

# 25-OH Vitamin D düzeyi ölçümünde radyopak madde interferansının deneysel araştırılması

Experimental research of interference associated with radiopaque material on 25-OH Vitamin D blood level

Ataman GÖNEL<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

## Öz.

**Amaç:** D vitamini eksikliği insanların kapalı alanlarda yaşama eğiliminden dolayı toplumda sıklıkla görülmektedir. Eksikliğin tespiti için son zamanlarda immunoassay yöntemler terk edilerek referans metod olan LC-MS/MS ölçüm tekniği kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemde serum matris etkisi nedeniyle meydana gelen interferans yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Bu çalışmada kontrastlı görüntüleme tekniklerinde kullanılan radyopak maddelerin 25OH vitamin D (25[OH]D) ölçümü sırasında oluşabilecek interferans etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metod:** Çalışmada 100 uL 25[OH]D kontrol çözümü üzerine 50 uL yedi farklı radyopak madde eklenerek LC-MS/MS yöntemi ile 25[OH]D ölçümü yapıldı. Yapılan interferans çalışması ile elde edilen hedef değerden sapma miktarları (bias) kaydedildi.

**Bulgular:** 7 farklı radyopak madde (RM1-RM7) %5.14 - %81.08 arasında değişen oranlarda hedef değerden sapmaya neden oldu. %81.08 ile en fazla sapma gadodiamid (287 mg/mL) içeren RM6 ticari ürününde meydana geldi. Gadobutrol, 604.72 mg/mL (RM1) iohexsol, 755 mg/mL (RM2), gadodiamid, 287 mg/mL (RM5) içerikli radyopak maddeler sırasıyla %5.11, %11.08, %10.21 oranlarında daha düşük sapmaya neden oldu.

**Sonuç:** 25[OH]D konsantrasyonu doğru ölçülmezse osteomalazinin atlanmasına ve buna bağlı komplikasyonlara neden olabilir. Radyopak madde interferansına maruz kalmamak için kan alma işlemi kontrastlı görüntüleme öncesi yapılmalıdır. Bunu sağlamanın mümkün olmadığı durumlarda hatalı yüksek sonuçlarla karşılaşmamak için hastanelerde gadobutrol, 604.72 mg/mL (RM1) iohexsol, 755 mg/mL (RM2), gadodiamid, 287 mg/mL (RM5) etken madde içeren radyopak maddelerinin kullanımı tercih edilmelidir. Hastanelere radyopak madde temin ederken interferans çalışmalarına göre ürün kabulünün yapılması laboratuvar hata oranlarını azaltmada katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Radyopak madde, 25-OH vitamin D, interferans, LC-MS/MS

## Abstract

**Background:** Vitamin D deficiency is frequently seen in society because of the tendency of people to live in closed areas. Recently, immunoassay methods have been abandoned and LC-MS/MS measurement technique is used in order to determine Vitamin D deficiency. However, interference caused by the serum matrix effect in LC-MS/MS method may cause incorrect results. The aim of this study was to investigate the interference due to radiopaque substances used in contrast imaging techniques during 25-OH vitamin D (25[OH]D) measurement.

**Material and Methods:** 50 uL of seven different was added to 100 uL of 25[OH]D control solution. 25[OH]D concentrations from every mixture were measured by LC-MS/MS method. The amounts of deviation (bias) were calculated.

**Results:** Every radiopaque substance (RM1-RM7) caused different deviation from the target values (5.14% to 81.08%). The reason of the highest deviation (81.08%) was from the RM6 commercial product containing gadodiamide (287 mg / mL). Radiopaque substances containing gadobutrol, 604.72 mg / mL (RM1) iohexol, 755 mg / mL (RM2), gadodiamide, 287 mg / mL (RM5) showed lower deviation (5.11%, 11.08%, 10.21%)

**Conclusions:** If the concentration of 25[OH]D is not measured correctly, it may cause chronic complications associated with osteomalacia. In order to avoid to the interferences, the phlebotomy should be performed before radiocontrast imaging. In hospitals, the radiopaque materials containing gadobutrol, 604.72 mg/mL (RM1) iohexsol, 755 mg/mL (RM2), gadodiamid, 287 mg/mL (RM5) can be preferred to reduce the risk of the similar interference. While providing radiopaque substances to hospitals from the drug companies, it could be suggestion to investigate the interferences for these like drugs

**Keywords:** Radiopaque substance, 25-OH vitamin D, interference, LC-MS/MS

## Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Ataman GÖNEL

Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,  
Osmanbey Kampüsü 63300 Haliliye  
Şanlıurfa

Tel: +90 (0414) 344 44 44,

Fax : +90 (414) 318 3209

E-mail: atamangonel@gmail.com

Geliş tarihi / Received: 02/10/2018

Kabul tarihi / Accepted: 25/10/2018

## Giriş

Radyopak maddeler, hem invaziv olan hem de invaziv olmayan tanı ve tedavi yöntemlerinde rutin olarak kullanılmaktadır. Diğer bütün ilaçlar gibi kullanım sırasında yan etki oluşturabilmektedir. Radyopak maddelerin vücutta eritrosit hasarı, endotelial hasar, tromboemboli, kanbeyin bariyerinde bozulma, vazodilatasyon, akciğer ödem, aritmi gibi istenmeyen klinik etkiler oluşturduğu bilinmesine rağmen, biyokimyasal ölçüm yöntemleri üzerindeki etkileri bilinmemektedir (1-3). Yüksek osmolarite ve X ışınlarını absorbe edebilme özelliğine sahip molekül yapıları nedeniyle kütle spektrometri gibi komplike ölçüm cihazlarında analitik hatalara neden olabilirler. Kanda bulunan bazı moleküllerin LC-MS/MS metodunda iyonizasyon aşamasını etkilemesiyle ortaya çıkabilen matriks etkisi ile bir çok analitin hatalı ölçümüne neden olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (4, 5). Tanı ve tedavi takibinde kullanılan testlerin hatalı ölçümü tedavi protokollerini değiştirerek morbidite ve mortalite riskini arttıracığından bu tür etkilerin ekarte edilmesi gerekir (6). Geçmişte hatalı ölçümlere bağlı tedaviden yoksun kalmış ve komplikasyona maruz hasta sayısını tahmin etmek mümkün değildir. Görüntüleme tekniklerinde sıkça kullanılan radyopak maddelerin son birkaç yılda rutin kullanıma girmiş LC-MS/MS cihazlarında analit sonuçlarını nasıl etkilediği daha önce gösterilmemiştir. Bu çalışmanın amacı, 25[OH]D vitamini düzeyinin ölçümünde kullanılan ve referans metod olarak kabul edilen LC-MS/MS cihazlarında yedi farklı radyopak maddenin matriks etkisinin deneysel olarak araştırılmasıdır.

## Materyal ve Metod

**Materyal:** Çalışmada D vitamini ölçümü için Trimar marka kalibratör (Lot:BBL2E1) kontrol solüsyonu (Lot:BBL2E2) kullanıldı. İnterferans çalışması için Omnipaque (ioheksol, 755 mg/mL, 100 mL intravenöz enjeksiyonluk, GE healthcare), Emaray (gadopentetik asit dimeglumin tuzu, 469.01 mg/mL, 15 mL IV enjeksiyonluk çözelti), Gadot (gadodiamid, 287 mg/mL, 15 mL IV enjeksiyonluk çözelti), Optiray (ioversol, 741 mg/mL, 100mL intravenöz enjeksiyonluk), Kopaq (ioheksol, 755 mg/mL, 100 mL intravenöz enjeksiyonluk), Gadovist (gadobutrol, 604.72 mg/mL, 15 mL IV enjeksiyonluk çözelti), Gadodiem (gadodiamid, 287 mg/mL, 15 mL IV enjeksiyonluk çözelti) radyografi opak maddeleri kullanıldı. HPLC nin bütün solvent ve reaktifleri JASEM firmasından temin edildi.

**Ölçüm Cihazları:** Shimadzu Nexera X2 ultra yüksek performans likit kromatografi (UHPLC), Shimadzu 8045 kütle spektrometri (triple quadrupole mass spectrometer, MS/MS, Shimadzu, Japan). Cihaz verileri Shimadzu Software ile hesaplandı (Şekil1).

**Örnek Hazırlama:** 100 mikrolitre (uL) kontrol solüsyonu santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 200 uL internal standart ve 50 uL distile su eklenip 5 saniye vortexle karıştırıldı. Elde edilen karışım 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant vialle alınıp schimadzu 8045 LC-MS/MS cihazında ölçüldü. İnterferans çalışması için plazma üzerine 50 uL radyopak madde eklendi ve vortekslenerek ölçüm yapıldı. Her ölçüm birer dakikalık aralarla ardışık 3 tekrar ile yapıldı ve alan değerleri ve konsantrasyon değerleri Shimadzu Software ile hesaplandı. Aynı işlem 7 farklı radyopak madde için ayrı ayrı yapıldı. Her karışım için üç ölçümün alan ve konsantrasyon değerleri ortalamaları hesaplandı. Kontrol materyaline volüm genişlemesine bağlı oluşacak interferansı ekarte etmek için 50 uL distile su eklenerek elde edilen sonuçlar hedef değer olarak kabul edildi. Ticari firmaların telif hakkı nedeniyle radyopak maddelerin ticari isimleri yerine RM1'den RM7'e kadar isim kodlaması yapıldı. Çalışmada insan veya hayvan kaynaklı herhangi bir kan veya doku örneği kullanılmadığı için etik kurul onayı gerekmemektedir.

**Bias:** Radyopak madde (RM1-7) eklendikten hemen sonra yapılan ölçümde meydana gelen yüzde sapma miktarı

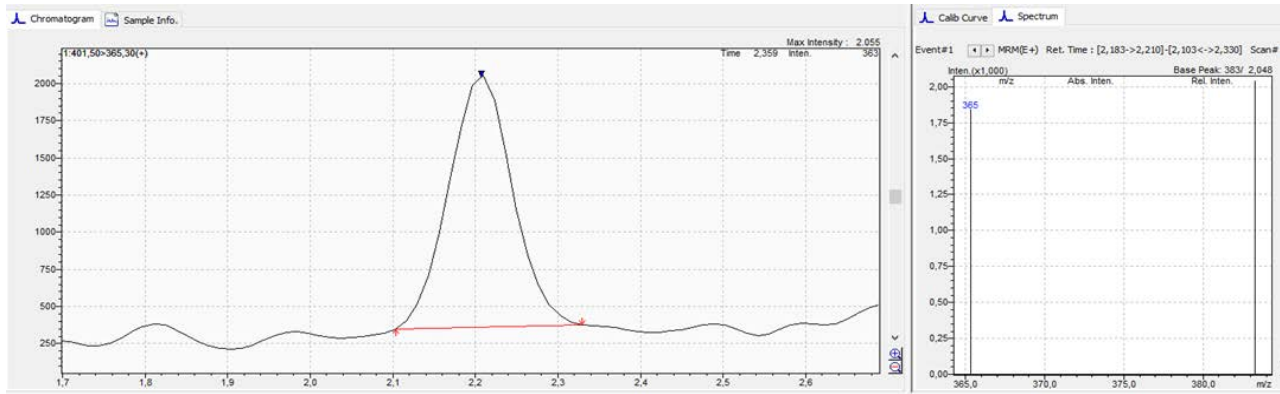
$$\text{bias} = \frac{V(\text{KM}+\text{RM}) - V(\text{KM}+\text{distile su})}{V(\text{KM}+\text{distile su})} \times 100$$

## Bulgular

Radyopak maddelerin eklenmesiyle elde edilen sonuçlar ile 50 uL distile su eklenerek elde edilen hedef değer arasındaki farklar her radyopak madde için hesaplanarak sapma miktarları ve yüzdeleri (bias) kaydedildi. Tüm ölçümlerde retansiyon zamanları birbirine yakın ve beklenen zamanlarda elde edildi ve zaman kayması oluşmadı. İnternal standart kullanılarak yapılan ölçümlerde konsantrasyon aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. 7 farklı Radyopak maddeden kaynaklı hedef değerden sapma yüzdeleri %5,14 -81,08 arasında değişiklik göstermiştir. En az sapma miktarı %5,14 ile gadabutrol (604.72 mg/mL) adlı radyopak maddede gerçekleşmiştir. Aynı miktar ioheksol (755 mg/mL) içeren 2 farklı ticari üründen RM3 eklenen materyalde RM2'ye göre 2,97 kat fazla sapma meydana gelmiştir. Gadopentetik asit dimeglumin tuzu (RM4, 469.01 mg/mL) ile yapılan çalışmada sapma %33.74 oranında gerçekleşmiştir. Aynı miktar gadodiamid (287 mg/mL) içeren iki ticari ürünle (RM5, RM6) yapılan çalışmada bariz iki farklı sonuç elde edilmiştir. RM5 ile yapılan çalışmada %10.21 oranında RM6 ile yapılan çalışmada bunun 7.94 katı kadar %81.08 oranında yanlış yüksek sonuç elde edilmiştir. İoversol (741 mg/mL) içerikli RM7 adlı madde yapılan çalışmada %43.15 oranında yanlış yüksek sonuç elde edilmiştir.

Tablo.1 Radyopak madde eklendikten sonra yapılan ölçümde meydana gelen sapma miktarları ve kullanılan etken maddeler  
KM: Kontrol materyali, RM1-7: Yedi farklı ticari radyopak madde kodu

	Retansiyon Zamanı (sn)	Konsantrasyon (ng/ml)	Sapma miktarı (ng/ml)	BiAS(%)	Etken madde
KM + distile su (hedef değer)	3,434	32,68	-	-	-
KM +RM1	3,106	34,36	1,68	5,14	gadobutrol, 604.72 mg/mL
KM + RM2	3,128	36,30	3,62	11,08	ioheksol, 755 mg/mL,
KM+ RM3	3,26	43,46	10,77	<b>32,96</b>	ioheksol, 755 mg/mL
KM+ RM4	3,308	43,71	11,03	<b>33,74</b>	gadopentetik asit dimeglumin tuzu, 469.01 mg/mL
KM+ RM5	3,367	36,02	3,34	10,21	gadodiamid, 287 mg/mL
KM+ RM6	3,64	59,18	26,50	<b>81,08</b>	gadodiamid, 287 mg/mL
KM+ RM7	3,129	46,79	14,11	<b>43,15</b>	ioversol, 741 mg/mL



Şekil 1. 25[OH]D kromatogramı

## Tartışma

D vitamini eksikliği tanı ve tedavisi için, depo form olan 25[OH]D seviyesinin doğru tespit edilmesi ve minimum interferansın görüldüğü yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. İmmunoassay metod rutinde sıklıkla kullanılmasına rağmen endojen ve ekzojen kaynaklı antikörlerle yarışmalı inhibisyona girmesinden dolayı hatalı ölçümlerle karşılaşılabilir (7-9). Bu nedenle doğru sonucun elde edilmesi için referans metod kullanılması hata oranlarının ve buna bağlı morbiditenin azaltılmasına katkı sağlayabilir. 25[OH]D vitamini ölçümünde LC-MS/MS tekniği Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) tarafından "referans metod" olarak kabul edilmiştir (10). LC-MS/MS referans yöntem olmasına rağmen, örnek matriksteki endojen (karbonhidrat, lipidler, fosfolipitler, proteinler, safra tuzları vb.) ve ekzojen bileşenler (ilaç ve yardımcı maddeleri, laboratuvar eşyalarından süzülebilir bileşenler, analit dengeleyiciler, numune hazırlama reaktifleri) ölçüm sırasında matrix etkisi ile interferansa neden olmaktadır (11). Sayısız ksenobiyotiklerin hangi testi ne kadar etkilediğine dair yeterli veri bulunmamaktadır. Bu moleküller LC-MS/MS tekniğinde kandaki yoğunluğuna göre analitin iyonizasyonunu bozarak interferansa neden olur (12). Matriks etkisi adı verilen bu interferans ilk defa Tang ve Kebarle tarafından tanımlanmıştır ve analitin iyonizasyon verimliliği değiştiğinde ortaya çıkmaktadır. Matrikste bulunan diğer organik bazların konsantrasyonları arttıkça analitlerin elektrosprey tepkileri etkilenmektedir (13). Analitin iyonize olması elektrosprey iyon kaynağına giren matrikse bağlıdır. Bonfiglio ve arkadaşları bir bileşiğin kimyasal doğasının matriks etki derecesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Aynı kütle spektrometrik koşullarda dört bileşiğin farklı polaritelerini içeren bir araştırmada, en poların en büyük iyon bastırma oranına sahip olduğu ve en az poların iyon bastırma tarafından daha az etkilendiği tespit edilmiştir (14). Görüntüleme tekniklerinde sıkça kullanılan radyopak maddelerin kanda kalma sürelerine göre ölçüm yöntemlerini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Hastanelerde klinisyen hastaları uyarmadıkça aynı gün çekimi yapılan görüntüleme tetkiklerinden sonra alınan kan örneklerindeki radyopak maddelerin yanlış yüksek veya yanlış düşük sonuçlara neden olması kuvvetle muhtemeldir. Yaptığımız deneysel interferans çalışma ile hastanelerde sıkça kullanılan 7 farklı ticari markaya sahip radyopak maddenin 25[OH]D sonuçlarını nasıl etkilediğini araştırdık. %5.14'den %81.08'e kadar farklı oranlarda yanlış yüksek sonuçlarla karşılaştık. En fazla yanlış yüksek sonuca neden olan etken madde %81.08 ile gadodiamid (RM6, 287 mg/mL) oldu. Gadodiamid (RM6, 287

lanmıştır ve analitin iyonizasyon verimliliği değiştiğinde ortaya çıkmaktadır. Matrikste bulunan diğer organik bazların konsantrasyonları arttıkça analitlerin elektrosprey tepkileri etkilenmektedir (13). Analitin iyonize olması elektrosprey iyon kaynağına giren matrikse bağlıdır. Bonfiglio ve arkadaşları bir bileşiğin kimyasal doğasının matriks etki derecesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Aynı kütle spektrometrik koşullarda dört bileşiğin farklı polaritelerini içeren bir araştırmada, en poların en büyük iyon bastırma oranına sahip olduğu ve en az poların iyon bastırma tarafından daha az etkilendiği tespit edilmiştir (14). Görüntüleme tekniklerinde sıkça kullanılan radyopak maddelerin kanda kalma sürelerine göre ölçüm yöntemlerini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Hastanelerde klinisyen hastaları uyarmadıkça aynı gün çekimi yapılan görüntüleme tetkiklerinden sonra alınan kan örneklerindeki radyopak maddelerin yanlış yüksek veya yanlış düşük sonuçlara neden olması kuvvetle muhtemeldir. Yaptığımız deneysel interferans çalışma ile hastanelerde sıkça kullanılan 7 farklı ticari markaya sahip radyopak maddenin 25[OH]D sonuçlarını nasıl etkilediğini araştırdık. %5.14'den %81.08'e kadar farklı oranlarda yanlış yüksek sonuçlarla karşılaştık. En fazla yanlış yüksek sonuca neden olan etken madde %81.08 ile gadodiamid (RM6, 287 mg/mL) oldu. Gadodiamid (RM6, 287

mg/mL), 32.68 ng/ml olan hedef değeri 59.18 ng/ml olarak hatalı yüksek ölçüme neden olmuştur. Aynı oranda etken madde içeren RM5 kodlu ürünle yapılan çalışmada daha düşük oranda (%10.21) yanlış yüksek sonuç elde edilmiştir. Aynı etken maddeyi içeren iki farklı ticari üründen RM6 da meydana gelen sapma yüzdesi RM5'in 7.94 katı kadar olması ticari ürünlerde kullanılan yardımcı maddelerin konsantrasyon farklılığına bağlı olabilir. İoversol (741 mg/mL) içeren RM7 maddesiyle %43.15, gadopentetik asit dimeglumin tuzu (469.01 mg/mL) içeren RM4 maddesinde %33.74 oranında hatalı yüksek sonuç elde edilmiştir. Aynı miktar iohexsol (755 mg/mL) içeren 2 farklı ticari üründen RM3 eklenen materyalde RM2'ye göre 2.97 kat fazla sapma meydana gelmiştir. En az analitik hatanın RM1, RM2 ve RM5 ticari ürünlerinde meydana gelmesi rutin kullanımda tercih nedeni olabilir. Hatalı yüksek sonuçların elde edilmesi ölçüm sırasında iyonizasyonun belirgin şekilde değiştiğini göstermektedir. İyonizasyon etkilenmesine rağmen yakalama (retention) zamanlarında kayma gözlemlenmemiştir. Fakat analit ve radyopak madde birlikteliği ile iyonizasyon verimliliğinin değişimine bağlı interferans gerçekleşmiştir. King ve arkadaşları matriks etkisinin gaz fazına geçiş safhasında analitik iyonlar ve uçucu olmayan matriks molekülleri arasındaki yarışma sonucu olduğunu deneysel olarak gösterdiler. Analitin iyonizasyonunda bilinmeyen bir mekanizma ile uçucu olmayan moleküllerin müdahalesinin olduğu sonucuna vardılar (15).

D vitamini eksikliğinin doğru tespit edilmesi kemik rezorpsiyonunun arttığı durumun yol açacağı komplikasyonların önlenmesi açısından önemlidir. Tespit edildiğinde yerine koyma tedavisinin yapılması osteomalaziyi önleyecektir. Çalışmamızda kullandığımız radyopak maddeler yanlış tanı ve tedaviye neden olabilecek riskli bir durumu ortaya çıkarmaktadır. Hastanelerde kan alma işlemi yapılmadan önce radyopak madde uygulaması yapıp yapılmadığı sorgulanmadığından 25[OH]D düzeyinin hatalı yüksek ölçülmesi klinisyeni yanlış yönlendirilebilir. D vitamini replasmanı alan bir hastanın kontrol kanında hatalı yüksek ölçüm ile hatalı intoksikasyon tanısı, replasman tedavisinin sonlandırılmasına yol açabilir. Eksiklik olduğu halde normal sonuç da verilebilir. Asemptomatik kanser metastazı olan hiperkalsemik bir hastada D vitamini düzeylerinin yanlış yüksek verilmesi klinisyeni metastaz ön tanısından uzaklaştırıp D vitamini hipervitaminozuna yönlendirecektir. Böyle bir durumda hatalı hipervitaminoz tanısı alan ve kanser yayılımı olan hastanın müdahalesi gecikebilir.

## Sonuç

LC-MS/MS yönteminin kullanıldığı ölçümlerde kanda endojen ve ekzojen kaynaklı maddelerin interferansına karşı dikkatli olunmalıdır. Bu çalışma ile hastanelerde görüntüleme tekniklerinde sıkça kullanılan yedi farklı

radyopak maddenin D vitamini sonuçlarını interfere edebileceği gösterilmiştir. Bu tür interferansları önlemek için kontrastlı görüntülemeye hemen sonra 25[OH]D ölçümü yapılmamalıdır. Bu tür hatalara maruz kalma ihtimaline karşı kontrastlı çekimlerde daha az interferansın görüldüğü gadobutrol, 604.72 mg/mL (RM1) iohexsol, 755 mg/mL (RM2), gadodiamid, 287 mg/mL (RM5) içerikli radyopak maddeler tercih edilebilir. Hastanelere radyopak ürün temininin interferans çalışmalarına göre yapılması farkında olunmadan karşılaşılan laboratuvar hatalarının önlenmesine katkı sağlayacaktır.

## Kaynaklar

1. Stellato C, Adkinson Jr N. Pathophysiology of contrast media anaphylactoid reactions: new perspectives on an old problem. *Allergy*. 1998;53(12):1111-3.
2. Laroche D, Namour F, Lefrancois C, Aimone-Gastin I, Romano A, Sainte-Laudy J, et al. Anaphylactoid and anaphylactic reactions to iodinated contrast material. *Allergy*. 1999;54:13-6.
3. Morcos SK. Adverse reactions to iodinated contrast media. *Cancer Imaging: Elsevier*. 2008;2:97-106.
4. Fang N, Yu S, Ronis MJ, Badger TM. Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. *Experimental biology and medicine*. 2015;240(4):488-97.
5. Truffelli H, Palma P, Famigliani G, Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*. 2011;30(3):491-509.
6. Gönel A. Experimental investigation about impact of radioactivity on blood amino acid concentration measured through LC-MS/MS method. 2018;15(2):59-63
7. Farrell C-JL, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clinical chemistry*. 2012;58:3
8. García-González E, Aramendía M, Álvarez-Ballano D, Trincado P, Rello L. Serum sample containing endogenous antibodies interfering with multiple hormone immunoassays. *Laboratory strategies to detect interference*. *Practical laboratory medicine*. 2016;4:1-10.
9. Ismail AA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clinical chemistry*. 2005;51(1):25-6.
10. Binkley N, Sempos CT. Standardizing vitamin D assays: the way forward. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014;29(8):1709-14.
11. Kim H-J, Kang J-S. Matrix effects: Hurdle for development and validation of bioanalytical LC-MS methods in biological samples analyses. *Biodesign*. 2016;4(2):46-58.
12. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry*. 2005;38(4):328-34.
13. Tang L, Kebarle P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Analytical chemistry*. 1993;65(24):3654-68.
14. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1999;13(12):1175-85.
15. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2000;11(11):942-50.