebrek aan monsters konden enkel voor de sporen elementen zink, kobalt en chroom kwantitatieve vergelijkingen worden uitgevoerd. De met behulp van ICP-MS gemeten concentraties lieten goede correlaties zien, zie tabel II.

#### Kwaliteitscontrole

Voor de sporenelementen, indien beschikbaar, wordt deelgenomen aan de externe kwaliteitsrondzending van de UK NEQAS. De overgang van AAS naar ICP-MS liet een duidelijke verbetering zien voor de rondzending voor koper en zink, zie figuur I. De grafieken links tonen de cumulatieve score sinds de overgang van AAS naar ICP-MS. Op de rechter y-as is de

cumulatieve score van alle gebruikers en van andere ICP-MS gebruikers geplot. De grafieken aan de rechterzijde tonen de Z score met op de rechter y-as de Z-score van alle gebruikers. De Z score staat voor het aantal sigma dat men afwijkt van de doelwaarde. Sinds de overgang naar ICP-MS wijken de gemeten waarden voor koper en zink slechts gering af van de doelwaarde, hetgeen betekent dat de juistheid van meten zeer goed is.

### Conclusie

De validatie en implementatie van de ICP-MS apparatuur en de methoden zijn met goed gevolg uitgevoerd. Hoewel inrichting van het laboratorium en het ontwikkelen van de benodigde kennis de nodige investering hebben gevraagd kunnen analyses in veel kortere tijd met minder analytische inspanning en tegen lagere kosten worden uitgevoerd. De ICP-MS techniek is een zeer gevoelige techniek, heeft een zeer groot meetbereik, het klinisch relevante meetbereik omvattend, waarbinnen met grote precisie wordt gemeten. Uit de EP9 vergelijking en de externe kwaliteitsronzending is gebleken dat bovendien de juistheid van meten zeer goed is. Tot slot biedt de ICP-MS voor de toekomst extra mogelijkheden doordat nieuwe elementen, welke voorheen niet werden geanalyseerd, eenvoudig kunnen worden opgezet en geanalyseerd met huidige methoden. Bovendien biedt de ICP-MS extra diagnostisch potentiaal door koppeling met andere scheidingstechnieken.

### Referenties

1. Ponce de León CA, Montes-Bayón M, Caruso JA. Elemental speciation by chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*. 2002;974:1-21.
2. Beauchemin D. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*. 2006;78:4111-36.
3. Huang J, Hu X, Zhang J, Li K, Yan Y, Xu X. The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40:227-34.
4. Ammann AA. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *J Mass Spectrom*. 2007;42:419-27.
5. Bolann BJ, Rahil-Khazen R, Henriksen H, Isrenn R, Ulvik RJ. Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67:353-66.

6. Pröfrock D, Prange A. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends. *Appl Spectrosc*. 2012;66:843-68.
7. NCCLS Evaluation Protocols, Natl Committee for Clinical and Laboratory standards (January 1994).
8. Posma F, Kuks P. Spoormetalen: biologische monitoring en biologisch effect. *Tijdschr NVKC* 1991;16:250-9.

### Samenvatting

Bij de overgang van atomaire absorptie spectrometrie (AAS) naar inductief gekoppeld plasma massaspectrometrie (ICP-MS) voor de analyse van sporenmatalen is een grondige validatie uitgevoerd. Voor de validatie werden de NCCLS protocollen voor precisie, lineariteit, kwantitatieve vergelijking en analyse van detectielimiet uitgevoerd. Op basis van de resultaten van deze analytische validatie werd de ICP-MS apparatuur in gebruik genomen.

Implementatie van de ICP-MS binnen het laboratorium stelde de nodige eisen die het proces van ingebruikname voor productie hebben vertraagd. Met name de conditionering van ruimte en de expertise voor het opzetten van de analytische methoden waren hierin sterk bepalend.

Inmiddels is de ICP-MS in productie genomen en worden analyses van een groot aantal metalen (cadmium, lood en thallium, arseen, koper, mangaan, nikkel ijzer, zink, aluminium, chroom, kobalt en selenium) in volbloed, plasma en urine routinematig, in zeer korte tijd, met grote analytische precisie (CVs ~5%) uitgevoerd. De kwaliteit wordt onder andere gemonitord door deelname aan externe kwaliteitscontrole rondzendingen. De overgang naar ICP-MS heeft geresulteerd in beduidend betere prestaties in deze rondzendingen.

### Summary

For the analysis of trace metals we exchanged atomic absorption spectrometry (AAS) for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). As part of an in-depth validation we applied the NCCLS protocols for assessing precision, sensitivity, linearity and accuracy. On the basis of the results of the analytical validation the ICP-MS analysis was introduced. Optimizing both lab facilities and the expertise of the personnel in the development of analytical methods initially delayed implementation.

Finally, the ICP-MS was put into production for the analysis in whole blood of the following metals: cadmium, lead and thallium, arsenic, copper, manganese, nickel, iron, zinc, aluminum, chromium, cobalt and selenium in whole blood, plasma and urine routine. Only short runs were needed; results were precise (CV ~ 5%). The accuracy, monitored in external quality control programmes is within required limits.

*Conclusion: The transition to ICP-MS resulted in significantly improved quality of analysis.*