

Dried Matrix Spots i LC-MS/MS- basert proteinanalyse

*Metodeoptimalisering for kvantifisering av
insulin og hCG i klinisk relevante
konsentrasjoner*

Elin Vyvy Tran



Masteroppgave i legemiddelanalyse
Master i Farmasi
45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2017

Dried Matrix Spots i LC-MS/MS- basert proteinanalyse

*Metodeoptimalisering for kvantifisering av
insulin og hCG i klinisk relevante
konsentrasjoner*

Elin Vyvy Tran

Seksjon for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2017

Veiledere:

Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Førsteamanuensis Astrid Gjelstad, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Cecilie Rosting, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

© Elin Vyvy Tran

2017

*Dried Matrix Spots i LC-MS/MS-basert proteinanalyse
Metodeoptimalisering for kvantifisering av insulin og hCG
i klinisk relevante konsentrasjoner*

Elin Vyvy Tran

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Sammendrag

I dette arbeidet ble to endogene proteiner benyttet som modellanalytter, insulin og humant koriongonadotropin (hCG). Målet med arbeidet var å kunne bestemme referansenivåer av proteinene fra *dried matrix spots* (DMS). Det ble tatt utgangspunkt i eksisterende analysemetoder for insulin og hCG, som i dette arbeidet ble videreutviklet og optimalisert.

Metoden for bestemmelse av insulin ble optimalisert ved å inkorporere reduksjon av insulin i metoden. Ved bruk av væskkromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS) ble insulin analysert basert på B-kjeden. Arbeidet startet med å undersøke om et ti ganger overskudd av reduksjonsreagenset tris-(2-karboksyetyl)-fosfin hydroklorid i forhold til antallet disulfidbindinger gav fullstendig reduksjon av intakt insulin. Metoden for analyse av B-kjeden ble videre optimalisert ved å variere kollisjonsenergi i produktionskann og selektiv reaksjonsmonitorering. Det ble estimert en fire ganger lavere deteksjonsgrense (LOD) med den optimaliserte metoden. Videre ble stabiliteten av B-kjeden undersøkt på benk i fire timer og i injektor i 24 timer.

I arbeidet med hCG ble den konvensjonelle LC-MS/MS-metoden overført til et nanosystem, og videre optimalisert. Metoden ble optimalisert ved å endre kollisjonsenergi, reløsningsvolum og injeksjonsvolum. Den optimaliserte metoden genererte lavere LOD for hCG i fullblod.

Den optimaliserte nano-LC-MS/MS-metoden for hCG ble undersøkt på fullblod, serum, plasma og urin avsatt på vannløselig karboksymetylcellulose (CMC) og kommersielle prøvekort (DMPK-C). CMC genererte lavere LOD-verdier for hCG i alle matriksene. Estimerte LOD-verdier i fullblod, serum og urin avsatt på CMC var innenfor referanseområdet for hCG.

Det ble utført en metodeevaluering av hCG fra *dried serum spots* (DSS) på CMC og DMPK-C kort med hensyn til linearitet, nøyaktighet og presisjon. En kvadratisk vektet kalibreringskurve ble satt opp i konsentrasjonsområdet 0,01-1,0 IE/mL for CMC og 0,05-1,0 IE/mL for DMPK-C. For CMC var metodens nøyaktighet 84-111 % (angitt som prosent utbytte i forhold til sann verdi) og presisjon $\leq 26,3$ % (angitt som prosent relativt standard avvik). Kalibreringskurvene for CMC og DMPK-C ble videre benyttet til å estimere konsentrasjonen av hCG i en ukjent serumprøve fra en pasient diagnostisert med testikkelkreft.

Konsentrasjonen avsatt på CMC og DMPK-C ble estimert til henholdsvis 5,5 og 5,4 IE/mL hCG. Resultatene tydet på at CMC var et minst like godt egnet materiale for DMS som de kommersielle prøvekortene.

Det ble for første gang estimert LOD-verdier for hCG innenfor referanseområdet fra 15 µL biologisk matriks avsatt på CMC. Overføring av metoden til nanosystemet og videre optimaliseringer genererte betydelig lavere LOD-verdier for hCG. Resultatene tydet på at nano-LC-MS/MS-metoden egnet seg for analyse av referansenivåer av hCG i serum, fullblod og urin med CMC som prøvetakingsmateriale.

Forord

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til mine dyktige og inspirerende veiledere Cecilie Rosting, Trine Grønhaug Halvorsen og Astrid Gjelstad for hjelp og veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Dere har engasjert og motivert, og jeg har lært så mye av dere. Tusen takk! En spesiell takk til Cecilie og Trine for hjelp med store og små problemer på laboratoriet, og konstruktive tilbakemeldinger under skriveprosessen. Takk til Cecilie, for din positivitet, oppmuntring og omtenkksomhet.

Takk til alle ved avdeling for legemiddelanalyse for et trivelig og inkluderende arbeidsmiljø, og for all praktisk og faglig hjelp jeg har fått. Jeg kommer til å savne kakefredager og lunsj på trappen ute i solen. Dere er en herlig gjeng!

Videre vil jeg takke mine unike medstudenter Bassem, Patricio, Gladys, Ida og Clarissa for et sosialt og morsomt år! Det har vært så hyggelig å dele kontor med dere, og ikke minst bli bedre kjent med dere.

En stor takk til Vu og Kieu for korrekturlesing av masteroppgaven min.

Takk til min familie og mine venner for støtte og oppmuntrende ord.

Sist, men ikke minst vil jeg takke Nguyen, min aller største støttespiller gjennom hele studiet. For din tålmodighet, oppmuntring og din evne til å lytte! Jeg gleder meg til å tilbringe mer tid med deg.

Oslo, mai 2017

Elin Vyvy Tran

Innholdsfortegnelse

1	Forkortelser	1
2	Innledning.....	4
2.1	Bakgrunn	4
2.2	Hensikt.....	5
3	Teori	7
3.1	<i>Dried matrix spots</i>	7
3.1.1	<i>Dried blood spots</i>	7
3.1.2	Ulike biologiske matriser	7
3.1.3	Vannløselige materialer.....	8
3.1.4	Karboksymetylcellulose	9
3.2	Biomarkører.....	10
3.2.1	Proteiner	10
3.3	Insulin	11
3.3.1	Struktur.....	11
3.3.2	Biologisk forekomst og funksjon	12
3.4	hCG.....	13
3.4.1	Struktur.....	13
3.4.2	Biologisk forekomst og metabolisme.....	14
3.5	Prøveopparbeidelse av biologiske proteinprøver fra <i>dried matrix spots</i>	15
3.5.1	<i>Bottom-up</i> -strategi.....	15
3.5.2	Immunoekstraksjon	16
3.5.3	Fast-fase-ekstraksjon.....	17
3.5.4	Proteinfelling.....	17
3.6	Kromatografisk separasjon	18
3.6.1	Væskrokromatografi	18
3.6.2	Omvendt-fase-kromatografi	19
3.6.3	Nano-LC.....	19
3.7	Massespektrometri.....	20
3.7.1	Elektrosprayionisering	20
3.7.2	Kvadrupolanalysator	22
3.7.3	Tandem massespektrometri.....	22

3.8	Proteinanalyse ved bruk av LC-MS/MS.....	24
3.8.1	Kvalitativ analyse.....	25
3.8.2	Kvantitativ analyse.....	25
3.8.3	Matrikseffekter.....	27
4	Materialer.....	28
4.1	Kjemikalier, analytter og utstyr.....	28
4.2	Fullblod, serum, plasma og urin.....	32
4.3	Tillaging av løsninger.....	32
4.3.1	Løsning.....	32
4.3.2	Stamløsning og arbeidsløsning.....	32
4.3.3	Intern standard.....	33
4.3.4	Løsninger til kvalitetskontroll.....	33
4.3.5	Løsninger til immunoekstraksjon av hCG.....	34
4.3.6	Løsninger til tryptisk proteolyse av hCG.....	34
4.3.7	Løsninger til SPE av peptider fra hCG.....	35
4.3.8	Løsninger til reduksjon av insulin.....	35
4.3.9	Mobilfaser og andre løsninger.....	35
4.4	Tillaging av utstyr.....	36
4.4.1	Mikrokolonner til SPE.....	36
5	Metode.....	37
5.1	Prøvepåsetting, oppløsning og eluering.....	37
5.1.1	Prøvepåsetting på materiale.....	37
5.1.2	Oppløsning av DMS med hCG på CMC-materiale.....	37
5.1.3	Eluering av hCG i DMS fra DMPK-C kort.....	38
5.2	Immunoekstraksjon.....	38
5.3	Trypsinering.....	39
5.4	SPE.....	39
5.5	Insulin – reduksjon.....	40
5.5.1	Reduksjon.....	40
5.6	Instrumentelle betingelser.....	40
5.6.1	HPLC-parametere.....	41
5.6.2	MS/MS-parametere.....	43
5.7	Beregninger.....	45

5.8	Metodeevaluering av hCG i <i>dried serum spots</i>	46
5.8.1	Kalibreringskurve, linearitet og nedre kvantifiseringsgrense	46
5.8.2	Nøyaktighet	46
5.8.3	Presisjon	46
5.9	Dataverktøy	47
5.9.1	ProteinProspector	47
6	Resultater og diskusjon	48
6.1	Insulin	49
6.1.1	Reduksjon av insulin	49
6.1.2	Optimalisering av MS/MS	50
6.1.3	Stabilitet av insulin.....	54
6.2	hCG.....	55
6.2.1	Optimalisering av prøveopparbeidelse og nano-LC-MS/MS.....	55
6.2.2	Analyse av hCG fra ulike biologiske matriser	60
6.2.3	Metodeevaluering av hCG fra <i>dried serum spots</i>	64
6.2.4	Analyse av serum fra pasient diagnostisert med testikkelkreft	68
7	Konklusjon	69
8	Videre arbeid.....	70
	Litteraturliste	71

1 Forkortelser

ABC	<i>Ammonium bicarbonate</i> / ammoniumbikarbonat
ACN	<i>Acetonitrile</i> / acetonitril
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> / kollisjonsindusert dissosiasjon
CMC	<i>Carboxymethyl cellulose</i> / karboksymetylcellulose
CPDA-1	<i>Citrate phosphate dextrose-adenine</i> / citrat fosfat dekstrose-adenin
Da	Dalton
DBS	<i>Dried blood spots</i>
DMS	<i>Dried matrix spots</i>
DSS	<i>Dried serum spots</i>
DTT	<i>1,4-dithiothreitol</i> / 1,4-ditiotreititol
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> / elektrosprayionisering
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i> / humant koriongonadotropin
hCG α	α -subenhet av hCG
hCG β	β -subenhet av hCG
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> / humant immunsviktvirus
HPLC/LC	<i>High-performance liquid chromatography</i> / væskechromatografi
IAA	<i>Iodoacetic acid</i> / 2-jodeddiksyre
IS	<i>Internal standard</i> / intern standard
is β T5	Intern standard for β T5

Forkortelser

kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> / væskekromatografi koblet til tandem massespektrometri
LLOQ	<i>Lower limit of quantification</i> / nedre kvantifiseringsgrense
LOD	<i>Limit of detection</i> / deteksjonsgrense
LOQ	<i>Limit of quantification</i> / kvantifiseringsgrense
<i>m/z</i>	<i>Mass-to-charge ratio</i> / masse-ladningsforhold
MeOH	<i>Methanol</i> / metanol
MS	<i>Mass spectrometry</i> / massespektrometri
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> / tandem massespektrometri
Mw	<i>Molecular weight</i> / molekylvekt
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> / fofatbufret salin
PEG	<i>Polyethylene glycol</i> / polyetylenglykol
Q	<i>Quadrupole mass analyzer</i> / kvadrupol masseanalysator
QC-prøver	<i>Quality control samples</i> / kvalitetskontrollprøver
QqQ	<i>Triple quadrupole</i> / trippelkvadrupol
rpm	<i>Revolutions per minute</i> / omdreininger per minutt
RSD	<i>Relative standard deviation</i> / relativt standardavvik
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> / fast-fase-ekstraksjon
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i> / selektiv reaksjonsmonitorering
TCEP	<i>Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride</i> / tris-(2-karboksyetyl)-fosfin hydroklorid

TFA *Trifluoroacetic acid* / trifluoreddiksyre

ULOQ *Upper limit of quantification* / øvre kvantifiseringsgrense

WADA *World Anti-Doping Agency*

2 Innledning

2.1 Bakgrunn

Dried blood spots (DBS) er en teknikk for blodprøvetaking som de siste årene har fått økt oppmerksomhet og interesse [1]. Grunnen til dette er dens mange fordeler, som gjør prøvetakingen enklere og raskere sammenlignet med tradisjonell venepunksjon [2]. Bruken av DBS i forskning og antall publikasjoner relatert til DBS har økt betydelig de siste årene [3]. Teknikken ble først introdusert i 1963 av Guthri og Susi da den ble benyttet på nyfødte til screening av alvorlige medfødte sykdommer [1, 4]. I dag er DBS også interessant i områder som rettstoksikologi, dopingtesting, legemiddelmonitorering, toksikokinetiske og farmakokinetiske studier [3].

Teknikken er basert på at et lite blodvolum fra et stikk i huden avsettes på et filterpapir, tørkes og sendes til laboratorium for analyse. Prøvetakingen er mindre invasiv og teknikken kan utføres av pasienten selv i sitt eget hjem [5]. Et lite prøvevolum er også fordelaktig i forskningssammenheng, for eksempel i prekliniske studier med gnagere. Ved bruk av DBS vil mengden blod som må tappes fra gnagere reduseres, og dette er fordelaktig da de i utgangspunktet har et begrenset blodvolum [6]. Venepunksjon kan være skremmende og smertefullt, spesielt for barn og eldre, og derfor er teknikken svært godt egnet i disse gruppene. På filterpapir er de fleste substanser stabile i en uke eller lenger i romtemperatur, og det er derfor ikke nødvendig å fryse ned prøvene før analyse [5]. Grunnen til den økte stabiliteten i romtemperatur er at enzymer inaktiveres når prøver tørker og dehydrerer [7]. Ved bruk av DBS reduseres også risikoen for spredning av smittsomme sykdommer, da tørking bidrar til å inaktivere mange virus, som for eksempel HIV [8]. Dette fører til reduserte kostnader som følge av færre krav til oppbevaring og transport av prøver, og prøvene kan sendes som vanlig post [4, 9].

Interessen for DBS har økt som følge av teknikkens mange fordeler, men bruken er fortsatt begrenset. For analytter som forekommer i lave konsentrasjoner er det kritisk at hele volumet som avsettes, typisk 5-10 μL per spot, blir tilgjengelig [1, 10]. Analyse av lavt forekommende analytter fra små prøvevolum krever også mer følsomme analyseinstrumenter [10]. Hematokritverdi i blod påvirker blodets viskositet og hvordan blodet spres. Dette er viktig å ta i betraktning hvis kun deler av avsatt prøve tas med videre [7].

Kommersielt tilgjengelig materiale for DBS består av uløselig cellulose, og avsatt prøve må elueres ut av materialet slik at det blir tilgjengelig for videre prøveopparbeidelse og analyse. Eluering av prøve er et kritisk trinn da det er viktig at hele det avsatte prøvevolumet blir tilgjengelig fordi volumet er så lite [1]. I 2012 introduserte forskere ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo to vannløselige medium for DBS, alginat og kitosan. I forskningen ble det brukt små legemiddelsubstanser som modellanalytter. Det ble vist at de vannløselige materialene generelt gav høyere utbytte sammenlignet med de kommersielle kortene [11]. Senere ble det vist at vannløselig materiale også var egnet som DBS-medium for proteiner, demonstrert med et kommersielt materiale av karboksymetylcellulose (CMC) [1]. Ved å bruke vannløselig materiale blir avsatt prøve tilgjengelig ved oppløsning, og dermed kan det kritiske elueringstrinnet elimineres.

I forskningen som er gjort med CMC som prøvetakingsmateriale ble de endogene proteinene insulin og humant koriongonadotropin (hCG) undersøkt, og forskningen på proteinene er for det meste gjort i fullblod. Deteksjonsgrensen (LOD) for insulin i fullblod ble estimert til 30 ng/mL, og dette er langt høyere enn referanseområdet på 0,083-0,833 ng/mL for fastende insulin [12]. LOD for hCG i fullblod ble estimert til 0,1 IE/mL, som er for høyt til å detektere øvre referansegrense på 0,0007-0,0054 IE/mL hos menn og ikke-gravide kvinner [1, 13].

2.2 Hensikt

Masteroppgaven innehar to overordnede mål. Første mål er å nå lavere LOD for insulin og hCG fra *dried matrix spots* (DMS). Hensikten er å kunne måle referansenivåer i biologisk matriks. Basert på dette er det videre satt et mål om å få mer kunnskap om andre biologiske matrikser enn fullblod.

For å oppnå målene ble følgende delmål satt:

- Optimalisere prøveopparbeidelse og massespektrometriske betingelser for insulin.
- Overføre og optimalisere analysemetode for hCG fra DBS til et nanosystem basert på væskechromatografi koblet til massespektrometri.
- Teste ulike biologiske matrikser i bestemmelse av hCG fra DMS.

- Utføre en evaluering av analysemetoden for bestemmelse av hCG fra *dried serum spots*.
- Sammenligne kommersielle prøvetakingskort og vannløselig materiale som medium for DMS.

3 Teori

3.1 *Dried matrix spots*

3.1.1 *Dried blood spots*

Dried blood spots (DBS) er en alternativ prøvetakingsteknikk til tradisjonell venepunksjon, som er enklere å utføre og mindre invasiv. Teknikken for DBS utføres ved et stikk i enten finger, hæl eller tå med en steril lansett [10, 14]. Noen få dråper blod appliseres på et DBS-kort, som består av et absorberende og vanligvis cellulosebasert filterpapir. Videre lufttørkes de avsatte bloddråpene i romtemperatur i et par timer [14]. Hele eller deler av blodflekkene stanses ut, og ved bruk av vandige og organiske løsningsmidler kan analyttene ekstraheres ut fra filterpapiret [1].

3.1.2 Ulike biologiske matrikser

Prinsippet for DBS ble først benyttet for blodprøvetaking, og fullblod er fremdeles mye anvendt [7, 15]. Denne teknikken for innsamling av biologisk prøve er ikke begrenset til kun fullblod, men kan også brukes på andre biologiske matrikser [4].

Dried matrix spots (DMS) er en fellesbetegnelse på alle biologiske matrikser som avsettes på et DMS-materiale og inkluderer blant annet plasma, serum, urin og cerebrospinalvæske [15]. I legemiddelanalyse av pasientprøver kan det være et behov for å måle konsentrasjoner i både serum, plasma og fullblod, da variasjoner kan forekomme for disse matriksene [16]. Det kan være ønskelig med en enda mindre invasiv prøvetaking, og da kan spytt eller urin være et alternativ [9]. En utfordring med å benytte andre biologiske matrikser enn fullblod er at det kan være nødvendig med ekstra utstyr og klargjøring av biologisk prøve før avsetting på materiale. Til tross for dette har teknikken fortsatt mange fordeler. Behovet for et lite prøvevolum, færre krav til lagring og transport og økt stabilitet av analytt er noen fordeler ved å benytte DMS som prøvetakingsteknikk [1].

Fullblod

Fullblod består av røde blodceller (erytrocytter), hvite blodceller (leukocytter), blodplater (trombocytter) og en væskefase. Væskefasen kalles plasma og inneholder organiske og uorganiske substanser. Plasma utgjør 55 % og blodcellene 45 % av det totale blodvolumet. Erytrocytter er den høyest forekommende blodcelletypen og utgjør 98 % av det totale blodcellevolumet [14].

Plasma

Plasma er den klare gule væsken som legger seg på toppen etter sentrifugering av fullblod. Plasma består av 90 % vann og er homogent i motsetning til fullblod. De resterende 10 % av plasma består av proteiner og uorganiske eller organiske ioner. Plasma inneholder fibrinogen, et protein som bidrar til koagulasjon. Innholdet av fibrinogen gjør det nødvendig å tilsette et antikoagulasjonsmiddel for å forhindre koagulasjon og stabilisere plasma [14]. Anti-koagulasjonsmidler, for eksempel heparin, tilsettes vanligvis i vakuumsrør før blod tappes [17].

Serum

Plasma uten fibrinogen og uten tilsatt antikoagulasjonsmiddel kalles serum. Serum lages ved å la blodet koagulere i vakuumsrør i 30-120 minutter før rørene videre sentrifugeres. I likhet med plasma vil serum være en gulfarget væskefase som legger seg på toppen etter sentrifugering [17].

Urin

Urin er en gul og klar væske som inneholder flere tusen ulike substanser. Variasjoner i mat- og væskeinntak gir variasjoner i urinens innhold, pH og volum. Urinens pH ligger mellom 4,6 og 8, og volumet mellom 500 og 2000 mL per dag [14].

3.1.3 Vannløselige materialer

DMS har som prøvetakings- og oppbevaringsformat mange fordeler som gjør teknikken svært nyttig i ulike sammenhenger. Små prøvevolumer er hensiktsmessig når blod skal tappes fra for eksempel nyfødte.

Små prøvevolum som appliseres på de kommersielle DMS-kortene og elueringsprosessen påvirker analysens følsomhet. Det kan være vanskelig å nå ønskede deteksjonsgrenser for analytter som forekommer i lave konsentrasjoner, og et høyt utbytte etter ekstraksjonstrinnet vil derfor være svært viktig for disse analyttene [1]. Ekstraksjon av analytter fra DMS-kort er tidskrevende og tar vanligvis en time [11]. Ofte er ekstraksjonen også ufullstendig [1]. Prøvene blir i tillegg fortynnet da det brukes noen hundre mikroliter ekstraksjonsvæske i prosessen, og dette påvirker analysens sensitivitet betydelig. Det kan derfor bli nødvendig å oppkonsentrere prøvene ved å fordampe og reløse prøvene i et mindre volum [11].

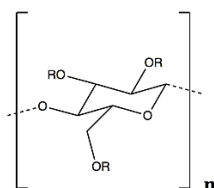
Ved å benytte vannløselig materiale for DMS begrenses utfordringene knyttet til de kommersielle DMS-kortene. Materialene kan løses fullstendig opp og dette gjør hele prøven tilgjengelig for videre prøveopparbeidelse og analyse. Elueringstrinnet elimineres og bruk av vannløselig materiale er dermed tidsbesparende. Karboksymetylcellulose er et eksempel på et slikt materiale [12].

3.1.4 Karboksymetylcellulose

Karboksymetylcellulose (CMC) er en langkjedet polymer, og et derivat av cellulose. Cellulose består av D-glukopyranose-monomerer, som alle har tre hydroksylgrupper (-OH). I CMC er hydrogen (-H) i en eller flere av hydroksylgruppene substituert med en karboksylmetylgruppe (-CH₂-COOH) [18]. Den generelle strukturen til CMC er skissert i **figur 3-1**.

Substitusjonsgrad er gjennomsnittlig antall substituerte hydroksylgrupper per glukoseenhet, og er viktig for vannløseligheten til CMC. Økende grad av substitusjon gir høyere vannløselighet [18, 19]. CMC vil være fullstendig løselig i vann ved en substitusjonsgrad over 0,4. Substitusjonsgraden for kommersielle produkter av CMC er typisk mellom 0,65 og 1,45.

CMC er et allsidig materiale grunnet dets egenskaper, og brukes blant annet som fortykningsmiddel og stabilisator i mat, farmasøytisk hjelpestoff og i sårbehandling [19].



Figur 3-1: Generell struktur til karboksymetylcellulose. R = H eller R = CH₂COOH.

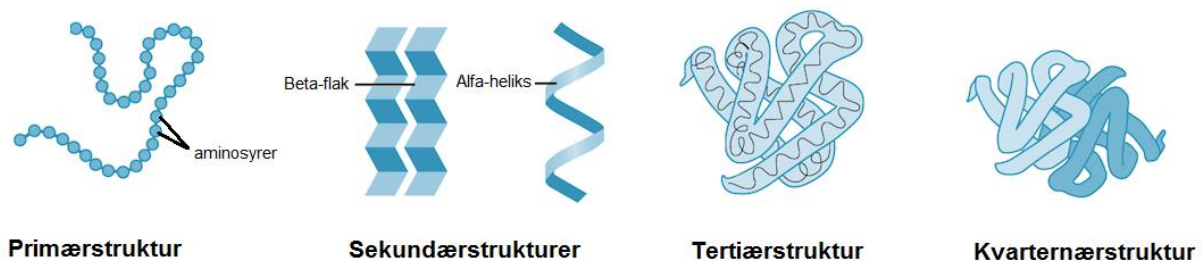
3.2 Biomarkører

En biomarkør er en biologisk substans som benyttes som indikator ved sykdomsdiagnostisering. Proteiner utgjør en stor andel av kliniske biomarkører, og kan måles i biologiske væsker og vev (celler). Det utføres både kvalitative og kvantitative målinger av biomarkører avhengig av sykdomstilstand og utvikling. Kvalitative målinger innebærer å identifisere og påvise tilstedeværelse eller fravær av biomarkører. Når det er ønskelig å undersøke konsentrasjonen av biomarkører og se på eventuelle endringer gjøres det kvantitative målinger [20].

3.2.1 Proteiner

Proteiner er en grunnleggende bestanddel i oppbyggingen av levende celler, og er essensiell i nesten alle biologiske prosesser [21]. Aminosyrer er byggesteinene i proteiner og består generelt av en aminogruppe, en karboksylgruppe og en spesifikk sidekjede. Totalt 20 ulike aminosyrer kan være bundet sammen av peptidbindinger og utgjør humane proteiner [22].

Fire strukturelle nivåer brukes til å beskrive proteinstrukturer som vist i **figur 3-2**. Proteinets sekvens av ulike aminosyrer beskrives som primærstruktur. Tredimensjonale strukturer langs aminosyresekvensen beskrives som proteinets sekundærstruktur. Tertiærstruktur beskriver hvordan hele proteinkjeder er foldet sammen. Proteiner kan bestå av to eller flere foldede polypeptidkjeder. Sammen danner de en tredimensjonal struktur, som beskrives som proteinets kvarternærstruktur [23].



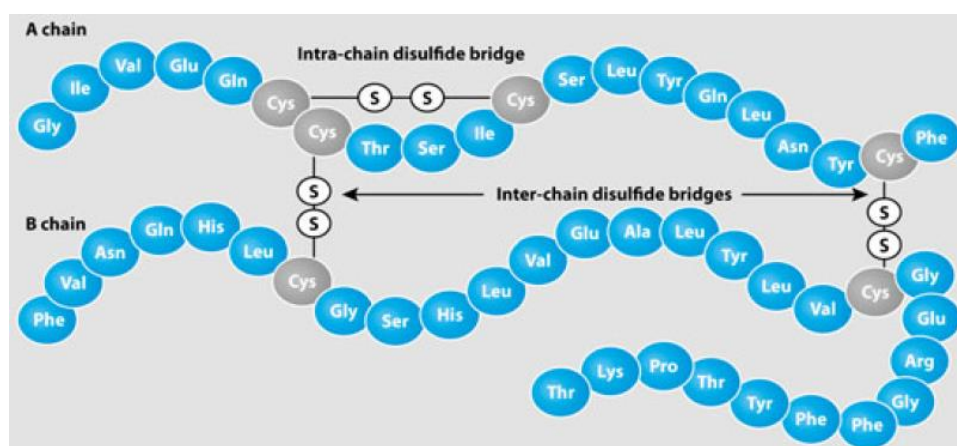
Figur 3-2: Proteinets fire strukturelle nivåer. Figur modifisert fra [24].

3.3 Insulin

Insulin er et endogent hormon som produseres i bukspyttkjertelen og er viktig for regulering av blodglukose [25, 26]. Insulin stimulerer fett- og muskelceller til økt opptak av glukose, og undertrykker glukosefrigjøring fra lever. Resultatet er nedsatt blodglukose, og dette gjør insulin egnet som legemiddel til bruk hos pasienter med diabetes [12, 26]. Ved å monitorere insulin kan hormonet brukes som sykdoms-markør for blant annet insulinresistens [25]. Insulin har et misbrukspotensiale som følge av anabole egenskaper, og står derfor oppført i den internasjonale dopinglisten til *World Anti-Doping Agency* (WADA) [12, 27].

3.3.1 Struktur

Humant insulin er bygget opp av totalt 51 aminosyrer (Mw = 5808 dalton (Da)) [12]. Insulin består av to peptidkjeder, en A-kjede og en B-kjede [28]. A-kjeden er bygget opp av 21 aminosyrer (Mw = 2377 Da), og B-kjeden av 30 aminosyrer (Mw = 3431 Da) [25, 28]. A- og B-kjeden er bundet sammen ved hjelp av to disulfidbindinger, mellom A7 og B7, og A20 og B19. Insulin har totalt tre disulfidbindinger, hvor den tredje er å finne i A-kjeden, mellom A6 og A11 [29]. Den primære strukturen til insulin er skissert i **figur 3-3**. Disulfidbindingene er viktig for proteinets stabilitet og funksjon, og hormonet deaktiveres hvis disse bindingene brytes [29].



Figur 3-3: Den primære strukturen til insulin. Figur hentet fra [30].

Under fysiologiske betingelser forekommer insulin som monomere, dimere og heksamere, avhengig av tilstedeværelsen av sink [29]. Insulin syntetiseres som monomere i β -celler i Langerhans' celleøyer i bukspyttkjertelen, og lagres i vesikler rike på Zn^{2+} - og Ca^{2+} . Her

lagres insulin som heksamere, hvor hvert kompleks stabiliseres av to Zn^{2+} -ioner. Ved utskillelse til blodet vil de metallstabiliserte kompleksene dissosieres til monomere, og være i likevekt med dimere. Monomerene er den aktive formen av insulin, som bindes til reseptorer og utøver en fysiologisk effekt [31].

3.3.2 Biologisk forekomst og funksjon

Insulinutskillelse fra β -celler reguleres direkte av glukosenivået i blod og er proporsjonal med glukosekonsentrasjonen som bindes til glukosereseptorer, GLUT2, på β -cellene i Langerhans' celleøyer [30, 32]. Ved høy konsentrasjon vil insulinutskillelsen øke, og ved lav konsentrasjon vil utskillelsen redusere [30]. Andre bidragsyttere til økt insulinutskillelse er ikke-esterifiserte fettsyrer, visse aminosyrer, sympatisk og parasympatisk stimulering [30].

Insulin har en halveringstid på cirka ti minutter og konsentrasjonen avhenger av når siste måltid ble inntatt. Insulin inaktiveres i lever og nyrer av enzymer og skilles ut i urin [33]. Referanseområdet for fastende insulin hos ikke-diabetikere er mellom 0,083 og 0,833 ng/mL [12].

Insulin påvirker glukose-, protein- og fettmetabolisme. Det bidrar også til cellevekst og replikasjon. Insulin er også viktig i kontroll av matinntak og kroppsvekt [30, 32, 34]. Insulinreseptorer forekommer i de fleste vev, men effektene utøves primært i lever, skjelettmuskler og fettvev [32]. Insulin er hovedsakelig en regulator i glukosehomeostasen, og opp- og nedregulerer opptaket av glukose i cellene [30]. Insulins effekter på glukosenivået utnyttes i behandling hos pasienter med diabetes, hvor insulinproduksjonen er utilstrekkelig for å holde nivået nede og normalt [32].

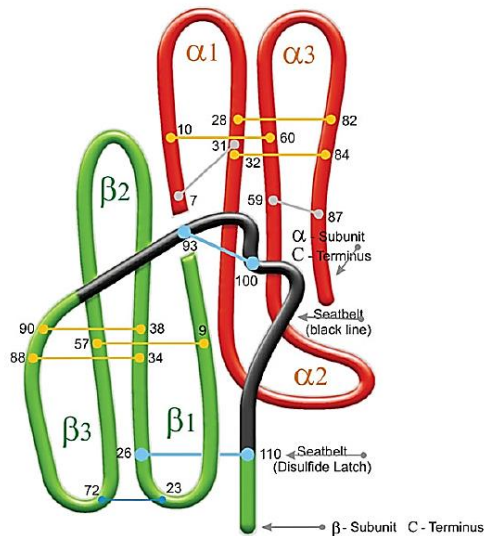
Insulin hemmer utskillelse av glukagon fra α -cellene i bukspyttkjertelen, stimulerer glykogenese og hemmer nedbrytning av glykogen. Den totale effekten er redusert konsentrasjon av glukose i blod [32]. Insulin stimulerer fettvev og skjelettmuskler til opptak av fettsyrer og videre syntetisering av triglyserider. Opptak av aminosyrer og proteinsyntese i lever, muskler og fettvev stimuleres samtidig som at lipolyse og proteolyse hemmes [30]. Insulins effekter bidrar til å øke energilageret i mange vev, og har dermed en anabol virkning [32]. Insulin står oppført i WADAs dopingliste som følge av de oppbyggende egenskapene og er forbudt i og utenfor konkurranse [27].

3.4 hCG

Humant koriongonadotropin (hCG) er et hormon som produseres i morkaken (placenta) under svangerskap. Hormonet finnes normalt bare i detekterbare nivåer hos gravide kvinner [35, 36]. hCG har mange funksjoner som er viktig for vekst av livmor og foster. Det skilles ut i urin og gir positivt utslag på graviditetstester hos gravide kvinner [37]. hCG brukes i behandling av infertilitet hos kvinner da det induserer follikkelmodning og eggløsning. hCG står oppført på WADAs dopingliste og er forbudt å bruke av mannlige idrettsutøvere både i og utenfor konkurranse [38]. hCG har prestasjonsfremmende egenskaper fordi det stimulerer egenproduksjon av testosteron, og blir derfor brukt ulovlig i forbindelse med konkurranser. Hormonet brukes også i kombinasjon med anabole steroider for å redusere risikoen for bivirkninger, som for eksempel redusert spermieproduksjon. En rekke tilstander gir økt produksjon av hCG, blant annet ulike kreftformer. hCG egner seg derfor som biomarkør ved gitte tilstander [39].

3.4.1 Struktur

hCG er et glykoprotein-hormon, et protein med kovalente bindinger til karbohydratkjeder [40]. Intakt hCG har en molekylvekt (Mw) på 37,5 kilodalton (kDa) [13]. Hormonet er en dimer og består av to subenheter, en α -subenhet (hCG α) og en β -subenhet (hCG β). Disse er bundet sammen med ikke-kovalente og ioniske interaksjoner [41]. hCG består av totalt åtte karbohydratenheter, og disse utgjør en tredjedel av massen til hCG. To karbohydratenheter er bundet til hCG α og seks til hCG β [42]. hCG hører til en familie av dimere glykoprotein-hormoner, som inkluderer luteiniserende hormon, tyreoidestimulerende hormon og follikkelstimulerende hormon [39, 43]. Hormonene består av en felles α -subenhet, bygget opp av 92 aminosyrer (Mw = 14 kDa), og en hormonspesifikk β -subenhet. Den unike β -subenheten av hCG er viktig for den biologiske aktiviteten og er bygget opp av 145 aminosyrer (Mw = 23,5 kDa) [13, 44]. Intakt hCG har totalt elleve disulfidbindinger, fem i hCG α og seks i hCG β [41]. Disulfidbindinger dannes mellom sidekjedene til aminosyren cysteine og holder segmenter av den sekundære strukturen til hver av subenhetene sammen [23]. Hver subenhet er orientert rundt tre disulfidbindinger og danner en cysteinknute, som bidrar til å stabilisere subenhetene [13, 45]. hCG-dimeren er skissert i **figur 3-4**.



Figur 3-4: Humant koriongonadotropin-dimer med α - og β -subenhet. Rød del indikerer α -subenhet. Grønn og svart del indikerer β -subenhet. Figur modifisert fra [46].

$hCG\alpha$ er konstant og identisk til α -subenhetene av hormonene i glykoproteinfamilien. $hCG\beta$ kan variere strukturelt avhengig av biologisk tilstand. Dette gjør at hCG finnes i flere varianter, kalt isoformer. $hCG\alpha$ og $hCG\beta$ kan også forekomme hver for seg som frie subenheter [47]. Det forekommer også fragmenter og degraderingsprodukter av hCG i blod og urin, som et resultat av metaboliske prosesser, syntetisering og degradering av hCG [39].

3.4.2 Biologisk forekomst og metabolisme

Under svangerskap produseres hCG i trofoblastceller i placenta, og konsentrasjonen av hormonet kan variere betydelig gjennom svangerskapet og fra kvinne til kvinne [35]. Monitorering av hCG tidlig i svangerskapet er nyttig i forhold til å avdekke komplikasjoner. Eksempler på dette er abort, ektopisk svangerskap og foster med Downs syndrom, hvor nivået av hCG avviker fra det normale forløpet [42].

Hos menn og ikke-gravide kvinner produseres hCG hovedsakelig i hypofysen, og øvre referansegrense for hCG i serum og urin er 0,0007-0,0054 IE/mL [13, 42]. Økte nivåer av hCG kan forekomme ved ulike tilstander, for eksempel ved trofoblastisk sykdom, eggstokk- og testikkelkreft og ikke-trofoblastiske svulster [39].

hCG elimineres hovedsakelig via lever, som står for metabolismen av cirka 80 % av blod-sirkulerende hCG . Cirka 20 % degraderes og skilles ut via nyrer [42].

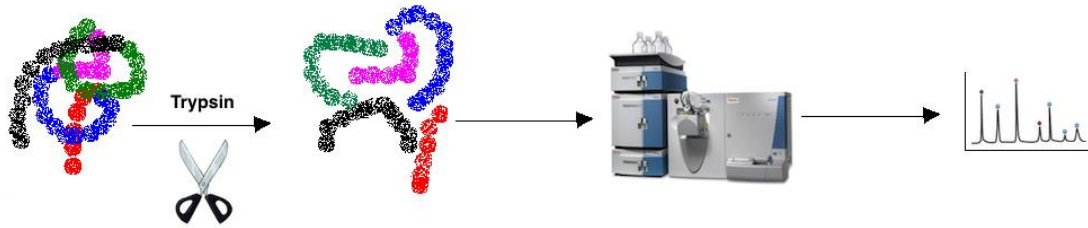
3.5 Prøveopparbeidelse av biologiske proteinprøver fra *dried matrix spots*

Biologiske proteinprøver er komplekse blandinger og kan inneholde ulike komponenter som på flere måter kan interferere med den kvalitative og kvantitative analysen av proteiner. Intakte proteiner er store og strukturelt kompliserte molekyler. Ofte er ikke proteinene kompatibel med analyseinstrumenter fordi de kan felle ut i separasjonskolonnen og tette systemet [7]. Matrikskomponenter kan gi unøyaktige data som følge av signalundertrykking og falske positive målinger [7, 17]. Kontaminerende komponenter kan forårsake skader på systemet og matriks kan i seg selv være inkompatibel med analyseinstrumentet [17, 48].

Prøveopparbeidelse er et kritisk trinn i bioanalyse. Hensikten er å klargjøre prøve ved opprensning, oppkonsentrering og overføring av analytt til en kompatibel matriks [7, 48]. Valg av prøveopparbeidelsesstrategi innenfor proteinanalyse avhenger blant annet av proteinets størrelse. hCG er et stort protein i forhold til insulin og krever en mer omfattende prøveopparbeidelse. I tidligere forsøk er det utført to ulike strategier for opprensning og oppkonsentrering av proteinene med CMC som medium for DMS, og de viktigste metodene vil bli nevnt i 6.1 og 6.2 [1, 12].

3.5.1 *Bottom-up*-strategi

Det er hovedsakelig to prøveopparbeidelsesstrategier som benyttes innenfor proteinanalyse, kalt *top-down* og *bottom-up*. Førstnevnte innebærer analyse av intakte proteiner [49]. *Bottom-up* er mest brukt i proteinanalyse basert på væskekromatografi koblet til massespektrometri, spesielt i storskalaanalyser av komplekse prøver [49, 50]. Væskekromatografi og massespektrometri vil bli beskrevet i henholdsvis 3.6.1 og 3.7. Strategien innebærer proteolytisk spaltning av proteiner til veldefinerte peptider før analyse, som oftest med trypsin [13, 51]. Prinsippet for *bottom-up* er vist i **figur 3-5**. Bedre separasjon og økt sensitivitet er noen av fordelene ved å bruke *bottom-up*, og dette er hensiktsmessig ved analyse av proteiner som forekommer i lave konsentrasjoner [49]. Ulemper med strategien er blant annet betydelig økt kompleksitet og ufullstendig proteinspaltning, som kan begrense proteinidentifikasjonen [10, 52].

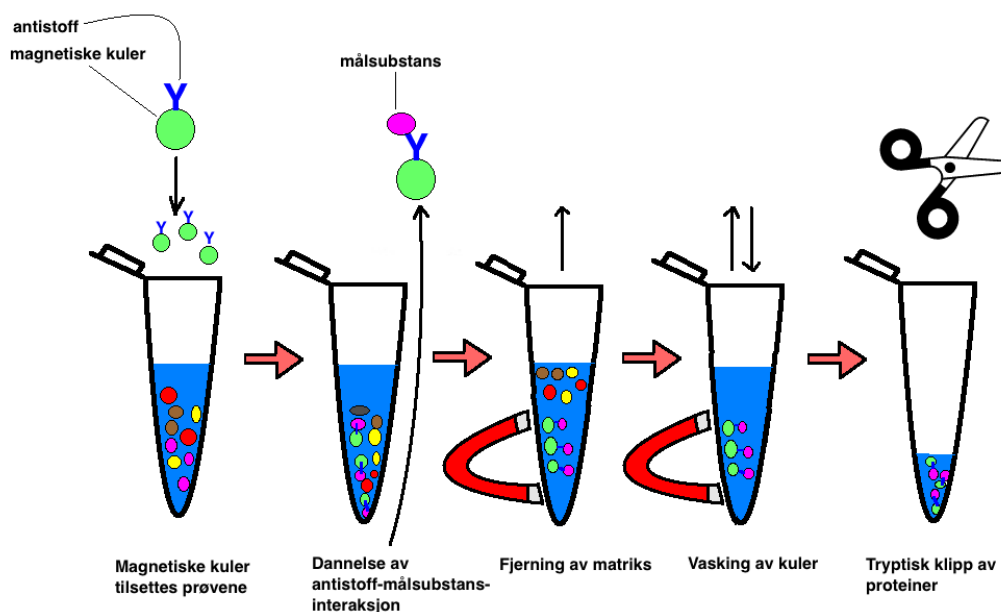


Figur 3-5: Prinsippet for prøveopparbeidelsesstrategien *bottom-up* i proteinanalyse basert på væske-kromatografi koblet til massespektrometri. Proteiner spaltes til peptider ved hjelp av proteolytiske enzymer, og spesifikke peptider analyseres.

Trypsin er en protease som spaltes proteiner ved aminosyrene lysin og arginin ved karboksyl-terminalen (C-terminalen), forutsatt at de ikke er bundet til prolin. Mange proteiner har en optimal avstand mellom lysin og arginin, som gir opphav til peptider som er godt egnet for analyse basert på massespektrometri [53]. For å gjøre de aktuelle aminosyrene mer tilgjengelig for tryptisk klipping kan proteinenes tertiærstruktur brytes. Dette kan utføres ved å redusere disulfidbindinger med reduseringsreagenset 1,4-ditiotreitol (DTT) i kombinasjon med høy temperatur, etterfulgt av alkylering med reagenset 2-jodeddiksyre (IAA) for å hindre gjendannelse av disulfidbindingene [54].

3.5.2 Immunoekstraksjon

Immunoekstraksjon er en selektiv prøveopparbeidelsesmetode for opprensning og oppkonsentrering av biologiske prøver, og involverer bruk av antistoffer med høy affinitet for en målsubstans [51]. I denne oppgaven er det monoklonale antistoffet E27 benyttet, som har affinitet for intakt hCG heterodimer og flere av dens isoformer [47]. Antistoffet kan komme i kontakt med målproteinene på flere måter, blant annet ved å være bundet til overflaten på små magnetiske kuler som tilsettes prøvene. For å isolere målproteinene benyttes en magnet som holder igjen kulene og målsubstansen når prøven fjernes. Kulene vaskes og reløses i et mindre volum for oppkonsentrering. Klipping av proteiner med trypsin kan skje direkte på kulene [51]. Prinsippet for immunoekstraksjon med magnetiske kuler er skissert i **figur 3-6**.



Figur 3-6: Prinsippet for immunoekstraksjon med magnetiske kuler.

3.5.3 Fast-fase-ekstraksjon

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) er en prøveopparbeidelsesmetode som brukes for å fjerne uønskede stoffer og oppkonsentrere analytter. Metoden er basert på analyttens fordeling mellom et fast stoff, kalt sorbent, og en væske. Fordelingen avhenger av analyttens egenskaper og interaksjon med sorbent og væske [17]. For oppkonsentrering kan analyttene reløses i et mindre volum etter eluering.

Konvensjonell SPE kan være tidskrevende som følge av flere trinn i prosedyren og lang ekstraksjonstid. Andre ulemper er høyt forbruk av løsemidler og reagenser. Miniaturiserte SPE-teknikker har lenge vært i bruk og er en økende trend. Teknikkene er tidsbesparende, mer miljøvennlig som følge av lavere forbruk av løsemidler og rimeligere enn konvensjonell SPE [55].

3.5.4 Proteinfelling

Proteinfelling er en prøveopparbeidelsesmetode som er mye benyttet for opprensning av biologiske prøver. Plasma og serum er de mest brukte biologiske matriksene i bioanalyse og har et proteininnhold på cirka 8 %. Disse proteinene vil i kontakt med mobilfase lett kunne felle ut i separasjonskolonnen og dette systemet, som følge av mobilfasens innhold av organiske løsningsmidler og buffersalter [14].

Prosedyren for proteinfelling innebærer å tilsette et fellingsreagens, riste og sentrifugere prøvene [28, 54]. Innenfor bioanalyse er organiske løsningsmidler som acetonitril, metanol og etanol mye benyttet til proteinfelling [7]. Optimalisering av volumforholdet mellom fellingsreagens og prøve gjør det mulig å benytte proteinfelling med små proteiner uten at disse feller ut [12]. Etter sentrifugering gjøres det uttak av den klare væsken over bunnfallet, kalt supernatant, som tas med videre i prøveopparbeidelsen eller injiseres direkte inn i analyseinstrumentet [14].

Proteinfelling er en rask og enkel prøveopparbeidelsesmetode basert på at proteiner denaturerer og feller ut i kontakt med eller ved tilstedeværelsen av et fellingsreagens [7, 17]. Metoden alene er ofte ikke tilstrekkelig for å få rene nok prøver da det kan være innhold av andre matrikskomponenter som kan interferere med analysen [7].

3.6 Kromatografisk separasjon

En effektiv separasjon av komponenter i biologiske proteinprøver er nødvendig for en tilstrekkelig sensitiv og nøyaktig analyse basert på massespektrometri. Separasjon bidrar til en mindre kompleks prøve og hindrer overlapping av signaler. Sistnevnte er spesielt viktig for proteiner som forekommer i lave konsentrasjoner da disse kan gi signaler som overlappes av signaler fra andre høyt forekommende matrikskomponenter [49].

Kromatografisk separasjon er separasjon av stoffer basert på fordeling mellom to ulike faser, kalt mobilfase og stasjonærfase. Mobilfasen er i bevegelse og transporterer stoffer. Stasjonærfasen er stillestående og kan bremse opp, retardere, transporten av stoffer. Retensjonstid er tiden stoffer bruker fra de injiseres i systemet til de gir maksimal respons i detektoren. Hvis forskjellen i retensjonstid for stoffer er stor nok, kan de bli separert fra hverandre [17].

3.6.1 Væskekromatografi

Væskekromatografi (HPLC, også forkortet LC) er den kromatografiske separasjonsmetoden som primært benyttes innenfor proteinanalyse [56]. Metoden benytter en væske som mobilfase, og mobilfasen pumpes med konstant hastighet gjennom en kolonne belagt med et materiale, stasjonærfasen [17]. Før injeksjon oppløses stoffene i en væske som er forlikelig med mobilfase. Væsken injiseres til mobilfasen og bringes videre inn i kolonnen hvor separasjonen skjer. Etter kolonnen detekteres analytter i en detektor. Typisk lengde på

konvensjonelle kolonner er 5-25 cm og væskehastigheten gjennom er vanligvis 0,5-2 mL/min [17]. Kolonnenes indre diameter er normalt 2-5 mm [57]. Kolonnenes overflate består av partikler som gir et mottrykk på 30-300 bar når væske presses gjennom [17].

3.6.2 Omvendt-fase-kromatografi

Omvendt-fase-kromatografi er et separasjonsprinsipp som benyttes i HPLC og er et essensielt prinsipp i LC-MS-basert proteinanalyse. Separasjon av stoffer i kolonnen er basert på hydrofobe egenskaper og hydrofobe interaksjoner mellom stoffer og stasjonærfase, også kalt sorbent [49]. Silikabaserte sorbenter er en type sorbent som er mye benyttet i omvendt-fase-kromatografi, og kan ha ulike hydrofobe grupper bundet til overflaten. I omvendt-fase-HPLC er C18-materialet den mest brukte silikabaserte sorbenten [17].

3.6.3 Nano-LC

Nano-LC er et viktig verktøy i proteinanalyse fordi det øker sensitiviteten til den analytisk metoden som benyttes. Således kan lavere konsentrasjoner detekteres og kvantifiseres med større sikkerhet og god presisjon. I nano-LC separeres stoffer i en kolonne med en indre diameter på 0,1 mm eller mindre. Væskehastigheten gjennom kolonnen er i nL/min [58].

Likning 3-1 viser utregning av fortynningsfaktor av analytt ved nedskalering. Ved å kun redusere kolonnens radius fra fire til en millimeter i likningen, skal det i teorien oppnås et 16 ganger mer konsentrert signal for analytt [57]. En redusert indre diameter og radial spredning gir mindre kromatografisk fortynning av analytt. Konsentrasjonen av analytt i den injiserte prøven vil derfor være høyere i forhold til ved bruk av en konvensjonell kolonne [59].

$$D = \frac{C_0}{C_{\max}} = \varepsilon \pi r^2 (1 - k) \sqrt{\frac{2\pi LH}{V_{\text{inj}}}}$$

Likning 3-1: Fortynningsfaktor av analytt. D = fortynningsfaktor, C_0 = konsentrasjon i prøve, C_{\max} = konsentrasjon ved deteksjon, ε = kolonnepartiklenes porøsitet, r = kolonnens radius, k = retensjonsfaktor, L = kolonnens lengde, H = platehøyde og V_{inj} = injisert volum [57].

Andre fordeler med nano-LC er behovet for et lavere injeksjonsvolum og redusert forbruk av løsningsmidler. Førstnevnte er svært relevant for prøver med begrenset tilgjengelighet [58].

SPE nano-LC

I nano-LC system går injiserte prøver ofte gjennom et SPE-trinn, i form av en oppkonsentreringskolonne, før separasjonskolonnen. Oppkonsentreringskolonnen bidrar hovedsakelig til oppkonsentrering av analytt og er ikke mer hydrofob enn separasjonskolonnen [58].

3.7 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analytisk metode som separerer og detekterer organiske og uorganiske substanser. Prinsippet bak MS er ionisering av substanser til molekyllioner, separasjon basert på forholdet mellom masse og ladning (m/z), og kvalitativ og kvantitativ deteksjon basert på forekomst av m/z -verdier [60].

En massespektrometer består hovedsakelig av tre komponenter; en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. Når en væskekromatograf med et oppsett for HPLC er direkte koblet til et massespektrometer, kalles systemet LC-MS. I LC-MS går mobilfase og injiserte prøver fra atmosfæretrykk til høyt vakuumentrykk, og fra væskefase til gassfase, som er de betingelsene massespektrometre opererer i [60]. I denne oppgaven benyttes elektrosprayionisering som ionekilde og kvadrupol som masseanalysator, således vil kun disse bli omtalt.

MS er et sentralt analytisk verktøy innen proteinforskning, og er i kombinasjon med HPLC den dominerende analytiske metoden innen kvantitativ bioanalyse [10, 61]. LC-MS er blant annet benyttet i analyse av DMS i forbindelse farmakokinetiske og toksikologiske studier, og i legemiddelmonitorering [61].

3.7.1 Elektrosprayionisering

Før ioniseringsteknikker ble tatt i bruk var analyse med MS kun forbeholdt små og termisk stabile forbindelser [62]. Elektrosprayionisering (ESI) er en ioniseringsteknikk som gjør det mulig å analysere proteiner og peptider ved bruk av MS. Overføring av proteiner og peptider som ioner fra væskefase til gassfase er nødvendig, da forbindelsene er termisk ustabile og ikke flyktige [49].

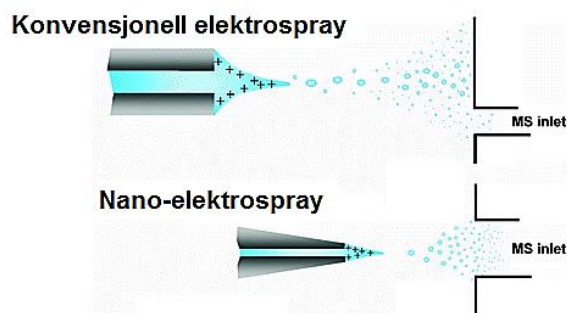
ESI opererer under atmosfærisk trykk og gir dannelse av molekyllioner uten videre fragmentering, og er derfor en myk ioniseringsteknikk [17]. Teknikken benyttes på sure eller basiske analytter fordi et godt signal i massespekteret er avhengig av at den ioniserte formen

når ionekilden. Ioniseringen kan være i enten negativ eller positiv modus, avhengig av analyttens sure eller basiske egenskaper.

For å få analytter på ionisert form endres pH i mobilfasen. Fra HPLC-kolonnen introduseres væskestrømmen i ionekilden ved å passere gjennom et trangt kapillærrør, som ved utgangen er koblet til en motelektrode. Det er pålagt et potensial på 2-5 kV mellom kapillæret og motelektroden [17]. Væsken vil ved hjelp av en forstøvergass strømme ut av kapillæret som en spray bestående av små dråper [53]. Dråpene får elektrisk ladning som følge av det pålagte potensialet. Videre vil dråpene fordampe og avta i størrelse, og det er derfor viktig at det benyttes flyktige mobilfaser. En inert tørkegass, typisk nitrogen, kan benyttes til å fjerne den fordampede mobilfasen [17]. Når dråpene blir mindre vil avstanden mellom like ladninger reduseres og de elektrostatiske frastøtningene øke. Dråpenes størrelse vil fortsette å avta frem til *Rayleighs* grense nås, som er et kritisk nivå hvor dråpene blir så ustabile at de eksploderer til mindre og mer stabile dråper [63]. Fordamping og eksplosjon til nye og mindre dråper vil gjentas og fortsette helt til det kun er tørre analyttioner igjen og disse vil ved hjelp av elektrisk spenning introduseres i masseanalysatoren [17].

Nano-ESI

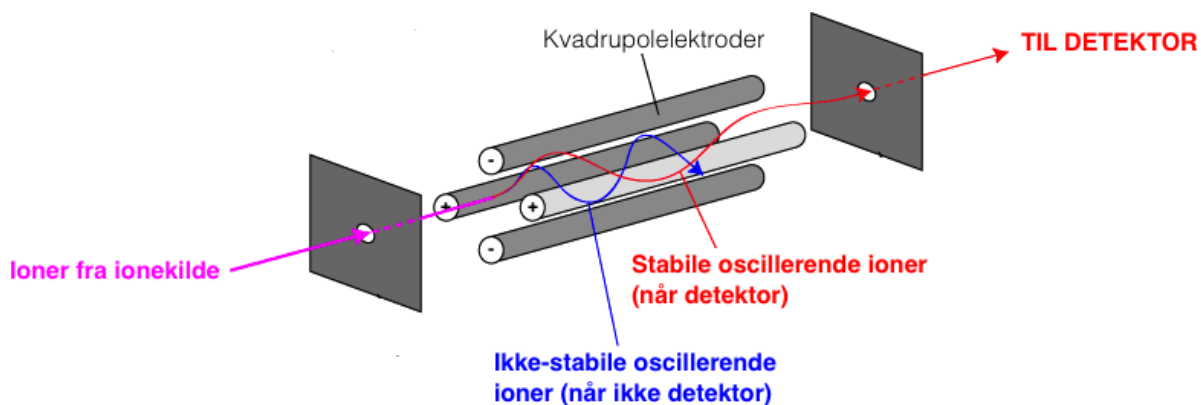
Nano-ESI er en miniaturisering av ESI, og er koblet til nano-LC [58]. I nano-ESI dannes det mindre dråper enn ved konvensjonell ESI, og dråpene fordamper så raskt at det ikke er nødvendig med tørkegass. Kapillæret er i tillegg plassert nærmere inngangen til masseanalysatoren, som gir forbedret signalstabilitet [64]. **Figur 3-7** viser konvensjonell elektro-spray og nano-elektrospray.



Figur 3-7: Konvensjonell elektro-sprayionisering og nano-elektrosprayionisering, begge i positiv modus. Figur modifisert fra [65].

3.7.2 Kvadrupolanalysator

Kvadrupolanalysator (Q) er en masseanalysator som separerer ioner fra hverandre basert på m/z og stabilitet [49]. En kvadrupol er bygget opp av fire parallelle sylindriske elektroder, hvor to og to motstående elektroder har samme elektrisk potensial. Et elektrodepar har positivt potensial og positive ladninger, og et elektrodepar har negativt potensial og negative ladninger [60]. Kvadrupolen pålegges et elektrisk felt hvor feltstyrken endres avhengig av hvilke ioner som skal nå detektoren [17]. Forholdet mellom likestrøm og vekselstrøm er avgjørende for elektrodeparenes potensial. Ved å endre på dette forholdet endres feltstyrken. Ioner sendes inn i kvadrupolen fra ionekilden og oscillerer mellom elektrodene. Ved en gitt feltstyrke vil ioner følge en bestemt bane avhengig av m/z -verdi. Et ion som når detektoren følger en stabil bane gjennom kvadrupolen uten å avbøye og treffe elektrodene med motsatt ladning [60]. Prinsippet for en kvadrupol er vist i **figur 3-8**.



Figur 3-8: Prinsippet for en kvadrupolanalysator. Figur modifisert fra [66].

Kvadrupol er en mye brukt masseanalysator i massespektrometre da instrumentet er enkelt å bruke og kan ta opp to til åtte massespektre per sekund ved å variere feltstyrken [17].

3.7.3 Tandem massespektrometri

Tandem massespektrometri (tandem MS, også forkortet MS/MS) er en analytisk metode som involverer to massespektrometriske analyser [60]. Prinsippet er basert på at spesifikke m/z -verdier (utgangsjoner) går videre fra første masseanalysator, fragmenteres og føres videre inn i neste masseanalysator hvor alle eller spesifikke fragmenter når detektor [60]. MS/MS-massespektre kan i tillegg til å avdekke peptidsekvenser også lokalisere peptidmodifikasjoner [53].

Et tandem massespektrometer kan bestå av kun en masseanalysator som opererer i tid, kalt *tandem-in-time MS*, hvor de ulike trinnene skjer på samme sted til ulik tid. *Tandem-in-space MS* involverer bruk av to eller flere masseanalysatorer hvor de ulike trinnene skjer på ulike steder. I denne oppgaven er trippelkvadrupol benyttet, som er et eksempel på *tandem-in-space MS* hvor selektering, fragmentering og skanning av fragmenter skjer i tre ulike kvadrupoler før deteksjon [60].

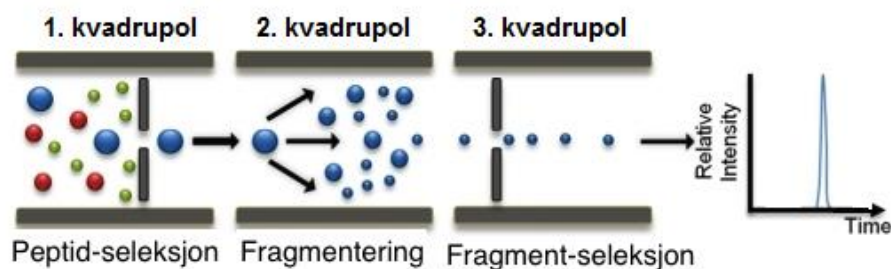
Trippelkvadrupol

En trippelkvadrupol (QqQ) består av tre etterfølgende kvadrupolanalytatorer som er koblet sammen før detektor. For å få MS/MS-massespektre benyttes første kvadrupol (Q1) og tredje kvadrupol (Q3) som massefiltre til å selektere ioner som beskrevet i 3.7.2. Andre kvadrupol (q2) styres kun av vekselstrøm og opererer som en kollisjonscelle. I kollisjonscellen kolliderer selekterte ioner fra Q1 med en inert kollisjons-gass og fragmenterer [53]. Prosessen kalles kollisjonsindusert dissosiasjon (CID) og typiske benyttede kollisjons-gasser er helium og argon [17, 53]. Fragmenter fra q2 føres videre inn i Q3 hvor kun selekterte fragmenter følger en stabil bane og når detektor [17]. Det er også mulig å utføre fullskann-analyser i en QqQ hvor alle ioner i Q1 innenfor et bestemt m/z -område detekteres [53]. Produktionskann er prinsippet som benyttes når alle fragmenter innenfor et bestemt m/z -område passerer gjennom Q3 og detekteres [7].

Selektiv reaksjonsmonitorering

Selektiv reaksjonsmonitorering (SRM) er et prinsipp som benyttes i QqQ. I SRM er Q1 stilt slik at kun et utgangsign med en spesifikk m/z -verdi passerer gjennom og fragmenteres i q2. I Q3 vil kun selekterte fragmenter passere gjennom og detekteres [17]. Prinsippet for SRM er skissert i **figur 3-9**. Ved identifikasjon og kvantifisering av proteiner blir typisk molekyllioner av tryptiske peptider selektert til å passere Q1 [67]. Valg av fragmenter til å passere Q3 i SRM er basert på selektivitet og signalintensitet [7].

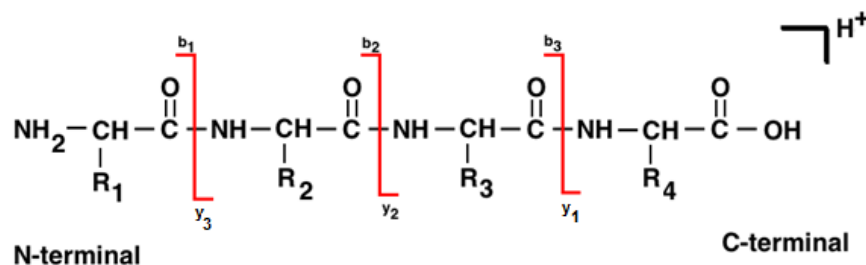
Bruk av SRM gir økt sensitivitet og spesifisitet fordi metoden eliminerer signaler fra potensielt interfererende substanser. Bruk av SRM reduserer i tillegg bakgrunnsstøy og signalforholdet mellom analytt og støy øker, som bidrar til lavere deteksjons- og kvantifiseringsgrenser [10, 67].



Figur 3-9: Prinsippet for selektiv reaksjonsmonitorering. Figur modifisert fra [68].

Fragmentering av peptidioner – nomenklatur

Peptider har flere potensielle bindinger som kan spaltes under CID, men spaltningene mellom aminosyrene i peptidenes rygggrad er de mest signifikante og høyest forekommende. En utbredt nomenklatur som benyttes for å beskrive fragmentering av peptidioner er dannelse av b- og y-fragmentioner. Ionene dannes når peptider spaltes mellom karbon i karbonylgruppen og nitrogen i amidet, som vist i **figur 3-10**. Denne type fragmentering forekommer oftest [53]. I retning N-terminal dannes b-fragmentioner og i retning C-terminal dannes y-fragmentioner.



Figur 3-10: Fragmentering av peptider til b- og y-fragmentioner ved bruk av kollisjonsindusert dissosiasjon.

3.8 Proteinanalyse ved bruk av LC-MS/MS

Væskekromatografi koblet til tandem MS (LC-MS/MS) regnes som en universal analytisk teknikk fordi ioniseringsteknikker som ESI tillater kvalitative og kvantitative målinger av så godt som alle terapeutiske substanser. Det er en svært spesifikk analytisk teknikk fordi den kombinerer kromatografisk separasjon, masseseparasjon og selektering av fragmentioner [7].

3.8.1 Kvalitativ analyse

For identifisering av proteiner som uttrykkes i celler er det nødvendig å bestemme proteinenes primærstruktur. MS har i kombinasjon med databasesøk vist seg å revolusjonere hvordan proteiner identifiseres. Kjent aminosyresekvens og tilgjengelig data i databaser gjør det mulig å finne proteinet som sekvensen stammer fra [56]. For komplekse biologiske prøver er enzymatisk klipping med trypsin og kromatografisk separasjon av tryptiske peptider ofte nødvendig for entydig proteinidentifikasjon [49, 69].

Hver aminosyre har sin molekylvekt som følge av ulike sidekjeder, og dette gir ulike aminosyresekvenser en unik molekylvekt [56]. Vekten til et peptid kan bestemmes når m/z er kjent, og dette kan brukes til å forutsi aminosyresammensetningen til peptidet [56, 70]. MS/MS gir unike massespektre for hvert enkelt peptid. Massespektrene kan sammenlignes med kjente spektrere av aminosyresekvenser i databaser og på denne måten er fragmentationene som et fingeravtrykk til peptidet det stammer fra [70]. Ved bruk av dataverktøy kan det utføres teoretisk klipping av proteiner, som muliggjør identifikasjon av moderproteinene når peptidenes molekylvekt er kjent [71].

3.8.2 Kvantitativ analyse

LC-MS/MS er den mest brukte metoden i kvantitativ analyse av terapeutiske substanser, inkludert proteiner. LC-MS/MS er som de fleste andre kvantitative teknikker basert på forholdet mellom konsentrasjon av analytt i en injisert prøve og detektorrespons. I et massespekter vil et fragmentation fra en analytt gi et signal med en intensitet avhengig av konsentrasjon [17].

Signaturpeptid

Tryptisk klipping av proteiner gir generelt flere peptider enn det som er nødvendig for kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av proteiner [72]. Tryptiske peptider kan bestå av en aminosyresekvens som er unik og spesifikk for moderproteinene, såkalt signaturpeptid, som kan benyttes som et surrogat ved bestemmelse av proteinene [13].

Signaturpeptidet $\beta T5$ er en pålitelig kvalitativ og kvantitativ markør for intakt hCG [13, 73]. $\beta T5$ er det femte tryptiske peptidet på hCG β , og har en unik aminosyresekvens som er spesifikk for hCG [74]. I teorien betyr dette at det ikke kan forveksles med tryptiske peptider

fra hormonene i glykoproteinhoronfamilien eller andre proteiner [73]. Aminosyresekvensen til β T5 er skissert i **figur 3-11**.

V - L - Q - G - V - L - P - A - L - P - Q - V - V - C - N - Y - R β T5

Figur 3-11: Aminosyresekvensen til signaturpeptidet β T5 i humant koriongonadotropin.

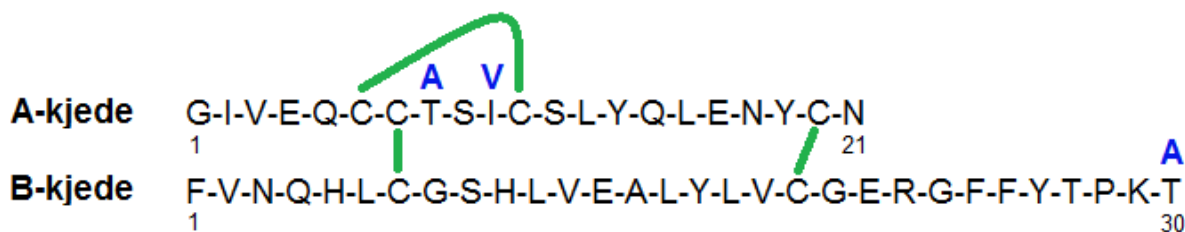
Intern standard

Intern standard (IS) benyttes ofte i kvantitativ analyse for å korrigere variasjoner og tap av analytt under prøveopparbeidelse og ved analyse. En god IS har samme fysikalsk-kjemiske egenskaper som analytten [17]. Omfattende prøveopparbeidelser som involverer flere trinn er mer utsatt for tap. Tap av analytt kan blant annet forekomme når prøve pipetteres fra en beholder til en annen beholder, ved inndamping, som følge av variasjoner i injeksjonsvolum og ved matrikseffekter [7]. Protein- og peptidadsorpsjon til beholdere og annet utstyr er en kjent utfordring i bioanalyse som kan forårsake tap av analytt [71].

Hensikten med å benytte en IS er å få nøyaktigere og mer presise kvantitative data. Ved å benytte en god IS vil den bioanalytiske metoden bli mer robust og gi resultater med større sikkerhet. Grunnen til dette er at kvantifisering kan være basert på signalforholdet mellom analytt og IS, som til enhver tid skal være konstant.

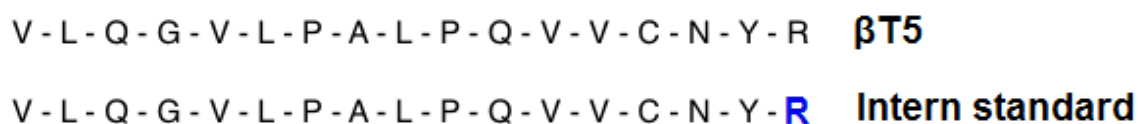
Det er hovedsakelig to typer IS som benyttes for kvantifisering med LC-MS/MS, isotopmerket IS og strukturelle analoger. Førstnevnte er mer effektiv og er derfor den foretrukne typen. En isotopmerket IS skiller seg strukturelt fra analytten ved at en eller flere atomer er erstattet med en tyngre isotop. Dette gir høyere Mw slik at IS kan separeres fra analytten i massespektrometret, forutsatt at forskjellen i Mw er stor nok. Bruk av isotopmerkede IS er ofte begrenset som følge av utilgjengelighet og høy pris, og da benyttes analoger av analytten [7].

I arbeidet med humant insulin ble det benyttet bovin insulin fra storfe som IS. Strukturelt sett er det tre aminosyrer som skiller bovin insulin fra humant insulin. **Figur 3-12** viser aminosyresekvensen til humant og bovin insulin. I A-kjeden er treonin i posisjon 8 og isoleucin i posisjon 10 erstattet med henholdsvis alanin og valin, og i B-kjeden er treonin i posisjon 30 erstattet med alanin i bovin insulin [75].



Figur 3-12: Aminosyresekvensen til humant og bovint insulin. Aminosyrene markert med blått representerer bovint insulin. Linjene markert med grønt viser disulfidbindinger.

I arbeidet med hCG ble det i denne oppgaven benyttet en isotopmerket IS, som er en syntetisk analog av signaturpeptidet β T5 (is β T5). is β T5 består av en isotopmerket analog av arginin i C-terminalen, som gir et masseskift på +10 Da. Masseskiftet kommer av at alle ti C- og N-atomer er erstattet med tyngre isotoper [47]. **Figur 3-13** viser aminosyresekvensen til β T5 og is β T5.



Figur 3-13: Aminosyresekvensen til signaturpeptidet β T5 og isotopmerket intern standard. R markert blått i intern standard representerer isotopmerket arginin.

3.8.3 Matrikseffekter

Matrikseffekter er et fenomen som kan forekomme når prøver analyseres med LC-MS, spesielt når ESI benyttes som ionekilde [76]. Forurensninger kan koeluere med analytter ut av HPLC-kolonnen som følge av lignende hydrofobe egenskaper. Videre kan forurensninger interferere med ioniseringen av analytten, og forsterke eller undertrykke signalet. Sistnevnte kalles ionesuppresjon og er det som forekommer hyppigst [14, 76].

Matrikseffekter kan komme fra blant annet naturlig forekommende komponenter i biologiske prøver, hjelpestoffer i farmasøytiske formuleringer og beholdere til lagring [76]. For å minimalisere risikoen for matrikseffekter er det viktig å eliminere interfererende komponenter ved å utføre prøveopparbeidelse. Dette er spesielt viktig for prøver med komplekse sammensetninger [14].

4 Materialer

4.1 Kjemikalier, analytter og utstyr

Kjemikalier, analytter og utstyr benyttet i oppgaven står oppført i **tabell 4-1** til og med **tabell 4-7**.

Tabell 4-1: Kjemikalier.

Navn	Kvalitet	Produsent	By/land
1,4-ditiotreitotol	≥ 99,5 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
2-jodeddiksyre	≥ 98,0	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Acetonitril	≥ 99,9 % Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat	≥ 99,5 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Dinatriumfosfatdihydrat	98,5 – 101,0 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenfosfat	≥ 99,5 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid	≥ 99,5 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Maursyre	~ 98 % for mass spectrometry	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Metanol	≥ 99,9 % Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid	≥ 99,5 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Polyetylenglykol 20 000	20 % (w/v)	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Saltsyre	37 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Trifluoreddiksyre	≥ 98 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Tris-(2-karboksyetyl) fosfin hydroklorid	≥ 98 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trizma® base	≥ 99,9 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trypsin fra bovin pankreas ≥ 10,000 BAEE enheter/mg protein	96,1 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Tween® 20	-	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA

Tabell 4-2: Analytter og intern standard.

Navn	Kvalitet	Produsent	By/land
Intern standard, isβT5, «VLQGVLPALPQV-VCNY[RC13N15]»	≥ 95 %	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Intern standard, insulin fra bovin pankreas ≥ 27 USP enheter/mg	-	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Insulin humant 26,4 USP enheter/mg	-	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Internasjonal referansestandard for intakt hCG. Ampullekode 99/688, 1,88 nmol hCG	-	National Institute for Biological Standards and Control	Hertfordshire, UK
Pregnyl® 5000 IE hCG per ampulle	Legemiddel, pulver til injeksjonsvæske	N.V Organon	Oss, Nederland
Serumprøve fra pasient diagnostisert med testikkelkreft	-	Lever fra Radiumhospitalet, Oslo universitetssykehus	Oslo, Norge

Tabell 4-3: Utstyr til immunoekstraksjon.

Navn	Modell	Leverandør	By/land
Antistoffer	E 27	Radiumhospitalet - Oslo universitetssykehus	Oslo, Norge
Magnetiske kuler	Dynabeads® M-280	Invitrogen	CA, USA
Magnet til eppendorfrør	DynaMag™-2	Invitrogen	CA, USA

Tabell 4-4: Utstyr til væskechromatograf og massespektrometer brukt ved analyse av insulin.

Utstyr	Modell	Produsent	By/land
Injektør	WPS-3000TRS	Thermo Scientific	Germering, Tyskland
Massespektrometer	TSQ Quantum Access	Thermo Fisher Scientific	San Jose, CA, USA
Programvare	Chromleon v. 6.80 SR6 Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Dionex corp. Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA Rockford, IL, USA

Pumpe	LPG-3400M	Thermo Scientific	Germering, Tyskland
Separasjonskolonne	BioBasic-C8 column 50x1 mm, 5 µm, 300 Å	Thermo Fischer Scientific	Rockford, IL, USA

Tabell 4-5: Utstyr til væskechromatograf og massespektrometer brukt ved analyse av humant koriongonadotropin.

Utstyr	Modell	Produsent	By/land
Injektor	WPS-3000TPL RS	Thermo Scientific	Germering, Tyskland
Filter	Screen 1/16" OD, 1 µm	Technolab	Florida, USA
Flow meter	NCS-3500RS Nano	Thermo Scientific	Germering, Tyskland
Kolonneovn	NCS-3500RS Nano	Thermo Scientific	Germering, Tyskland
Massespektrometer	TSQ Quantiva	Thermo Fisher Scientific	San Jose, CA, USA
Oppkonsentreringskolonne	Acclaim Pepmap 100 C18, 5x0,3mm, 5 µm	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Programvare	Chromleon v. 6.80 SR6 Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Dionex corp. Thermo Scientific	Sunnyvale, CA, USA Rockford, IL, USA
Pumpe	NCS-3500RS Nano	Thermo Scientific	Germering, Tyskland
Separasjonskolonne	Acclaim Pepmap 100 C18, 150x0,075 mm, 3 µm, 100 Å	Thermo Scientific.	Rockford, IL, USA

Tabell 4-6: Utstyr, ikke forbruksmateriell.

Utstyr	Modell	Produsent	By/land
Automatpipetter	m10, m20, m100, m1000	Sartorius/Biohit	Helsinki/Finland
Inndampingsenhet med nitrogen	Dri-Block® DB-30	Techne	Staffordshire, Storbritannia
Magnet	DynaMag™-2	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Mikser	Thermomixer comfort 1,5 mL	Eppendorf	Hamburg, Tyskland

Minisentrifuge	Galaxy mini	VWR	Radnor, PA, USA
pH-meter	744	Metrohm	Sveits
Prøveblender ved immunekstraksjon med kuler	HulaMixer®	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Sentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Ultralydbad	Ultrasonic Cleaner	VWR	Radnor, PA, USA
Vannrenseanlegg	Milli-Q® Integral 3	Millipore	Molsheim, Frankrike
Vekt	AE200 XS 205 Dual Range	Mettler, Toledo Mettler Toledo	Oslo, Norge Oslo, Norge
VibraMax ristemaskin	VibraMax 100	IKA	Staufen, Tyskland
Vortexmikser	SA8	Stuart	Staffordshire, UK

Tabell 4-7: Utstyr, forbruksmateriell.

Utstyr	Modell	Produsent	By/land
C8-materiale til SPE	Empore Extraction disks C8 47mm	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
CMC	Aquacel® Hydrofiber®	ConvaTec	Deeside, UK
DMPK-C kort	FTA™ DMPK-C kort	GE Healthcaare	Centennial Avenue, USA
Eppendorf, Lobind	Protein LoBind tube 1,5 mL og 2,0 mL	Eppendorf	Hamburg Tyskland
Eppendorfrør	Eppendorf Safe-Lock tube 2 mL	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Glasspasteurpipetter	150 mm, 230 mm	VWR	Radnor, PA, USA
Korker til vialer	Hvite	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
Mikro-inserts	31x6 mm, 0,1 mL, clear glass	VWR	Radnor, PA, USA
Pipettespisser	Optifit refill tips (10 µ, 200 µL og 1000 µL) Finntip® (5 mL)	Sartorius Thermo Scientific	Helsinki, Finland Vantaa, Finland
Sentrifugerør	15 mL	VWR	Radnor, PA, USA
Vialer	32x11,6 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge

4.2 Fullblod, serum, plasma og urin

Fullblod og urin ble donert av friske frivillige ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Fullblod ble tappet i rør tilsatt antikoagulasjonsmiddelet etylendiamintetraacetat. Serum og plasma ble anskaffet fra Ullevål sykehus. Plasma var tilsatt antikoagulasjonsmiddelet citrat fosfat dektrose-adenin. Fullblod, serum og plasma ble fordelt i mindre prøverør og lagret i fryser. Matriksene ble tint rett før bruk. Urin var dagsfersk og ble ikke oppbevart i fryser.

4.3 Tillaging av løsninger

4.3.1 Løsning

Vann

Ionebyttet vann fra Milli-Q vannrenseanlegg.

20 mM maursyre

75 μL konsentrert maursyre ble tilsatt til litt ionebyttet vann i en målekolbe, og kolben ble fylt med vann til 100 mL.

20 mM maursyre med 0,001 % PEG

1 μL 20 % (w/v) PEG 20 000 ble tilsatt til 2 mL 20 mM maursyre, og 200 μL av løsningen ble tilsatt 1,8 mL 20 mM maursyre.

4.3.2 Stamløsning og arbeidsløsning

hCG

Stamløsning

Tørrstoff fra en ampulle Pregnyl[®] (5000 IE hCG) ble løst i 1 mL ionebyttet vann, og løsningen ble fordelt i flere LoBind eppendorfrør og lagret i fryser.

Arbeidsløsning

Stamløsningene ble fortynnet ned til ønsket konsentrasjonen i en matriks (fullblod, serum, plasma eller urin) avhengig av eksperimentet som ble utført.

Insulin

Stamløsning

1 mg tørrstoff ble veid ut og løst i 1 mL 20 mM maursyre til en konsentrasjon på 1 mg/mL. Løsningene ble laget rett før bruk.

Arbeidsløsning

Stamløsningene ble fortynnet til ønsket konsentrasjon rett før bruk.

4.3.3 Intern standard

isβT5

Stamløsning

En ampulle (1 nmol AQUA peptid) ble løst i 20 µL 10 % (v/v) maursyre. Tørrstoffet ble oppløst og 180 µL 0,1 % maursyre ble tilsatt, og dette gav en konsentrasjon på 5 pmol/µL.

Arbeidsløsning

40 µL av stamløsningen ble fortynnet i 940 µL 200 mM ammoniumbikarbonat (ABC)-buffer. 8 µL 200 mM DTT ble tilsatt og løsningen ble satt i thermomixer på 1400 rpm ved 95 °C i 20 minutter. Deretter ble løsningen kjølt ned til romtemperatur. 12 µL 800 mM IAA ble tilsatt og løsningen plassert mørkt i thermomixer på svak risting, 800 rpm i 15 minutter. Løsningen ble fortynnet til 2,5 pmol/ml i 20 mM maursyre.

Bovint insulin

Arbeidsløsning

1 mg tørrstoff ble veid ut og løst i 1 mL 20 mM maursyre til en konsentrasjon på 1 mg/mL. Løsningene ble laget rett før bruk.

4.3.4 Løsninger til kvalitetskontroll

βT5 og isβT5

Kvalitetskontrollprøver (QC-prøver)

963 µL 20 mM maursyre ble tilsatt 20 µL 500 IE/mL βT5 (klippet hCG) og 17 µL 50 pmol/mL isβT5, og sluttkonsentrasjonen var 10 IE/mL βT5 og 0.85 pmol/mL isβT5.

4.3.5 Løsninger til immunoekstraksjon av hCG

10*fosfatbufret salin-løsning (PBS)

Følgende tørrstoffer ble veid ut:

- 8,00 g natriumklorid
- 0,20 g kaliumklorid
- 1,44 g dinatriumfosfatdihydrat
- 240 mg kaliumdihydrogenfosfat

Tørrstoffene ble overført til en målekolbe og løst i ionebyttet vann til 100 mL. Løsningen ble lagret i kjøleskap.

1*PBS-løsning

5 mL 10*PBS-løsning ble overført til litt ionebyttet vann og vann ble tilsatt til 50 mL.

PBS med 0,05 % tween

5 mL 10* PBS-løsning og 25 µL Tween 20 ble overført til litt ionebyttet vann og vann ble tilsatt til 50 mL.

10 mM Tris-HCl

121,8 mg trizma base ble veid ut og løst i vann til litt under 100 mL. pH ble justert til 7.4 med pH-meter og HCl/vann-løsning (1:3).

4.3.6 Løsninger til tryptisk proteolyse av hCG

50 mM ABC

39,53 mg tørrstoff ble veid ut og løst i 10 mL ionebyttet vann. Bufferen var dagsfersk og ble laget rett før bruk.

50 mM DTT

7,7125 mg tørrstoff ble veid ut i avtrekksskap og oppbevart i mørkt i kjøleskap. Tørrstoffet ble løst i 1 mL ABC-buffer rett før bruk.

200 mM IAA

37,19 mg tørrstoff ble veid ut i avtrekksskap og oppbevart mørkt i fryser. Tørrstoffet ble løst i 1 mL ABC-buffer rett før bruk.

50 µg/mL trypsin

1 mg trypsin ble veid ut og løst i 1 mL ABC-buffer rett før bruk. Videre ble 50 µL av løsningen tatt ut og fortynnet i 950 µL ABC-buffer til en konsentrasjon på 50 µg/mL.

4.3.7 Løsninger til SPE av peptider fra hCG**10 % (v/v) trifluoreddiksyre (TFA)-løsning**

En ampulle TFA ble overført til 9 mL ionebyttet vann.

0,1 % (v/v) TFA-løsning

100 µL 10 % TFA-løsning ble overført til 9,9 mL ionebyttet vann.

20 % 0,1 % TFA, 80 % acetonitril (ACN)-løsning

Tillaging av 1 mL: 200 µL 0,1 % TFA-løsning ble tilsatt til 800 µL ACN.

4.3.8 Løsninger til reduksjon av insulin**Tris-(2-karboksyetyl) fosfin hydroklorid (TCEP)**

2,867 mg tørrstoff ble veid ut og løst i 200 µL 20 mM maursyre.

4.3.9 Mobilfaser og andre løsninger

I dette arbeidet ble det benyttet tre ulike mobilfaser, *loading buffer* og *rear seal wash solution*.

Mobilfase A (20 mM maursyre:ACN, 95:5)

950 mL 20 mM maursyre og 50 mL 100 % ACN ble blandet sammen.

Mobilfase B (20 mM maursyre:ACN, 5:95)

50 mL 20 mM maursyre og 950 mL 100 ACN ble blandet sammen.

Mobilfase C (vaskeløsning)

175 mL metanol (MeOH) og 75 mL ionebyttet vann ble blandet sammen (70 % MeOH).

Loading buffer

245 mL 20 mM maursyre og 5 mL ACN ble blandet sammen.

Rear seal wash solution

100 mL MeOH og 900 mL ionebyttet vann ble blandet sammen (10 % MeOH).

4.4 Tillaging av utstyr

4.4.1 Mikrokolonner til SPE

Mikrokolonnene til SPE-prosedyren ble laget ved å trykke ut seks puter av et C8-materiale med en glasspasteurpipette, og ved hjelp av metalltråd ble bitene forsiktig trykket ned i pipettespisser. Pipettespissene ble presset ned i 2 mL eppendorfrør gjennom et tillaget hull.

Figur 4-1 viser en egenprodusert SPE-mikrokolonne.



Figur 4-1: Egenprodusert mikrokolonne til fast-fase-ekstraksjon.

5 Metode

5.1 Prøvepåsetting, oppløsning og eluering

Det ble avsatt prøve på CMC og DMPK-C kort. CMC-materiale med DMS-prøve ble oppløst og fra DMPK-C kort ble prøve eluert ut.

5.1.1 Prøvepåsetting på materiale

I denne oppgaven benyttes ordet spiket om prøver som er tilsatt en analytt.

15 μ L fullblod, serum, plasma eller urin spiket med hCG eller insulin ble avsatt på CMC eller DMPK-C kort, og de avsatte prøvene tørket i romtemperatur i minimum 2 timer. **Figur 5-1** viser avsatt fullblod på CMC og DMPK-C kort.



Figur 5-1: Dried blood spots avsatt på karboksymetylcellulose (øverst) og DMPK-C kort (nederst).

5.1.2 Oppløsning av DMS med hCG på CMC-materiale

Hele DMS-prøven ble klippet ut og overført til eppendorfrør. 1 mL PBS ble tilsatt og materialet ble oppløst ved risting i thermomixer ved 1400 rpm. Det ble innimellom utført manuell risting og risting på vortex mikser ved 2500 rpm for å fremskynde oppløsningsprosessen.

5.1.3 Eluering av hCG i DMS fra DMPK-C kort

Hele DMS-prøven ble klippet ut og overført til eppendorfrør. 1 mL PBS ble tilsatt og eluering av prøver fra materialet ble utført under immunoekstraksjon som beskrevet i 4.2.

5.2 Immunoekstraksjon

Immunoekstraksjon av hCG ble utført ved bruk av magnetiske kuler bestående av polymer-belagte jernkuler med antistoffet E27 festet på kulenes overflate.

Prosedyre for immunoekstraksjon:

1. De magnetiske kulene ble vasket før tilsetning til prøve og følgende prosedyre ble fulgt:
Løsning med magnetiske kuler legges til risting på VibraMax på grunn av sedimentering på bunnen. Et volum av løsningen tas ut avhengig av antall DMS-prøver og overføres til et eppendorfrør. Røret settes i magnet og løsningen fjernes. De gjenværende magnetiske kulene vaskes med 1 mL PBS med 0,05 % Tween 20 (2x) og PBS tilsettes i samme volum som ble tatt ut av løsning med magnetiske kuler.
2. Hvert prøverør ble tilsatt 20 μ L løsning med vasket kuler og ekstrahert på HulaMixer® i 1 time.
3. Prøvene ble satt i magnet og prøveløsning fjernet. Ved bruk av DMPK-C kort som DMS-materiale ble kortene fjernet sammen med prøveløsning.
4. De magnetiske kulene ble vasket og prøverørene ble satt i magnet mellom hvert vasketrinn for fjerning av vaskeløsning. For vasking ble følgende løsninger benyttet:
 - i. 1 mL PBS med 0,05% 20 Tween (1x)
 - ii. 1 mL PBS (1x)
 - iii. 1 mL tris-HCl (1x)
5. 80 μ L ABC-buffer ble tilsatt hvert prøverør.

5.3 Trypsinering

Etter prosedyren for immunoekstraksjon og tilsetning av 80 μL ABC-buffer ble trypsinering av hCG utført.

Prosedyre for trypsinering:

1. Reduksjon: hvert rør ble tilsatt 4 μL 50 mM DTT-løsning og satt til risting i thermomixer ved 1400 rpm og 60 °C i 15 minutter.
2. Prøve ble avkjølt i 15 minutter.
3. Alkylering: hvert rør ble tilsatt 6 μL 200 mM IAA-løsning og satt mørkt i thermomixer på lett risting ved 800 rpm i 15 minutter.
4. Trypsinering: hvert rør ble tilsatt 10 μL 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin og satt i thermomixer på lett risting ved 800 rpm over natten, i ≥ 18 timer ved 37 °C.

5.4 SPE

Etter trypsinering ble prøvene lagt i kjøleskap i 15 minutter og 10 μL is β T5 ble tilsatt hver prøve. SPE ble utført ved bruk av egenproduserte SPE-mikrokolonner for å fjerne reduksjons- og alkyleringsreagenser, og oppkonsentrere prøvene.

Prosedyre for SPE:

1. Kondisjonering av C8-materiale:
 - i. Hver SPE-mikrokolonne ble tilsatt 100 μL 100 % ACN.
 - ii. Hver SPE-mikrokolonne ble tilsatt 100 μL 20 mM maursyre.
2. Prøvepåsetting:

All prøve i hvert rør (110 μL) ble overført til SPE-mikrokolonnene. Magnet ble brukt for å unngå at kulene fulgte med ved overføring til SPE-mikrokolonnene.
3. Vask:
 - i. Hver SPE-mikrokolonne ble tilsatt 100 μL 20 mM maursyre.

4. Eluering:

- i. Før eluering ble oppsamlingsrørene fjernet og SPE-mikrokolonnene overført til nye og rene oppsamlingsrør, LoBind eppendorfrør 1,5 mL.
- ii. Hver SPE-mikrokolonne ble tilsatt 60 µL elueringsløsning (80 % ACN, 20 % 0,1 % TFA-løsning).

5. Inndamping:

Rørene ble satt i inndampingsenhet ved 60 °C og lav tilførsel av nitrogengass i 20-40 minutter, til all væsken var dampet inn.

6. Reløsning:

Prøvene ble reløst i 50 µL 20 mM maursyre og 2 µL ble injisert på LC-MS/MS.

For å presse væsken gjennom SPE-kolonnene ble prosedyren utført i en eppendorf-sentrifuge ved 4500-5500 rpm i 2-6 minutter. Sentrifugering ble utført mellom hvert trinn i prosedyren.

5.5 Insulin – reduksjon

5.5.1 Reduksjon

Prosedyre for reduksjon:

1. Det ble tilsatt 10 µL 50 mM TCEP til 1 mL 1 mg/mL humant insulin og bovint insulin (IS) som var fortynnet i 20 mM maussyre.
2. Løsningen ble ristet i thermomixer ved 800 rpm og 95 °C.
3. Løsningen ble fortynnet til 100 ng/mL humant og bovint insulin med 20 mM maursyre. Plasma ble tilsatt til 0,05 % (v/v). 20 µL ble injisert på LC-MS/MS.

5.6 Instrumentelle betingelser

Det ble benyttet to ulike instrumenter og systemer for analyse av hCG og insulin, men begge analysene var basert på omvendt-fase-HPLC med gradienteluering koblet til tandem-MS med ESI og QqQ. Gradienten bestod av 20 mM maursyre og ACN. For analyse av insulin ble det

benyttet LC-MS/MS med konvensjonelle mål og for analyse av hCG ble det benyttet nano-LC-MS/MS.

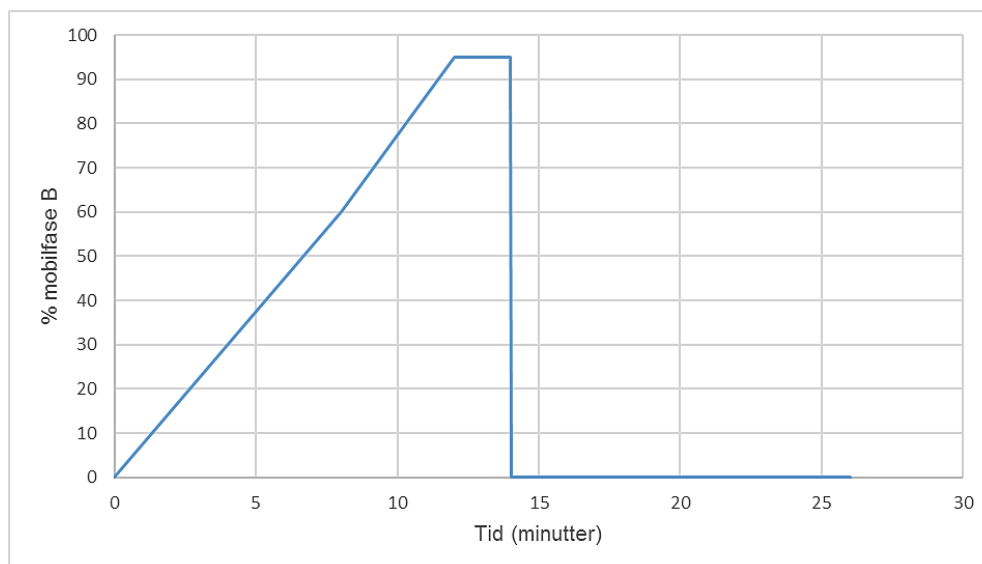
5.6.1 HPLC-parametere

Insulin

Kromatografiske betingelser:

Mobilfase A:	95 % 20 mM maursyre, 5 % ACN
Mobilfase B:	5 % 20 mM maursyre, 95 % ACN
Separasjonskolonne:	BioBasic™ C8-kolonne, 50x1 mm, 5 µm
Injeksjonsvolum:	20 µL
Flow:	50 µL/min
Kolonnetemperatur:	30 °C

En grafisk fremstilling av gradienten som benyttes i metoden er vist i **figur 5-2**.



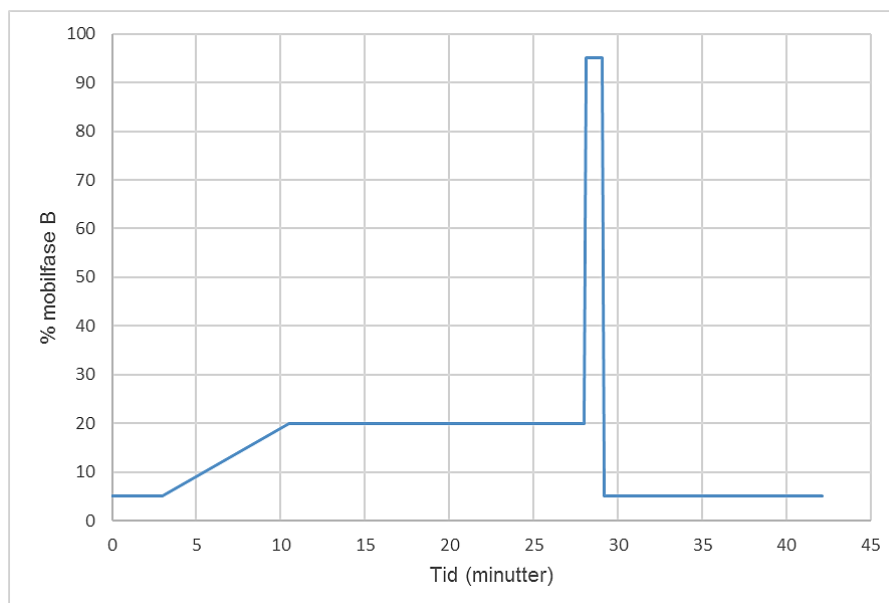
Figur 5-2: Grafisk fremstilling av gradientelueringen brukt i metoden for analyse av insulin. Gradienten starter med 0 % mobilfase B og andelen øker til 60 % i løpet av 8 minutter. De neste 4,010 minuttene øker andelen B fra 60 % til 95 % og holdes stabilt til og med 14 minutter ut i analysen. I løpet av 0,01 minutt reduserer andelen B fra 95 % til 0 %. Den totale analysetiden for hver prøve var 26 minutter.

hCG

Kromatografiske betingelser:

Mobilfase A:	95 % 20 mM maursyre, 5 % ACN
Mobilfase B:	5 % 20 mM maursyre, 95 % ACN
Separasjonskolonne:	Acclaim™ PepMap™ 100 C18-kolonne, 150x0,075 mm, 3µm
Oppkonsentreringskolonne:	Acclaim™ PepMap™ 100 C18-kolonne, 5x0,30 mm, 5 µm
Injeksjonsvolum:	10 µL
Flow:	0,3 µL/min
Kolonnetemperatur:	35 °C

Nano-LC-systemet består av et automatisk filtrerings- og filter-*backflush*-system koblet til et kolonne-svitsjing system, med en 10-ports-ventil. De første tre minuttene etter injeksjon i injektor pumpes prøve av loading pumpe og loading buffer gjennom et filter hvor partikler filtreres. Videre pumpes prøve inn i oppkonsentreringskolonne hvor analytter retarderes, mens hydrofile forbindelser og salter går gjennom og videre til avfall. Etter 3 minutter svitsjer ventilen til en ny posisjon og nano-LC pumpen eluerer analyttene ut av oppkonsentreringskolonnen og inn i separasjonskolonnen. Det blir samtidig utført *backflush* av filteret med loading buffer slik at alle partikler på filteret går til avfall. Etter 29 minutter svitsjer ventilen tilbake til utgangspunktet [77]. En grafisk fremstilling av gradienten som benyttes i metoden er vist i **figur 5-3**.



Figur 5-3: Grafisk fremstilling av gradientelueringen brukt i metoden for analyse av humant koriogonadotropin. Gradienten starter med 5 % mobilfase B som holdes stabilt i 3 minutter. Deretter øker andelen B lineært fra 5 % til 20 % i løpet av 7,5 minutter og andelen holdes stabilt i 17,5 minutter. Videre øker andelen B fra 20 % til 95 % i løpet av 0,1 minutt og holdes stabilt i 1 minutt. I løpet av 0,1 minutt reduserer andelen B fra 95 % til 5 % og holdes stabilt ut analysen. Den totale analysetiden for hver prøve var 42,1 minutter.

5.6.2 MS/MS-parametere

Insulin

Massespektrometriske betingelser:

Ionisering:	ESI, positiv
Sprayspenning:	4,0 kV
Kapillærtemperatur:	270 °C
Kollisjonsgass:	Argon
Kollisjonsgasstrykk:	2,0 mTorr
Forstøvergass og tørkegass:	Nitrogen
Trykk på forstøvergass:	20 arbitrære enheter
Trykk på tørkegass:	5 arbitrære enheter

Metode

Q1 oppløsning: 0,7

Q2 oppløsning: 0,7

For analyse av redusert insulin ble SRM benyttet, og monitorerte utgangsjoner og fragmentioner er vist i **tabell 5-1**. Det ble også utført fullskann og produksjonskann for insulin og tilhørende IS i området m/z 250-1500.

Tabell 5-1: Selektiv reaksjonsmonitorering-metode for redusert humant insulin og intern standard.

Forbindelse	Starttid (min)	Sluttid (min)	Utgangsjon (m/z)	Fragmentioner (m/z)	Kollisjonsenergi (V)
Humant insulin	8	16	686,9	703,3	19
				752,9	
Intern standard	8	16	680,9	688,3	19
				737,9	
				794,5	

hCG

Massespektrometriske betingelser:

Ionisering: NSI, positiv

Sprayspenning: 1.8 kV

Kapillærtemperatur: 350 °C

Kollisjonsgass: Argon

Kollisjonsgasstrykk: 1.5 mTorr

Q1 oppløsning: 0,7

Q3 oppløsning: 0,7

Det ble benyttet SRM. Monitorte utgangsjoner og fragmentioner er oppgitt i **tabell 5-2**. SRM-overgangene ble scannet fra 15-20 minutter etter analysestart fordi forbindelsene har en retensjonstid innenfor dette tidsrommet.

Tabell 5-2: Monitorte fragmentioner for β T5 og intern standard i selektiv reaksjonsmonitorering-metoden benyttet i analyse av humant koriongonadotropin.

Signaturpeptid	Starttid (min)	Sluttid (min)	Utgangsjon (m/z)	Fragmentioner (m/z)	Kollisjonsenergi (V)
β T5	15	20	964,2	1036,3	30
				1317,8	
Intern standard	15	20	969,3	1046,3	30
				1327,8	

5.7 Beregninger

Deteksjonsgrense

Likning 5-1 ble benyttet til å beregne deteksjonsgrense (LOD).

$$\text{LOD} = \text{konsentrasjon av analytt} \times 3 \times \frac{\text{høyde av støy}}{\text{topphøyde til analytt}}$$

Likning 5-1: Deteksjonsgrense.

Presisjon

Presisjon ble rapportert som prosent relativt standardavvik (RSD). **Likning 5-2** ble benyttet til å beregne RSD.

$$\text{RSD} = \frac{\text{standardavvik}}{\text{middelverdi}} \times 100 \%$$

Likning 5-2: Relativt standardavvik.

5.8 Metodeevaluering av hCG i *dried serum spots*

For metodeevaluering av serum ble det tatt utgangspunkt i følgende retningslinje:

Guideline on bioanalytical method validation, EMEA, CHMP, EWP, July 2011 [78].

5.8.1 Kalibreringskurve, linearitet og nedre kvantifiseringsgrense

I dette arbeidet ble det tilsatt IS og grafene er derfor basert på sammenhengen mellom respons og signalintensitetsforholdet $\beta T5/is\beta T5$. Kalibreringsstandarder ble tillaget ved å spike serum med en internasjonal referansestandard for hCG til konsentrasjoner på 0,01 (n=5), 0,05 (n=3), 0,2 (n=3), 0,5 (n=3) og 1,0 (n=5) IE/mL hCG. Standardene ble videre avsatt på CMC og DMPK-C kort. Det ble laget fem paralleller for 0,01 og 1,0 IE/mL hCG for å kunne beregne presisjon. For CMC ble det i tillegg laget blanke serumprøver (n=2, bare serum) og nullprøve (n=1, bare serum og IS), og for DMPK-C kortene ble det laget nullprøver (n=4, bare serum og IS). De blanke serumprøvene og null-prøvene ble benyttet til å se om den laveste konsentrasjonen i kalibreringskurvene for CMC og DMPK-C kort oppfylte kriteriet om å gi signal for $\beta T5$ som var fem ganger høyere enn støyen.

5.8.2 Nøyaktighet

En og en parallell fra høyeste og laveste konsentrasjonsnivå ble tatt ut fra kalibreringskurven i Xcalibur og brukt som kontrollprøve. For hver konsentrasjon ble det tatt et gjennomsnitt av målte punkter. Nøyaktighet er angitt som prosent utbytte i forhold til teoretisk konsentrasjon og ble beregnet ved bruk av **likning 5-3**.

$$N = \frac{\text{målt konsentrasjon}}{\text{teoretisk konsentrasjon}} \times 100 \%$$

Likning 5-3: Nøyaktighet.

5.8.3 Presisjon

Alle de målte punktene for laveste og høyeste konsentrasjonsnivå i kalibreringskurven ble benyttet til å bestemme presisjon, angitt som RSD. RSD ble beregnet etter **likning 5-2**.

5.9 Dataverktøy

5.9.1 ProteinProspector

ProteinProspector (v. 5.19.1) er et verktøy som benyttes innenfor proteinanalyse, og kan utføre in-silico fragmentering av proteiner og peptider. I denne oppgaven ble verktøyet brukt til å finne teoretiske fragmenter og tilhørende m/z -verdier fra B-kjeden i redusert humant insulin og tilhørende IS.

6 Resultater og diskusjon

I dette arbeidet ble proteinene insulin og humant koriongonadotropin (hCG) benyttet som modellanalytter.

Det ble satt et delmål om å optimalisere prøveopparbeidelse og massespektrometriske betingelser for analyse av insulin. Fokuset i dette arbeidet var å optimalisere analysemetoden for insulin basert på B-kjeden. Det ble først undersøkt om en fullstendig reduksjon av intakt insulin og intern standard (IS) ble oppnådd. Videre ble tandem massespektrometri (MS/MS)-metoden for analyse av B-kjede optimalisert basert på endret kollisjonsenergi. Det ble først gjort opti-maliseringer av produktskann, og resultatene ble benyttet i optimalisering av selektiv reaksjonsmonitorering (SRM). Stabiliteten av B-kjeden ble undersøkt i injektor og på benk. Den optimaliserte metoden ble ikke testet på reelle prøver som følge av tidsbegrensninger ilagt denne masteroppgaven, og det ble derfor bare utført innledende forsøk for insulin.

Fragmentering av intakt insulin under kollisjonsindusert dissosiasjon (CID) er ofte ufullstendig og bruk av elektroprayonisering (ESI) danner ioner med en bred ladningsfordeling. I tidligere arbeid er det vist at reduksjon av disulfidbindingene i intakt insulin har resultert i bedre fragmentering [79]. På grunnlag av dette ble intakt insulin redusert og analysemetoden for B-kjeden ble videre optimalisert fordi det var ønskelig å oppnå høyere signaler og øke metodens sensitivitet.

I arbeidet med hCG ble det benyttet et nytt nanosystem. Det var satt et delmål om å overføre og optimalisere en analysemetode for hCG fra *dried blood spots* (DBS) til det nye systemet. Metodeoptimalisering ble utført ved å endre reløsningsvolum, injeksjonsvolum, kollisjonsenergi og ved å tilsette polyetylenglykol (PEG). Den optimaliserte metoden ble videre benyttet til å teste ulike biologiske matrikser i bestemmelse av hCG fra *dried matrix spots* (DMS), og en gradientoptimalisering ble utført. Fullblod, serum, plasma og urin ble undersøkt på karboksymetylcellulose (CMC) og DMPK-C kort. Videre ble det utført en evaluering av den optimaliserte analysemetoden for bestemmelse av hCG fra *dried serum spots* (DSS). Metoden ble til slutt benyttet til å estimere konsentrasjonen av hCG i en ukjent serumprøve fra en pasient diagnostisert med testikkelkreft.

Overføring av en analysemetode fra et konvensjonelt system basert på væskechromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS) til et nano-LC-MS/MS-system skal potensielt øke metodens sensitivitet. Smalere kolonner bidrar til blant annet at høyere konsentrasjoner av analytt når massespektrometeret [58]. Ved å optimalisere metoden for hCG i det nye systemet var det ønskelig å øke følsomheten ytterligere.

Temaet for diskusjon vil først være resultatene med insulin, deretter vil hCG bli diskutert.

6.1 Insulin

Insulin er et lite protein og tryptisk klipping er derfor ikke nødvendig. En enkel prøveopparbeidelse bestående av proteinfelling er tidligere blitt utført [12]. Volumforholdet mellom fellingsreagens og prøve kan optimaliseres og derfor kan proteinfelling utføres for insulin og andre små proteiner uten at disse feller ut.

Ved å redusere intakt insulin er det forventet at metodens følsomhet skal øke fordi forbedret fragmentering bidrar til bedre ionisering og smalere topper i kromatogrammet. B-kjeden har en unik aminosyresekvens, og kvantifisering av insulin basert på B-kjede og tilhørende fragmenter fra CID er tidligere beskrevet [25].

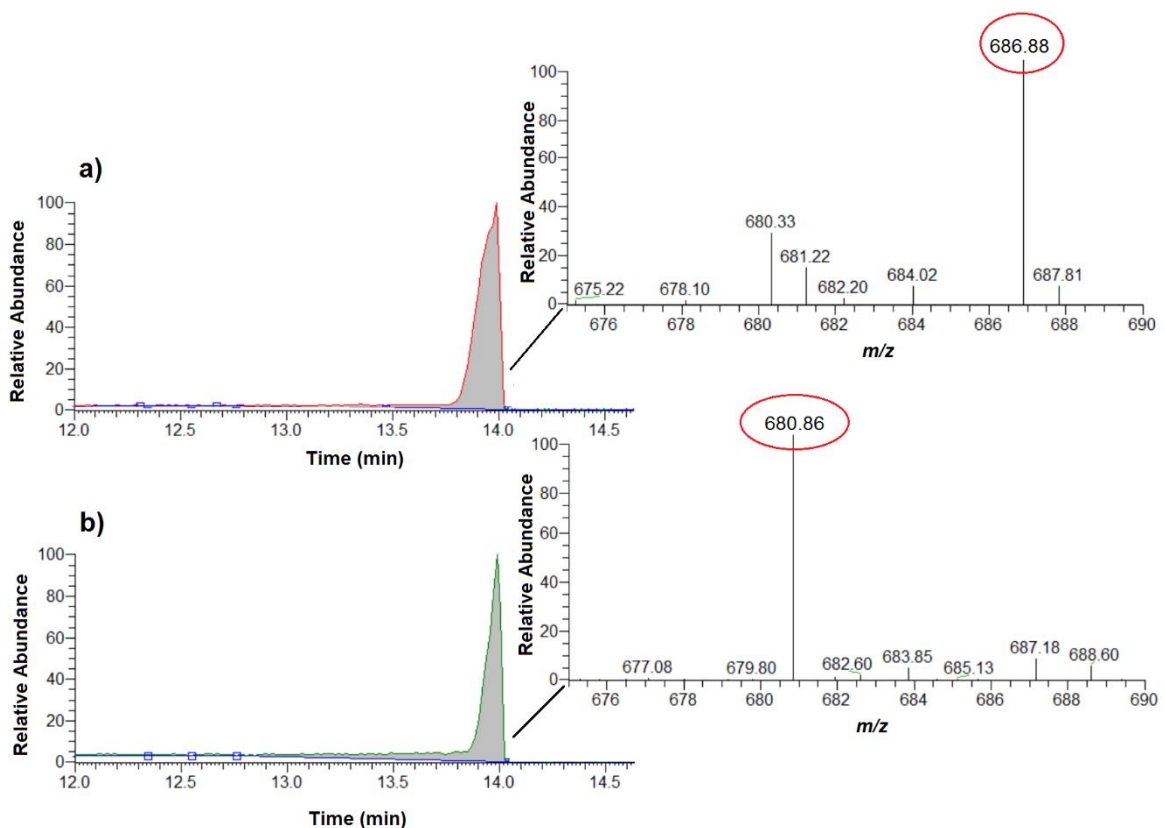
6.1.1 Reduksjon av insulin

Det ble undersøkt om reduksjonsreagenset tris-(2-karboxyetyl)-fosfin hydroklorid (TCEP) gav fullstendig reduksjon av disulfidbindingene i intakt humant og bovint insulin. I forhold til 1,4-ditiotreitol (DTT) som benyttes til reduksjon av hCG virker TCEP optimalt i et større pH-område. Videre i oppgaven omtales humant insulin som insulin og bovint insulin som IS.

Et volum på 10 μL 50 mM TCEP ble tilsatt proteinene, som er et ti ganger overskudd i forhold til antall disulfidbindinger. Deteksjonen ble stilt inn på fullskann (m/z 250-1500) for å undersøke om det forekom signal fra intakt insulin og IS. **Figur 6-1** viser kromatogrammene fra hver av de reduserte insulinløsningene, med tilhørende MS-spektre for høyeste signal. MS-spekteret for insulin viste høy forekomst av m/z 686,80 og tilsvarende m/z 680,87 for IS. Dette er i overensstemmelse med tidligere arbeid og bekrefter at signalene er fra B-kjedene i de intakte proteinene [25]. Utgangsløsningene som er benyttet for analyse av intakt insulin og IS i tidligere arbeid ble ikke funnet [12]. Ut fra forsøket ble det konkludert at det hadde skjedd en

fullstendig reduksjon. For å sikre fullstendig reduksjon i senere forsøk, ble det besluttet å alltid kjøre en prøve med redusert insulin og IS på fullskann.

Ved kvantitativ analyse av insulin basert på B-kjeden er det viktig at en fullstendig reduksjon finner sted slik at signalet til B-kjeden blir så høyt som mulig i kromatogrammet. En ufullstendig reduksjon kan gi resultater med redusert presisjon og nøyaktighet.



Figur 6-1: Kromatogrammene viser signal fra B-kjeden fra redusert insulin og redusert intern standard 10 µg/mL, med tilhørende massespektre (n=1). a) B-kjede fra insulin b) B-kjede fra intern standard.

6.1.2 Optimalisering av MS/MS

MS/MS-parametere på TSQ Quantum™ Access ble optimalisert for analyse av redusert insulin og IS. Hensikten var å finne fragmentioner som var egnet til deteksjon og kvantifisering av insulin basert på B-kjeden.

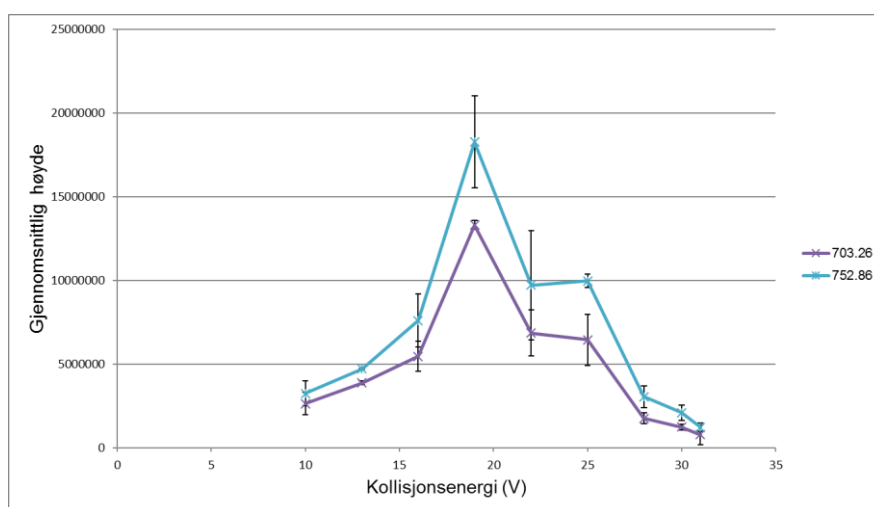
Produktionskann

Det ble utført optimalisering av produktionskann for B-kjedene fra redusert insulin og IS ved å manuelt stille inn kollisjonsenergien til 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 30 og 31 V. Videre ble MS/MS-spektrene for B-kjedene sammenlignet og ProteinProspector brukt til å finne teoretisk mulige fragmentioner og spesifikke ioner for hver av insulintypene. **Tabell 6-1** viser de fragmentionene som ble valgt ut basert på signalintensitet ved alle de testede kollisjonsenergiene.

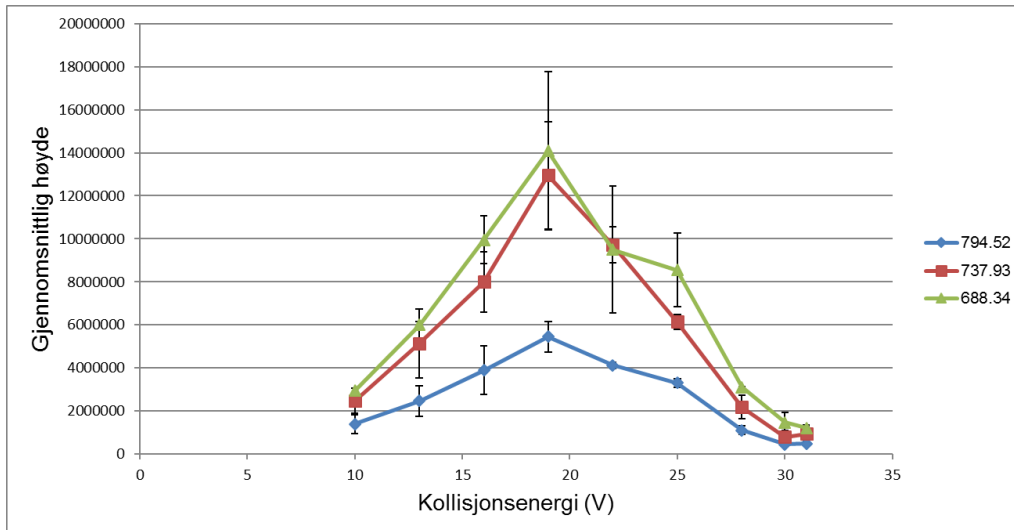
Tabell 6-1: Utvalgte fragmentioner for redusert insulin og intern standard med generelt høy intensitet ved alle de testede kollisjonsenergiene fra 10-31 V (n=2).

Utgangsjon fra insulin (m/z): 686,89		Utgangsjon fra intern standard (m/z): 680,87
Spesifikke fragmentioner (m/z)	Uspesifikke fragmentioner (m/z)	Spesifikke fragmentioner (m/z)
703,26	732,85	688,34
752,86	768,39	737,93
	824,92	794,52

Det ble videre gjort ioneuttrekk av de spesifikke fragmentionene i programvaren Xcalibur for å se på intensiteten ved varierende kollisjonsenergi. **Figur 6-2** og **figur 6-3** viser signalintensitet i form av gjennomsnittlig høyde for de spesifikke fragmentionene for henholdsvis insulin og IS.



Figur 6-2: Signalintensitet ved varierende kollisjonsenergi fra 10-31 V (n=2) for spesifikke fragmentioner fra redusert insulin.

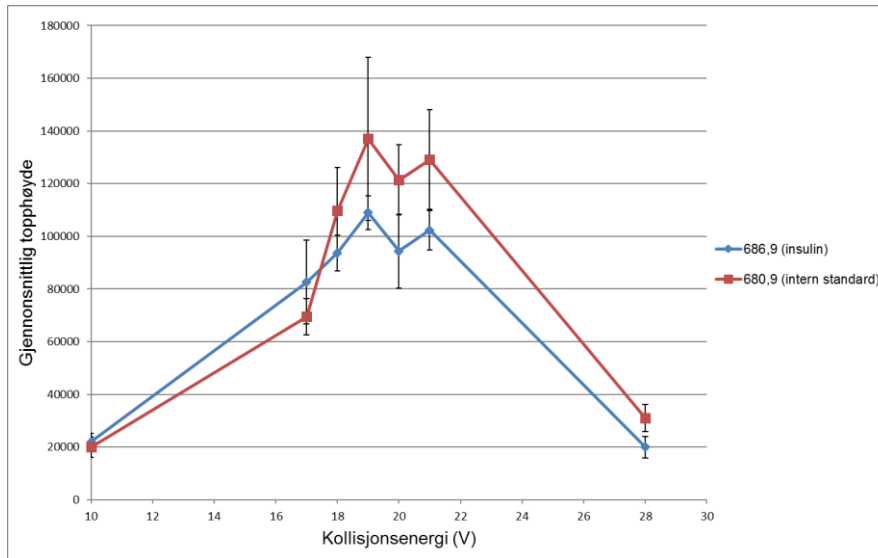


Figur 6-3: Signalintensitet ved varierende kollisjonsenergi fra 10-31 V (n=2) for spesifikke fragmentioner fra redusert intern standard.

Optimal kollisjonsenergi for de spesifikke fragmentionene fra hver av insulinypene ble funnet til å være 19 V og relativt standardavvik (RSD) $\leq 26,1$ %. Resultatene tyder på at ved en kollisjonsenergi på 19 V oppnås optimal fragmentering av utgangionene og dermed høy intensitet av de spesifikke ionene.

SRM

De utvalgte fragmentionene fra optimalisering av produksjonskann ble videre benyttet til å optimalisere SRM-metoden for analyse av B-kjedene. Redusert insulin og IS ble fortynnet til $0,1 \mu\text{g/mL}$ med $0,05$ % (v/v) plasma. Plasma er benyttet i tidligere arbeid med insulin da matriksen inneholder komponenter som metter adsorpsjonsseter på utstyr og hindrer uspesifikke bindinger mellom protein og vial. På denne måten kan en forbedret repeterbarhet oppnås [80]. Den optimaliserte metoden ble finjustert på SRM, og kollisjonsenergien ble manuelt stilt til 10, 17, 18, 19, 20, 21 og 28 V. Kun spesifikke fragmentioner for hver av insulinypene ble monitorert. **Figur 6-4** viser signalintensitet i form av gjennomsnittlig høyde for insulin og IS ved de testede kollisjonsenergiene.



Figur 6-4: Signalintensitet for redusert insulin og intern standard ved varierende kollisjonsenergi fra 10-28 V (n=5). Kun spesifikke fragmentioner ble monitorert for insulin og intern standard (m/z 703,26 og 752,86 for insulin og 794,52, 737,93 og 688,34 for intern standard).

Det ble sett at en kollisjonsenergi på 19 V gav høyest signalintensitet for m/z 686,9 og 680,9. RSD var henholdsvis 6,0 % og 22,6 %. Disse resultatene tyder på at 19 V er den optimale kollisjonsenergien for fragmentering av m/z 686,9 og 680,9 til spesifikke fragmentioner. Dette er resultater som kan benyttes videre ved analyse av insulin og IS basert på B-kjede, og bidra til at lavere konsentrasjoner kan detekteres og kvantifiseres.

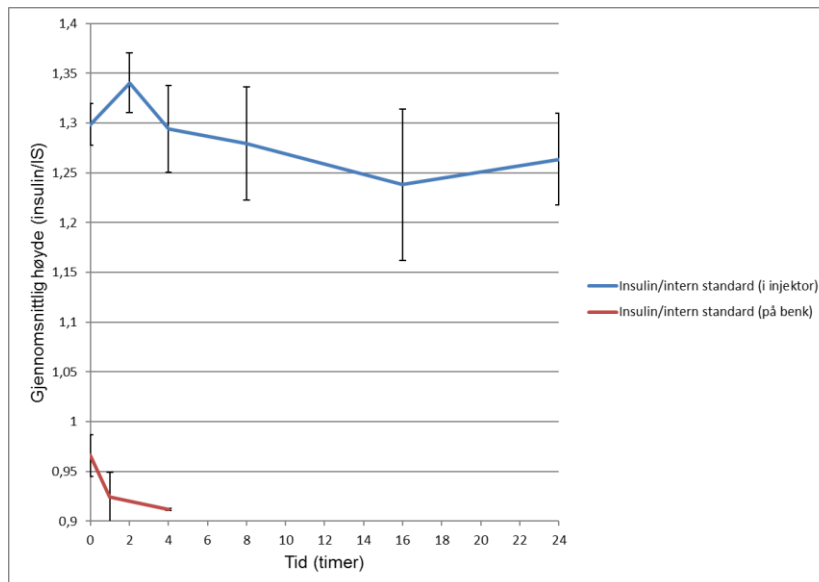
Estimering av mulig økt følsomhet

Resultatene fra optimaliseringen av SRM-metoden ble sammenlignet med resultater fra et tidligere innledende forsøk hvor insulin ble analysert intakt. Kromatogrammene viste over fire ganger høyere signaler for B-kjeden i forhold til intakt insulin. Ut fra disse resultatene kan det estimeres at en fire ganger lavere deteksjonsgrense (LOD) for insulin kan oppnås ved å inkorporere reduksjon av insulin i metoden. Dette er et grovt estimat basert på resultater fra analyser av insulin spiket i 20 mM maursyre, som har gitt rene kromatogrammer med lite støy. Den optimaliserte metoden bør derfor testes på reelle prøver for et sikrere estimat.

6.1.3 Stabilitet av insulin

Når insulin skal analyseres basert på B-kjeden er det viktig å vite noe om kjedens stabilitet i tidsrommet fra prøvene er ferdig tillaget til prøvene injiseres for analyse. En eventuell nedbrytning kan påvirke den kvalitative og kvantitative analysen, og gi unøyaktige og store variasjoner i resultatene.

Stabilitet av B-kjedene fra insulin og IS ble undersøkt på benk og i injektor i henholdsvis fire og 24 timer, som er realistiske oppbevaringstider ved disse betingelsene. **Figur 6-5** viser signalintensitet (høydeforhold insulin/IS) av prøvene som funksjon av tid i injektor og på benk. I begge stabilitetsforsøkene ble det injisert 100 ng/mL redusert insulin og IS.



Figur 6-5: Signalintensitetsforholdet insulin/intern standard som funksjon av tid i injektor og på benk. Prøvene i injektor ble analysert etter 0, 2, 4, 8, 16 og 24 timer (n=3). Prøvene på benk ble analysert etter 0, 1 og 4 timer (n=3).

Signalintensitetsforholdet insulin/IS burde i utgangspunktet vært cirka det samme ved 0 timer på benk og i injektor, da prøvene skulle blitt analysert direkte etter fullført prøveopparbeidelse. Forholdet er mindre for prøvene på benk, og grunnen til dette kan være at prøvene ikke ble analysert direkte som følge av oppstartsproblemer med instrumentet. I løpet av denne tiden kan for eksempel nedbrytning ha forekommet, adsorpsjon til inserts eller gjen-dannelse av disulfidbindinger. Hvis IS korrigerer for variasjoner skal konsentrasjonsforholdet insulin/IS være konstant til enhver tid. I dette tilfellet varierte forholdet i injektor og på benk, som kan tyde på at IS ikke er tilstrekkelig god nok. Forsøket burde blitt gjentatt for sikrere resultater.

6.2 hCG

Det ble tatt utgangspunkt i en publisert analysemetode for hCG i fullblod, som ble utviklet i et konvensjonelt LC-MS/MS-system. Prøveopparbeidelsen bestod av en ekstraksjon basert på immunoaffinitet for oppkonsentrering og opprensning, og hCG ble klippet med trypsin før fast-fase-ekstraksjon (SPE). Det ble vist at CMC var godt vannløselig ved fysiologisk pH og derfor kompatibelt med immunoekstraksjon fordi hCG blir tilgjengelig for ekstraksjon [1].

I dette arbeidet ble den publiserte LC-MS/MS-metoden for analyse av hCG overført til et nano-LC-MS/MS-system og videre optimalisert fordi det var ønskelig å forbedre metodens følsomhet. Det ble først gjort et innledende forsøk og deretter ble det utført optimaliseringer av reløsningsvolum, injeksjonsvolum og kollisjonsenergi. Metoden ble videre benyttet til å teste andre biologiske matrikser, og tilsetning av PEG ble undersøkt. Videre ble det utført en metodeevaluering av hCG fra DSS, og metoden ble benyttet til å estimere konsentrasjonen av hCG i en ukjent serumprøve.

6.2.1 Optimalisering av prøveopparbeidelse og nano-LC-MS/MS

I dette arbeidet ble den publiserte metoden overført fra et konvensjonelt LC-MS/MS-system til et nanosystem på TSQ Quantiva™, og som følge av dette ble metoden automatisk modifisert og optimalisert. Nanosystemet har et nytt og forbedret massespektrometer som skal gjøre systemet mer følsomt. Systemet har i tillegg andre modifikasjoner som en separasjonskolonne med redusert indre diameter og redusert mobilfasehastighet. Den konvensjonelle separasjonskolonnen hadde en indre diameter på 1 mm, og i det nye nanosystemet var kolonnens indre diameter redusert til 0,075 mm. Dette bidrar til at den radiale fortynningen reduseres og konsentrasjonen av β T5 som introduseres i massespektrometeret blir høyere [57]. Mobilfasehastigheten i den opprinnelige metoden var 50 μ L/min, og i det nye nanosystemet ble hastigheten endret til 0,3 μ L/min. En lavere mobilfasehastighet bidrar blant annet til dannelse av mindre dråper ved ESI og forbedret overføring av ioner inn i massespektrometeret [58].

Den kromatografiske separasjonsprosessen var kortere i den opprinnelige metoden, med en elueringsgradient som varte i 10,9 minutter. I nanosystemet hadde gradienten en varighet på 29 minutter når ventilen stod i posisjon slik at β T5 gikk fra oppkonsentreringskolonnen til separasjonskolonnen. Ved å benytte en lenger gradient kan ESI-MS detektere flere peptider da

blant annet forekomsten av ionesuppresjon minimaliseres, og dette er fordelaktig når komplekse biologiske matrikser skal analyseres [58].

Andre endrede betingelser for metoden ved overføringen fra det konvensjonelle LC-MS/MS-systemet til nanosystemet var redusert injeksjonsvolum fra 20 til 2 μL . Sprayspenning ble redusert fra 4 til 1,8 kV. Trykket på kollisjonsgassen ble satt ned fra 1,7 til 1,5 mTorr. Kapillærtemperaturen ble økt fra 224 til 350 $^{\circ}\text{C}$.

Innledende forsøk

Det ble gjort et innledende forsøk med hCG etter overføring av metoden til det nye systemet og før optimalisering for å undersøke oppnådd sensitivitet. LOD for hCG i fullblod avsatt på CMC ble estimert basert på høydeforholdet mellom signalet for βT5 og støy, som skal være tre eller større. Konsentrasjon av hCG og de estimerte verdiene etter overføring er oppgitt i **tabell 6-2**. Kun to paralleller for 0,01 IE/mL hCG gav signal for βT5 . For begge de testede konsentrasjonene var RSD < 20 %.

Tabell 6-2: Estimerte verdier for deteksjonsgrense av humant koriongonadotropin etter overføring til nanosystemet og før metodeoptimalisering.

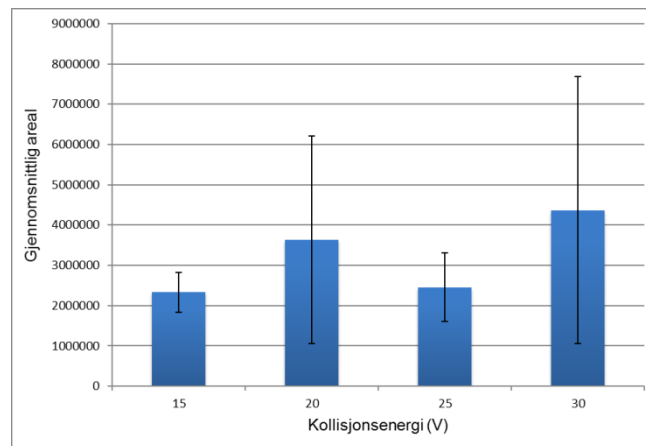
Konsentrasjon av humant koriongonadotropin fra Pregnyl® (IE/mL)	n	Deteksjonsgrense (IE/mL)
0,01	2	0,034
0,05	4	0,073

Den publiserte analysemetoden på konvensjonelt LC-MS/MS-system genererte en LOD-verdi på 0,1 IE/mL hCG i fullblod avsatt på CMC [1]. Etter metodeoverføringen til det nye nanosystemet ble det estimert en cirka tre ganger lavere LOD-verdi med 0,01 IE/mL hCG. Beregnede LOD-verdier for de ulike konsentrasjonene skal i teorien være det samme da prøveopparbeidelsen og LC-MS/MS-betingelsene ikke endres. I dette tilfellet er avviket stort og det er derfor større usikkerhet rundt estimerte verdier. Konsentrasjonen på 0,01 IE/mL hCG er lavere enn begge estimerte LOD-verdier. Alle parallellene med 0,05 IE/mL hCG gav signalhøyde som var to til to og en halv ganger høyere enn signalene for 0,01 IE/mL. 0,05 IE/mL hCG er en fem ganger høyere konsentrasjon enn 0,01 IE/mL, og det er derfor forventet at signalhøyden skal øke tilsvarende. Resultatene bidrar til stor usikkerhet rundt

estimerte verdier og dette kan tyde på at metoden ikke er sensitiv nok til å detektere 0,01 og 0,05 IE/mL hCG. For et sikrere estimat for oppnådd forbedring i sensitivitet ved overføring til nanosystemet burde høyere konsentrasjoner av hCG blitt undersøkt.

Reløsningsvolum, injeksjonsvolum og kollisjonsenergi

Reløsningsvolum, injeksjonsvolum og kollisjonsenergi ble optimalisert med hensikt å øke responsen for β T5. Kollisjonsenergi som benyttes ved fragmentering av ioner i q2 er viktig for hvilke fragmenter som dannes og intensiteten til de monitorerte fragmentationene. Det ble først forsøkt å finne en optimal kollisjonsenergi som gav høyest fragmentintensitet for β T5, og som kunne benyttes i videre forsøk. Dette ble utført ved å analysere QC-prøver og variere spenningen fra 15-30 V. **Figur 6-6** presenterer resultatene. Optimal kollisjonsenergi ble funnet til å være 30 V, som er den spenningen som også ble benyttet i den publiserte metoden [1]. Kollisjonsenergi på 30 V viste høyest gjennomsnittlig areal for β T5, men standardavviket var også størst ved denne spenningen. Ved for høy kollisjonsenergi kan ukontrollert fragmentering forekomme, som betyr at økt kollisjonsenergi ikke nødvendigvis gir høyere intensitet for de monitorerte fragmentationene. Dette fremkommer i resultatene. Til tross for det høye standardavviket ble det besluttet at 30 V skulle benyttes videre, men for sikrere resultater burde forsøket ha blitt gjentatt.



Figur 6-6: Gjennomsnittlig toppareal for β T5 oppnådd ved varierende kollisjonsenergi fra 15-30 V (n=3).

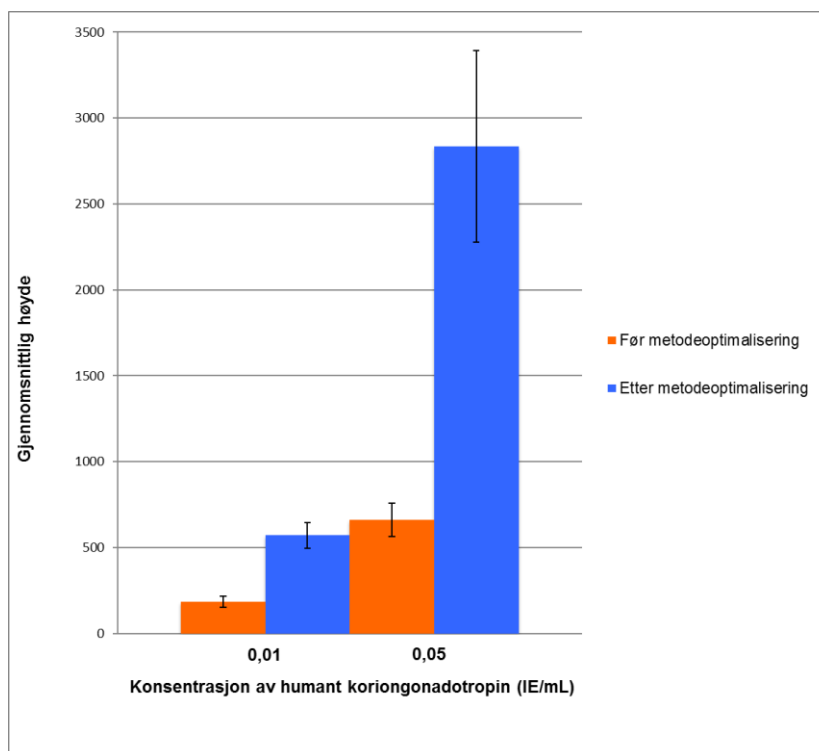
Betingelsene før og etter optimalisering av reløsningsvolum, injeksjonsvolum og kollisjonsenergi er vist i **tabell 6-3**. Ved å redusere reløsningsvolum og øke injeksjonsvolum var hensikten å injisere en høyest mulig konsentrasjon av β T5. Disse parameterne henger

sammen, og det er begrenset hvor mye høyere responsen kan bli ved å kun endre disse betingelsene.

Tabell 6-3: Tidligere betingelser og optimaliserte betingelser som ble benyttet for estimering av deteksjonsgrense til humant koriongonadotropin i fullblod, avsatt på karboksymetylcellulose.

	Før	Nå
Reløsningsvolum (µL)	50	20
Injeksjonsvolum (µL)	2	10
Kollisjonsenergi (V)	20	30

Den optimaliserte metoden genererte høyere respons for β T5. For begge konsentrasjonene har optimaliseringene resultert i tre til fire ganger økning i signalintensitet. **Figur 6-7** presenterer signalintensiteten til β T5 i form av gjennomsnittlig topphøyde før og etter metodeoptimalisering for 0,01 og 0,05 IE/mL hCG. RSD < 20 % for begge konsentrasjonene. De estimerte LOD-verdiene for hCG med den optimaliserte metoden er presentert i **tabell 6-4**.



Figur 6-7: Gjennomsnittlig topphøyde før og etter metodeoptimalisering for 0,01 og 0,05 IE/mL humant koriongonadotropin (n=3).

Tabell 6-4: Estimerte verdier for deteksjonsgrense til humant koriongonadotropin etter optimalisering av reløsningsvolum, injeksjonsvolum og kollisjonsenergi.

Konsentrasjon av humant koriongonadotropin fra Pregnyl® (IE/mL)	Deteksjonsgrense (IE/mL)
0,01	0,008
0,05	0,011

Avviket i de estimerte LOD-verdiene med den nye optimaliserte metoden er mindre i forhold til estimerte LOD-verdier før optimalisering. Dette bidrar til sikrere estimater. Laveste LOD-verdi ble estimert til 0,008 IE/mL, og konsentrasjonene som er testet er høyere enn estimert LOD. Dette tyder på at konsentrasjonene med sikkerhet kan detekteres med de optimaliserte betingelsene. Det ble besluttet at den optimaliserte metoden skulle benyttes videre.

PEG

Det ble observert store variasjoner i topparealet til β T5, og RSD varierte fra 27-53 %. På grunnlag av dette ble det gjort et forsøk hvor det ble undersøkt om repeterbarheten ble bedre ved å tilsette surfaktanten PEG, som ble benyttet i den publiserte metoden [1].

Adsorpsjon av proteiner og peptider til overflater på utstyr eller i analyseinstrument er en kjent utfordring. Konsekvensen av dette er blant annet redusert følsomhet og dårlig repeterbarhet. Ved å tilsette en surfaktant eller bærerprotein kan forekomsten av protein- og peptid-adsorpsjon minimaliseres [78].

Forsøket ble utført ved å fortynne ferdigklippet hCG i 20 mM maursyre med 0,001 % PEG 20 000 til 0,5 IE/mL og 5,0 IE/mL. Resultatene er presentert i **tabell 6-5**. Det ble vist at bruk av PEG gav bedre repeterbarhet, som kan indikere redusert forekomst av adsorpsjon og dermed redusert tap av hCG. Siden RSD < 20 % ble det besluttet at PEG skulle tilsettes alle prøver i videre forsøk.

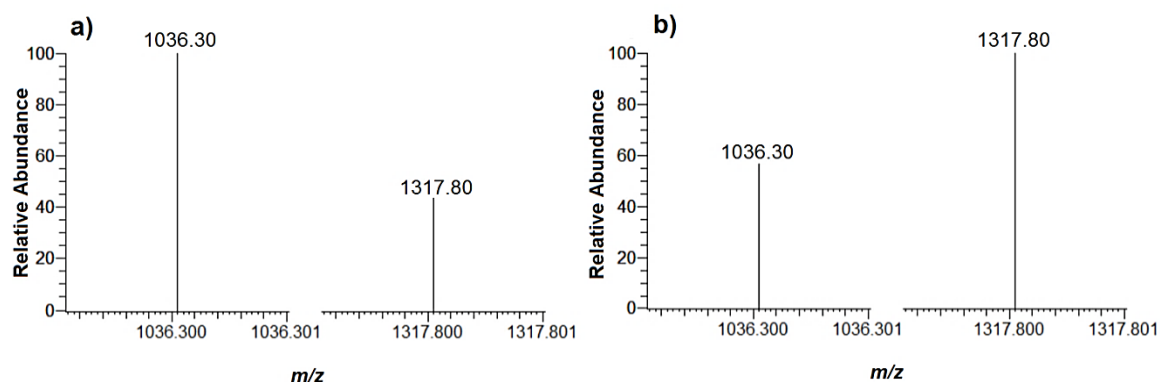
Tabell 6-5: Relativt standardavvik for de ulike konsentrasjonene av humant koriongonadotropin etter reløsing i 20 mM maursyre med 0,001 % polyetylglykol.

Konsentrasjon av humant koriongonadotropin fra Pregnyl® (IE/mL)	n	Relativt standardavvik
0,5	10	15,1 %
5	10	5,2 %

6.2.2 Analyse av hCG fra ulike biologiske matrikser

Gradientoptimalisering

hCG ble analysert i serum avsatt på CMC i konsentrasjoner på 0,1 IE/mL (n=5) og 0,02 IE/mL (n=5). For den laveste konsentrasjonen viste signalet for β T5 et annet intensitetsforhold mellom de monitorerte overgangene enn tidligere sett i fullblod. Dette ble også sett i blanke serumprøver fra en annen batch og blanke plasmaprøver. **Figur 6-8** viser fragmentmønsteret for monitorerte fragmentioner for β T5 i serum og fullblod.



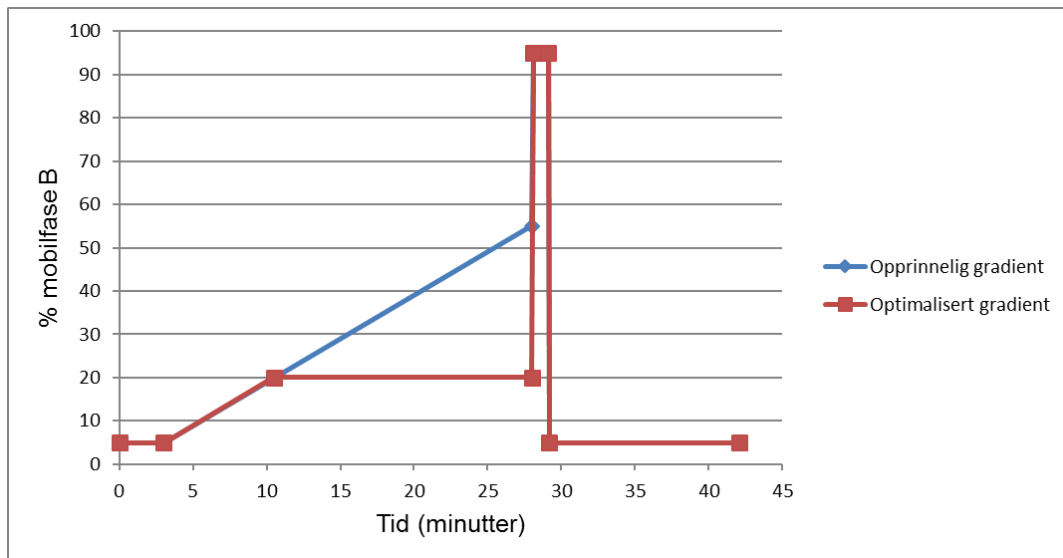
Figur 6-8: Fragmentmønsteret for β T5 i a) serum b) fullblod.

Når det benyttes like kromatografiske og massespektrometriske parametere ved analyse av hCG skal fragmentering av β T5 og fragmentmønsteret være tilnærmet lik fra analyse til analyse. En mulig årsak til at fragmentmønsteret kun ble observert i den laveste konsentrasjonen av hCG kan være at 0,02 IE/mL hCG er for lav til å kunne detekteres i serum. Fragmentmønsteret ble også observert i blank serum og blank plasma. Dette kan tyde på at en matrikskomponent har koeluert med β T5 som følge av lignende hydrofobe egenskaper, og at komponenten har samme m/z -verdi som β T5. Tilstedeværelse av endogent hCG i de biologiske matriksene som ble undersøkt kan være en mulig kilde til den

koeluerende toppen. Endogent hCG kan ha fragmentert annerledes som følge av modifikasjoner på peptidet. Forurensningen ble ikke sett i urin og fullblod.

Det koeluerende signalet ble ikke sett i hCG spiket i 20 mM maursyre og blanke prøver, og det ble derfor utelukket at hCG-stamløsningene og instrumentet var kilden til signalet. Det ble forsøkt å separere signalet for β T5 og forurensningen ved å optimalisere gradienten. Først ble QC-prøver analysert med ulike gradienter med hensikt å finne den gradienten som gav lengst retensjonstid for β T5. Strategien for å separere signalene var basert på redusere den økende andelen mobilfase B per minutt slik at β T5 fikk lavere affinitet for mobilfasen og økt retensjonstid. Det så imidlertid ut som at forurensningen ble forflyttet sammen med signalet for β T5.

For en av gradientene som ble undersøkt ble det sett at deler av signalet for β T5 i serum gav riktig fragmentmønster for de monitorerte fragmentationene. **Figur 6-9** viser en grafisk fremstilling av den optimaliserte gradienten. Den optimaliserte gradienten ble benyttet videre i analyse av 0,02 IE/mL hCG spiket i serum, plasma, fullblod og urin avsatt på CMC, og det koeluerende signalet var ikke tilstede. Gradienten kan ha klart å separere β T5 fra forurensningen, men det kan også muligens ha skjedd en degradering av forurensningen under lagring. Det ble besluttet at gradienten skulle benyttes videre.



Figur 6-9: Grafisk fremstilling av gradienten som ble benyttet før optimalisering og den optimaliserte gradienten.

Vannløselig materiale og kommersielle prøvetakingskort som medium for DMS

CMC og kommersielle DMPK-C kort ble testet som medium for DMS fordi det var ønskelig å få mer kunnskap om disse materialene som prøvetakingsmateriale for ulike biologiske matrikser.

Pregnyl® ble spiket i fullblod, serum, plasma og urin, og fortynnet til en sluttkonsentrasjon på 0,02 IE/mL. Prøvene ble avsatt på CMC og DMPK-C kort. Det ble besluttet at 0,02 IE/mL hCG skulle benyttes fordi det gav god margin til tidligere estimert LOD-verdi for hCG i fullblod (0,008 IE/mL).

Bruk av vannløselig DMS-materiale

Tabell 6-6 oppgir estimerte LOD-verdier for de ulike matriksene avsatt på CMC. For plasma ble verdien estimert fra fire paralleller da en av parallellene ikke gav signal for β T5 og IS.

Tabell 6-6: Estimerte deteksjonsgrenser for 0,02 IE/mL humant koriongonadotropin spiket i plasma, serum, fullblod og urin avsatt på karboksymetylcellulose.

	n	Deteksjonsgrense (IE/mL)
Urin	5	0,00214
Serum	5	0,00301
Fullblod	5	0,00490
Plasma	4	0,00642

Øvre referansegrense for hCG hos menn og ikke-gravide kvinner er som tidligere nevnt mellom 0,0007-0,0054 IE/mL. Fullblod har et større innhold av matrikskomponenter enn serum og plasma. Det vil derfor være naturlig å tenke at fullblod gir mer støy i kromatogrammene og høyere deteksjonsgrenser for hCG. Derimot var plasma den matriksen med høyest estimert LOD, som også var utenfor referansenivået. Resultatene for plasma viste store variasjoner, med en RSD på 49 %. I blanke plasmaprøver uten spiket hCG ble det sett at støynivået var på cirka samme høyde som i blank fullblod. Innholdet av antikoagulasjonsmiddelet citrat fosfat dekstrose-adenin (CPDA-1) kan være en mulig årsak, og betydelig mindre støy og variasjoner i serumprøvene kan tyde på dette. En annen mulig kilde til variasjoner for plasma kan være innhold av koeluerende forurensninger som har påvirket signalet for hCG.

Støynivået var lavest i urinprøvene, og matriksen genererte lavest estimerte LOD-verdi på 0,002 IE/mL. Dette samsvarer med tidligere arbeid hvor estimert LOD for hCG i urin var lavere enn i serum (ikke DMS) [47]. Resultatet for urin var forventet da urinens sammensetning er mindre kompleks og har et vesentlig lavere innhold av proteiner som følge av ultrafiltrasjon i nyrene [71].

Bruk av kommersielt tilgjengelige DMS-kort

Estimerte LOD-verdier for de ulike matriksene avsatt på DMPK-C kort står oppgitt i **tabell 6-7**. For urin var det to paralleller som ikke viste signal for β T5 og IS, og LOD ble derfor estimert fra tre paralleller.

Tabell 6-7: Estimerte deteksjonsgrenser for 0,02 IE/mL humant koriongonadotropin i plasma, serum, fullblod og urin avsatt på DMPK-C kort.

	n	Deteksjonsgrense (IE/mL)
Urin	3	0,01054
Serum	5	0,00781
Fullblod	5	0,00500
Plasma	5	0,00891

Sett i forhold til resultatene fra forsøket med CMC genererte alle matriksene utenom fullblod betydelig lavere topphøyde for β T5. Dette bidro til høyere LOD-verdier. For plasma ble det observert store variasjoner i resultatene, og RSD var 152,2 %. Estimert LOD for hCG i fullblod avsatt på DMPK-C kort er tilnærmet lik estimert verdi for CMC, og dette kan tyde på at en fullstendig eluering av fullblod har skjedd. For de resterende biologiske matriksene som ble undersøkt kan det se ut som at elueringen var ufullstendig. Under eluering og immunoekstraksjon på HulaMixer® ble det observert at materialet festet seg i endene av prøverørene og ikke fulgte PBS-løsningen. Dette kan muligens ha påvirket elueringen da materialet ikke får blandet seg og kommet i ordentlig kontakt med løsningen til enhver tid. Det var en tendens til at kulene festet seg til materialet og dette kan ha vært en kilde til tap av hCG da materialet ble fjernet fra prøven først etter immunoekstraksjon. Avsatt urin var ikke mulig å se etter tørking i to timer og det kan komme av at det ble benyttet en lysere urin enn tidligere. Til tross for at DMPK-C kortene har et markert område hvor prøve skal avsettes kan urin ha

spredt seg utenfor og ikke blitt tatt med videre. Flere faktorer kan ha bidratt til at hCG kan ha gått tapt. IS tilsettes like før SPE utføres og korrigerer derfor ikke for variasjoner oppstått før SPE.

6.2.3 Metodeevaluering av hCG fra *dried serum spots*

Det ble gjennomført en metodeevaluering av hCG fra serum på vannløselig og ikke-vannløselig materiale. Hensikten var å få en indikasjon på metodens egnethet til å kvantifisere hCG fra DSS på de ulike materialene. Serum ble benyttet i evalueringen fordi matriksen gav en av de laveste estimerte LOD-verdiene på begge materialene, som vist i **tabell 6-6** og **tabell 6-7**. Det var i tillegg tilgang på serumprøver fra pasienter.

Validering av bioanalytiske metoder for DMS følger retningslinjer for vandig matriks da det på nåværende tidspunkt ikke er utarbeidet egne retningslinjer for tørket matriks [7]. I metodeevalueringen ble det tatt utgangspunkt i retningslinjene fra *European Medicines Agency* (EMA), og kapitlet *Ligand binding assays* fordi immunoekstraksjon var en del av prøveopparbeidelsen som ble utført. EMA har egne anbefalinger for validering av analysemetoder hvor binding til ligand inngår fordi teknikken blant annet ofte benyttes for analytter med komplekse strukturer [81].

I evalueringen ble det lagt vekt på metodens linearitet, nøyaktighet og presisjon. Metodens nøyaktighet og presisjon ble vurdert basert på laveste og høyeste konsentrasjonsnivå i kalibreringskurven.

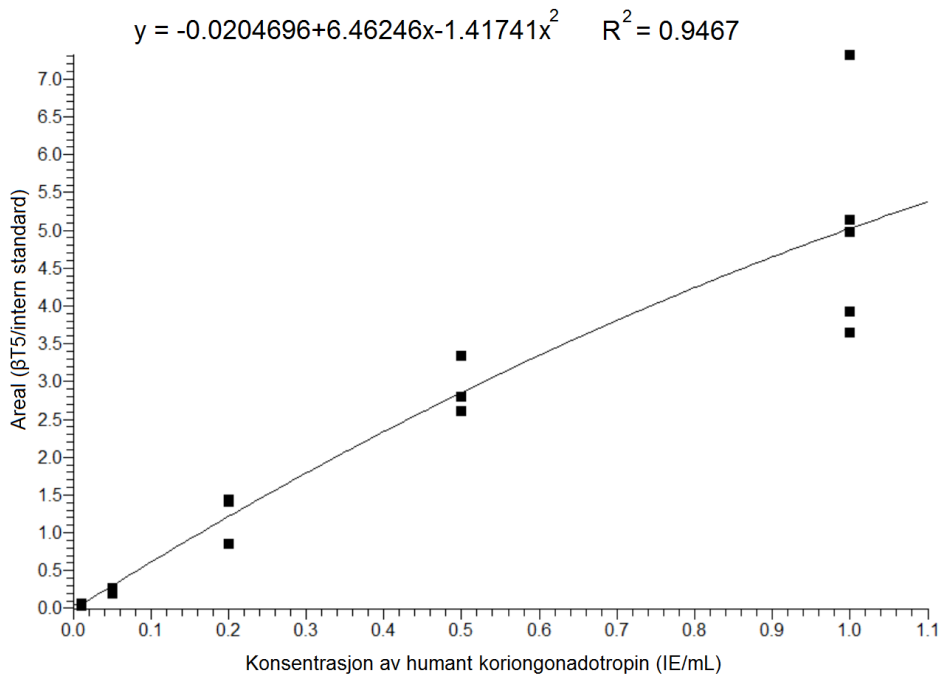
Bruk av vannløselig DMS-materiale

Kalibreringskurve, linearitet og nedre kvantifiseringsgrense

Det ble forsøkt å lage lineære kurver, men for CMC gav målte konsentrasjoner av kontrollprøver negative verdier. I følge retningslinjene blir kalibreringskurver generelt ikke lineære når immunoekstraksjon er en del av metoden [81]. Programvaren Xcalibur ble benyttet til å finne en egnet kurve, og kvadratisk vektet kurve viste høyest r^2 -verdi for CMC og ble derfor benyttet for begge materialene.

En kvadratisk vektet kalibreringskurve for hCG avsatt på CMC ble satt opp basert på kalibreringsstandarder med konsentrasjoner på 0,01, 0,05, 0,2, 0,5 og 1,0 IE/mL, som vist i

figur 6-10. Korrelasjonskoeffisienten, r^2 , måler styrken på sammenhengen mellom signalintensitetsforholdet $\beta T5/is\beta T5$ og respons, og ble beregnet til 0,9467.



Figur 6-10: Kalibreringskurve for humant koriongonadotropin i serum avsatt på karboksymetylcellulose i konsentrasjonsområdet 0,01-1,0 IE/mL.

Nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) er den laveste konsentrasjonen i kalibreringskurven som, ifølge EMA sine anbefalinger, bør gi et signal for analytt som er minimum fem ganger høyere enn støyen i blank serum [81]. Dette kravet ble ikke oppfylt for hCG. LOD til hCG i serum avsatt på CMC ble, som vist i **tabell 6-6**, estimert til 0,003 IE/mL. Ut fra dette burde en konsentrasjon på 0,01 IE/mL gi et signal høyere enn fem ganger støyen. En grunn til at dette ikke er tilfellet kan være tilstedeværelse av matrikskomponenter som bidrar til mer støy i kromatogrammene.

Nøyaktighet og presisjon

Nøyaktigheten til en analytisk metode er avviket i kontrollprøvenes målte konsentrasjon fra teoretisk konsentrasjon. Presisjon beskriver spredning i resultatene ved gjentatte individuelle målinger av analytt under samme betingelser i løpet av en kort tidsperiode. **Tabell 6-8** oppgir målte konsentrasjoner, nøyaktighet (angitt som prosent utbytte i forhold til sann verdi) og presisjon (angitt som prosent relativt standard avvik) for den analytiske metoden med CMC som medium for DMS.

Tabell 6-8: Nøyaktighet og presisjon for kontrollprøver avsatt på karboksymetylcellulose.

Teoretisk konsentrasjon (IE/mL)	Målt konsentrasjon (IE/mL)	n	Nøyaktighet (utbytte, %)	Presisjon (RSD, %)
0,01	0,011	5	111	26,3
1,0	0,844	5	84	23,6

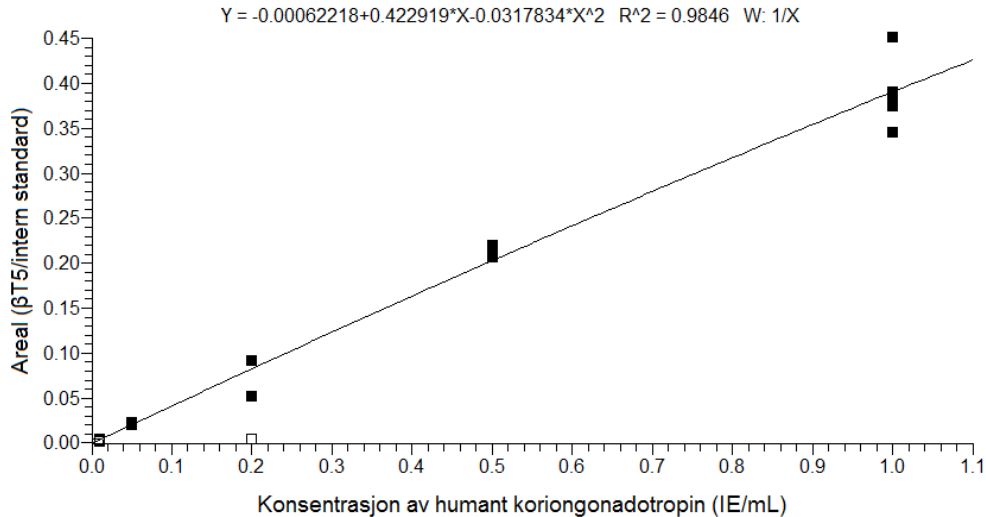
Øvre kvantifiseringsgrense (ULOQ) er den høyeste konsentrasjonen i kalibreringskurven. I følge EMA bør den målte konsentrasjonen for LLOQ og ULOQ ha et avvik ≤ 25 % fra teoretisk konsentrasjon [81]. Siden 0,01 IE/mL hCG ikke oppfyller kravet om å gi signal som er fem ganger høyere enn støyen følges ikke anbefalingene for LLOQ, og kravet er derfor ≤ 20 %. Både 0,01 og 1,0 IE/mL innfridde kravene i retningslinjene.

EMAs anbefalinger knyttet til presisjon er RSD ≤ 25 % for ULOQ og ≤ 20 % for resterende konsentrasjoner [81]. ULOQ innfridde kravet. RSD for 0,01 IE/mL ble beregnet til å være 26,3 % og er dermed ikke innenfor kravet på ≤ 20 % i retningslinjene.

Bruk av kommersielt tilgjengelige DMS-kort

Kalibreringskurve og linearitet

En kvadratisk vektet kurve for hCG avsatt på DMPK-C kort ble satt opp basert på kalibreringsstandarder med konsentrasjoner på 0,05, 0,2, 0,5 og 1,0 IE/mL som vist i **figur 6-11**. For DMPK-C kortene ble det laget kalibreringskurve uten laveste konsentrasjon på 0,01 IE/mL da signalene for β T5 ikke var tre ganger høyere enn støyen i nullprøvene og dermed ikke kunne detekteres med sikkerhet. En parallell med 0,2 IE/mL hCG ble fjernet som følge av lavt signal. Beregnet korrelasjonskoeffisient var 0,9846.



Figur 6-11: Kalibreringskurve for humant koriongonadotropin i serum avsatt på DMPK-C kort i konsentrasjonsområdet 0,05-1,0 IE/mL. 0,01 og 0,02 IE/mL (en parallell) er tatt ut av kurven, og punktene vises som hvite firkanter.

Nøyaktighet og presisjon

Målte konsentrasjoner, nøyaktighet og presisjon for den analytiske metoden med DMPK-C kort som DMS-materiale er oppgitt i **tabell 6-9**. Nøyaktigheten til den bioanalytiske metoden på DMPK-C var innenfor EMAs anbefalinger da ULOQ gav utbytte med et avvik < 25 % og 0,05 IE/mL hCG med avvik < 20 % [81].

Presisjonskriteriet i retningslinjene ble oppfylt for metoden med DMPK-C. Laveste konsentrasjon gav RSD på 10,3 % og kravet er $RSD \leq 20$ %. Kravet til ULOQ er $RSD \leq 25$, og dette ble innfridd med en RSD for ULOQ på 14,6 % [81].

Tabell 6-9: Nøyaktighet og presisjon for kontrollprøver avsatt på DMPK-C kort.

Teoretisk konsentrasjon (IE/mL)	Målt konsentrasjon (IE/mL)	n	Nøyaktighet (utbytte, %)	Presisjon (RSD, %)
0,05	0,054	3	107,3	10,3
1,0	1,004	5	100,4	14,6

Sammenligning av DMS-materialene

Ved å kartlegge metodens egenskaper med serum avsatt på CMC og DMPK-C kort kan metoden evalueres og sammenlignes for de ulike materialene. R^2 -verdien for CMC og

DMPK-C kortene var henholdsvis 0,9467 og 0,9846. For DMPK-C kortene ble det tatt bort et punkt i kalibreringskurven som gir et mer usikkert estimat for sammenhengen mellom signalintensitetsforholdet $\beta T5/is\beta T5$ og konsentrasjon. Kravet til nøyaktighet og presisjon ble innfridd for metoden med DMPK-C kort. Metoden med CMC oppfylte nøyaktighetskravet, men kravet til presisjon ble ikke innfridd da RSD var 26,3 %. Det er ønskelig at kalibreringskurvene skal være enda bedre tilpasset punktene. I en internasjonal retningslinje for validering av bioanalytiske metoder er kravet til kalibreringskurven $r^2 > 0,99$ [82]. Ingen av kurvene innfridde dette kravet. Det kan diskuteres om bruk av flere konsentrasjoner og flere paralleller for hver konsentrasjon ville gitt en bedre tilpasset kurve for CMC og at negative verdier for kontrollprøvene kunne vært unngått. Resultatene er ikke tydelig nok til å kunne si hvilket materiale som er best egnet for analyse av hCG fra DSS.

6.2.4 Analyse av serum fra pasient diagnostisert med testikkelkreft

En ukjent serumprøve fra en pasient diagnostisert med testikkelkreft ble analysert for å teste metodene. Konsentrasjonen av hCG ble estimert ved hjelp av kalibreringskurvene som vist i **figur 6-10** og **figur 6-11** for å sammenligne resultatene. Serumprøven ble fortynnet fem ganger før applisering på CMC og DMPK-C kort da et tidligere forsøk estimerte en konsentrasjon utenfor konsentrasjonsområdet for kalibreringsstandardene. Resultatet er presentert i **tabell 6-10**.

Tabell 6-10: Estimerte konsentrasjoner av humant koriongonadotropin i en serumprøve fra pasient diagnostisert med testikkelkreft, avsatt på karboksymetylcellulose og DMPK-C kort (n=3).

	Estimert konsentrasjon (IE/mL)	Relativt standardavvik (%)
Karboksymetylcellulose	5,5	11,8
DMPK-C kort	5,4	12,5

Tilnærmet like estimerte konsentrasjoner for de ulike materialene og god repeterbarhet er lovende resultater. Dette kan tyde på at det vannløselige materialet CMC er et minst like godt egnet materiale for DSS som DMPK-C kort ved analyse av hCG. Resultatene åpner opp muligheter for videre forskning på CMC som prøvetakingsmateriale for andre biologiske matrikser.

7 Konklusjon

I dette arbeidet ble metoder videreutviklet og optimalisert for bestemmelse av insulin og hCG. Vannløselig materiale ble for første gang benyttet som medium for *dried matrix spots* med fullblod, serum, plasma og urin i analyse av hCG. Målet med oppgaven var å komme ned til referansenivåer av proteinene med DMS som prøvetakingsteknikk.

En spesifikk LC-MS/MS-metode for kvantifisering av insulin basert på B-kjeden ble videreutviklet. Det ble estimert en fire ganger lavere LOD for insulin med reduksjon av proteinet som en del av metoden. Dette er resultater som danner et godt grunnlag for videre arbeid med redusert insulin og kvantitativ analyse av proteinet basert på B-kjede.

En LC-MS/MS-metode for deteksjon og kvantifisering av hCG ble overført til et nanosystem og optimalisert. Metoden ble videre benyttet på ulike biologiske matrikser, evaluert i serum og testet på en reell pasientprøve. Kravene i EMAs retningslinjer til presisjon ble ikke innfridd for metoden med serum avsatt på CMC. Resultatene fra arbeidet tyder likevel på at det vannløselige materialet er minst like godt egnet som prøvetakingsmateriale for DMS. Ufullstendig eluering av prøve fra kommersielle prøvetakingskort kan bidra til betydelig svekket følsomhet ved LC-MS/MS-analyse av proteiner, spesielt proteiner som forekommer i lave konsentrasjoner. Bruk av CMC genererte lavere eksperimentelle deteksjonsgrenser i alle de testede matriksene.

Fra DBS ble LOD for hCG estimert til 0,1 IE/mL med den opprinnelige LC-MS/MS-metoden på konvensjonelt system [1]. Dette var 20 ganger høyere enn referansenivået hos menn og ikke-gravide kvinner. I dette arbeidet ble det for første gang estimert LOD-verdier innenfor referanseområdet for hCG fra 15 µL biologisk matriks avsatt på CMC. Verdiene ble estimert i serum, urin og fullblod. Overføring til nanosystemet og optimalisering har bidratt til en betydelig forbedring i metodens følsomhet. Dette tyder på at metoden er følsom nok til å detektere endogene konsentrasjoner av hCG i de aktuelle biologiske matriksene på CMC. Resultatene er et godt utgangspunkt for videre arbeid med analyse av hCG fra DMS.

8 Videre arbeid

I videre arbeid med insulin bør den utviklede LC-MS/MS-metoden for B-kjede testes og det bør undersøkes om forbedret sensitivitet oppnås. Overføring av metoden til et mer følsomt nano-LC-MS/MS-system kan bidra til ytterligere forbedring i sensitivitet. I følge **likning 3-1** for fortynningsfaktor av analytt skal en overføring til nanosystemet i teorien bidra til et 177,8 ganger mer konsentrert signal, forutsatt at kun kolonnens indre diameter endres i likningen. Dette indikerer effekten på metodens følsomhet ved å benytte et nano-LC-MS/MS-system fremfor et konvensjonelt system. Metoden kan videre undersøkes for DMS med aktuelle biologiske matrikser.

Videre arbeid med hCG fra DMS bør innebære å teste metodens egnethet til å detektere referansenivåer av hCG i serum, fullblod og urin på vannløselig materiale. Flere biologiske matrikser kan undersøkes. Store variasjoner og noe høyere estimerte LOD-verdier for plasma i dette arbeidet bør undersøkes nærmere, da det muligens kan være tilsatt antikoagulasjonsmiddel som forårsaker dette. Det samme problemet er tidligere sett for fullblod tappet i heparinrør [83].

Litteraturliste

1. Rosting, C.;Gjelstad, A.;Halvorsen, T.G., *Water-Soluble Dried Blood Spot in Protein Analysis: A Proof-of-Concept Study*. Analytical chemistry, 2015. **87**(15): p. 7918-7924.
2. Chambers, A.;Percy, A.;Hardie, D.;Borchers, C., *Comparison of Proteins in Whole Blood and Dried Blood Spot Samples by LC/MS/MS*. The official journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2013. **24**(9): p. 1338-1345.
3. Demirev, P.A., *Dried Blood Spots: Analysis and Applications*. Analytical Chemistry 2013. **85**(2): p. 779-789.
4. Delaby, C.;Gabelle, A.;Meynier, P.;Loubiere, V.;Vialaret, J.;Tiers, L.;Ducos, J.;Hirtz, C.;Lehmann, S., *Development and validation of dried matrix spot sampling for the quantitative determination of amyloid [beta] peptides in cerebrospinal fluid*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2014. **52**(5): p. 649-655.
5. McDade, T.;Williams, S.;Snodgrass, J., *What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research*. Demography, 2007. **44**(4): p. 899-925.
6. Burnett, J., *Dried blood spot sampling: practical considerations and recommendation for use with preclinical studies*. Bioanalysis, 2011. **3**(10): p. 1099-1107.
7. Li, W.;Zhang, J.;Tse, F.L.S., *Handbook of LC-MS Bioanalysis : Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*. 2013, Hoboken: Wiley. 706.
8. Parker, S.P.;Cubitt, W.D., *The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies*. Journal of Clinical Pathology, 1999. **52**(9): p. 633-639.
9. Zheng, N.;Zeng, J.;Ji, Q.C.;Angeles, A.;Aubry, A.-F.;Basdeo, S.;Buzescu, A.;Landry, I.S.;Jariwala, N.;Turley, W.;Burrell, R.;Arnold, M.E., *Bioanalysis of dried saliva spot (DSS) samples using detergent-assisted sample extraction with UHPLC-MS/MS detection*. Analytica Chimica Acta, 2016. **934**: p. 170-179.
10. Lehmann, S.;Delaby, C.;Vialaret, J.;Ducos, J.;Hirtz, C., *Current and future use of "dried blood spot" analyses in clinical chemistry*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2013. **51**(10): p. 1897-1909.
11. Eibak, L.E.E.;Hegge, A.B.;Rasmussen, K.E.;Pedersen-Bjergaard, S.;Gjelstad, A., *Alginate and chitosan foam combined with electromembrane extraction for dried blood spot analysis*. Analytical chemistry, 2012. **84**(20): p. 8783-8789.

12. Rosting, C.;Sæ, C.Ø.;Gjelstad, A.;Halvorsen, T.G., *Evaluation of water-soluble DBS for small proteins: A conceptual study using insulin as a model analyte*. *Bioanalysis*, 2016. **8**(10): p. 1051-1065.
13. Lund, H.;Torsetnes, S.B.;Reubsæet, L.;Halvorsen, T.G.;Paus, E.;Nustad, K., *Exploring the complementary selectivity of immunocapture and MS detection for the differentiation between hCG isoforms in clinically relevant samples*. *Journal of Proteome Research*, 2009. **8**(11): p. 5241-5252.
14. Hansen, S.H.;Pedersen-Bjergaard, S., *Bioanalysis of Pharmaceuticals : Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*. 2015, Hoboken: Wiley. 318.
15. Hirtz, C.;Lehmann, S., *What is the potential of dried matrix spot sampling for cerebrospinal fluid analysis?* *Bioanalysis*, 2015. **7**(22): p. 2849-2851.
16. Westin, A.A.;Larsen, R.-A.;Espnes, K.A.;Spigset, O., *Legemiddelanalyser i Norge*. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 2012. **132**(21): p. 2382-2387.
17. Pedersen-Bjergaard, S.;Rasmussen, K.E., *Legemiddelanalyse*. 2 ed. 2010, Bergen: Fagbokforlaget. 505.
18. Hercules. *AQUALON © Sodium Carboxymethylcellulose: Physical and Chemical Properties* [hentet 2016-12-13]; Tilgjengelig fra: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=551d8944f15bc717108b467d&assetKey=AS%3A273748727402502%401442278190421>.
19. Waring, M.J.;Parsons, D., *Physico-chemical characterisation of carboxymethylated spun cellulose fibres*. *Biomaterials*, 2001. **22**(9): p. 903-912.
20. Hu, Z.;Hood, L.;Tian, Q.;Dunn, M.J., *Quantitative proteomic approaches for biomarker discovery*. *Proteomics: clinical applications* 2007. **1**(9): p. 1036-1041.
21. Chang, R.;Goldsby, K.A., *General chemistry : the essential concepts*. 7 ed. 2014, New York: McGraw-Hill. 864.
22. Gromiha, M.M., *Protein Bioinformatics: From sequence to Function*. 2011, Burlington Elsevier Science. 349.
23. Petsko, G.A.;Ringe, D., *Protein structure and function*. *Primers in biology*. 2009, Oxford: Oxford University Press. 195.
24. Khan Academy. *Orders of protein structure* [hentet 2017-05-11]; Tilgjengelig fra: <https://www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure>.

25. Chen, Z.;Caulfield, M.P.;McPhaul, M.J.;Reitz, R.E.;Taylor, S.W.;Clarke, N.J., *Quantitative insulin analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a high-throughput clinical laboratory*. *Clinical chemistry*, 2013. **59**(9): p. 1349-1356.
26. Youngren, J., *Regulation of insulin receptor function*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007. **64**(7): p. 873-891.
27. Antidoping Norge, Dopinglisten. [hentet 2017-01-25]; Tilgjengelig fra: <http://www.antidoping.no/regler/dopinglisten/dopinggruppe-s4/>.
28. Litwack, G., *Vitamins and Hormones : Insulin and IGFs*. *Vitamins and Hormones*. 2009, Burlington: Elsevier Science. 766.
29. Baheri, M.;Dayer, M.R., *Temperature and pH Effects on Insulin Structure: A Molecular Dynamic Approach*. *Jentashapir Journal of Health Research*, 2016. **7**(4): p. 1-6.
30. Crasto, W.;Jarvis, J.;Davies, M.J., *Handbook of Insulin Therapies*. 2016, Cham: Springer International Publishing. 219.
31. Lisi, G.P.;Png, C.Y.M.;Wilcox, D.E., *Thermodynamic contributions to the stability of the insulin hexamer*. *Biochemistry*, 2014. **53**(22): p. 3576-3584.
32. Kastin, A., *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2 ed. 2013, Burlington: Elsevier Science. 2033.
33. Rang, H.P.;Dale, M.M., *Rang and Dale's pharmacology*. 7 ed. *Pharmacology*. 2012, Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier. 777.
34. Wu, F.;Chabenne, J.R.;Gelfanov, V.M.;Mayer, J.P.;Dimarchi, R.D., *Three-chain insulin analogs demonstrate the importance of insulin secondary structure to bioactivity*. *Journal of Peptide Science*, 2015. **21**(3): p. 223-230.
35. Tanbo, T., *Svangerskapshormon viktig for morkaken*. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening*, 2014. **134**(10): p. 1036.
36. Nand, K.N.;Gupta, J.C.;Panda, A.K.;Jain, S.K., *Development of a recombinant hCG-specific single chain immunotoxin cytotoxic to hCG expressing cancer cells*. *Protein Expression and Purification*, 2015. **106**: p. 10-17.
37. Cole, L., *The hCG assay or pregnancy test*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2012. **50**(4): p. 617-630.
38. Norsk Legemiddelhandbok. [hentet 2016-01-16]; Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/s%C3%B8ker/+%2BOKsygen/158796>.

39. Barceloux, D.G., *Human Chorionic Gonadotropin*, in *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*. 2012, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA. p. 326-333.
40. Wilson, K.;Walker, J.M., *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 6 ed. 2005, Cambridge: Cambridge University Press. 783.
41. Cole, L.;Butler, S.A.;Cole, L.A., *Human Chorionic Gonadotropin (hGC)*. 2010, Burlington: Elsevier Science. 405.
42. Stenman, U.-H.;Tiitinen, A.;Alfthan, H.;Valmu, L., *The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG*. *Human Reproduction Update*, 2006. **12**(6): p. 769-784.
43. Cole, L.A., *hCG structure: A logical perspective*. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2012. **1**(4): p. 287-292.
44. Nataraja, S.G.;Yu, H.N.;Palmer, S.S., *Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors*. *Frontiers in Endocrinology*, 2015. **6**: p. 1-15.
45. Wu, H.;Lustbader, J.W.;Liu, Y.;Canfield, R.E.;Hendrickson, W.A., *Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein*. *Structure*, 1994. **2**(6): p. 545-558.
46. de Medeiros, S.F.;Norman, R.J., *Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights*. *Human Reproduction Update*, 2009. **15**(1): p. 69-95.
47. Lund, H.;Løvsletten, K.;Paus, E.;Halvorsen, T.G.;Reubsæet, L., *Immuno-MS based targeted proteomics: highly specific, sensitive, and reproducible human chorionic gonadotropin determination for clinical diagnostics and doping analysis*. *Analytical chemistry*, 2012. **84**(18): p. 7926-7932.
48. Gjelstad, A.;Pedersen-Bjergaard, S., *Challenges and new directions in analytical sample preparation*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. **406**(2): p. 375-376.
49. Yates, J.R.;Ruse, C.I.;Nakorchevsky, A., *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2009. **11**: p. 49-79.
50. Hildonen, S.;Halvorsen, T.G.;Reubsæet, L., *Why less is more when generating tryptic peptides in bottom-up proteomics*. *PROTEOMICS*, 2014. **14**(17-18): p. 2031-2041.

51. Reubsæet, L.;Halvorsen, T., *Determination of Very Low-Abundance Diagnostic Proteins in Serum Using Immuno-Capture LC-MS-MS*. LCGC Europe 2016. **29**(7): p. 352-361.
52. Letzel, T.;Smith, R.M.;Fukamizo, T., *Protein and Peptide Analysis by LC-MS : Experimental Strategies*. RSC Chromatography Monographs. Vol. 15. 2011, Cambridge: Royal Society of Chemistry. 195.
53. Liebler, D.C., *Introduction to proteomics : tools for the new biology*. 2002, Totowa, N.J: Humana Press. 198.
54. Vandermarliere, E.;Mueller, M.;Martens, L., *Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics*. Mass Spectrometry Reviews, 2013. **32**: p. 453-465.
55. Płotka-Wasyłka, J.;Szczepańska, N.;de La Guardia, M.;Namieśnik, J., *Miniaturized solid-phase extraction techniques*. Trends in Analytical Chemistry, 2015. **73**: p. 19-38.
56. Mishra, N.C., *Introduction to proteomics : principles and applications*. Wiley series in methods of biochemical analysis. 2010, Hoboken, N.J: Wiley. 180.
57. Lundanes, E.;Reubsæet, L.;Greibrokk, T., *Chromatography : basic principles, sample preparations and related methods*. 2014, Weinheim: Wiley-VCH. 223.
58. Wilson, Sr.;Vehus, T.;Berg, H.;Lundanes, E., *Nano-LC in proteomics: recent advances and approaches*. Bioanalysis, 2015. **7**(14): p. 1799-1815.
59. Shen, Y.;Smith, R., *Advanced nanoscale separations and mass spectrometry for sensitive high-throughput proteomics*. Expert Review of Proteomics, 2005. **2**(3): p. 431-47.
60. Gross, J.r.H., *Mass Spectrometry : A Textbook*. 2 ed. 2011, Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 753.
61. Wagner, M.;Tonoli, D.;Varesio, E.;Hopfgartner, G., *The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots*. Mass Spectrometry Reviews, 2016. **35**(3): p. 361-438.
62. Domon, B.;Aebersold, R., *Mass spectrometry and protein analysis*. Science 2006. **312**(5771): p. 212-217.
63. Wilm, M., *Principles of electrospray ionization*. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2011. **10**(7): p. M111.009407-(1-8).
64. Noga, M.;Sucharski, F.;Suder, P.;Silberring, J.;Greibrokk, T., *A practical guide to nano-LC troubleshooting*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(14): p. 2179-2189.

65. Smith, R.D.;Tang, K.;Shen, Y., *Ultra-sensitive and quantitative characterization of proteomes*. Molecular BioSystems, 2006. **2**(5): p. 221-230.
66. University of Bristol. *Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)*. [hentet 2017-02-26]; Tilgjengelig fra: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>.
67. Rauh, M., *LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry*. Journal of Chromatography B, 2012. **883-884**: p. 59-67.
68. U.S. National Library of Medicine. *The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science*. [hentet 2017-02-26]; Tilgjengelig fra: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3116002_kjlm-31-61-g003&req=4.
69. Loziuk, P.L.;Wang, J.;Li, Q.;Sederoff, R.R.;Chiang, V.L.;Muddiman, D.C., *Understanding the role of proteolytic digestion on discovery and targeted proteomic measurements using liquid chromatography tandem mass spectrometry and design of experiments*. Journal of proteome research, 2013. **12**(12): p. 5820-5829.
70. Yates Iii, J.R., *Mass spectrometry: from genomics to proteomics*. Trends in Genetics, 2000. **16**(1): p. 5-8.
71. Thongboonkerd, V., *Proteomics of Human Bodyfluids : Principles, Methods, and Applications*. 2007, Totowa, N.J Humana Press 545.
72. Riggs, L.;Sioma, C.;Regnier, F.E., *Automated signature peptide approach for proteomics*. Journal of Chromatography A, 2001. **924**(1): p. 359-368.
73. Huang, T.;Zhang, X.;Song, D.;Wu, L.;Li, X.;Yang, Y.;Quan, C.;Li, H., *The quantification of human chorionic gonadotropin by two isotope dilution mass spectrometry methods*. Analytical Methods, 2014. **6**(21): p. 8690-8697.
74. Lund, H.;Paus, E.;Berger, P.;Stenman, U.-H.;Torcellini, T.;Halvorsen, T.;Reubsæet, L., *Epitope analysis and detection of human chorionic gonadotropin (hCG) variants by monoclonal antibodies and mass spectrometry*. Tumor Biology 2014. **35**(2): p. 1013-1022.
75. Ho, E.N.M.;Wan, T.S.M.;Wong, A.S.Y.;Lam, K.K.H.;Stewart, B.D., *Doping control analysis of insulin and its analogues in equine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(8): p. 1139-1146.
76. Korfmacher, W.A., *Mass spectrometry for drug discovery and drug development*. Wiley series on mass spectrometry. 2013, Hoboken, N.J: Wiley. 461.

-
77. Svendsen, K.O.;Larsen, H.R.;Pedersen, S.A.;Brenna, I.;Lundanes, E.;Wilson, S.R., *Automatic filtration and filter flush for robust online solid-phase extraction liquid chromatography*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(21): p. 3020-3022.
78. Maes, K.;Smolders, I.;Michotte, Y.;Van Eeckhaut, A., *Strategies to reduce aspecific adsorption of peptides and proteins in liquid chromatography–mass spectrometry based bioanalyses: An overview*. Journal of Chromatography A, 2014. **1358**: p. 1-13.
79. Blackburn, M., *Advances in the quantitation of therapeutic insulin analogues by LC-MS/MS*. Bioanalysis, 2013. **5**(23): p. 2933-2946.
80. Chambers, E.E.;Legido-Quigley, C.;Smith, N.;Fountain, K.J., *Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge*. Bioanalysis, 2013. **5**(1): p. 65-81.
81. European Medicines Agency - Committee for Medicinal Products for human use (CHPM). *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011 [hentet 2017-04-10]; Tilgjengelig fra:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
82. Kollipara, S.;Bende, G.;Agarwal, N.;Varshney, B.;Paliwal, J., *International Guidelines for Bioanalytical Method Validation: A Comparison and Discussion on Current Scenario*. Chromatographia 2011. **73**(3): p. 201-217.
83. Sæ, C.Ø., *Dried blood spots (DBS) i LC-MS-basert proteinanalyse: Vannløselig DBS i deteksjon og kvantifisering av små proteiner*. 2015, Universitetet i Oslo: Oslo.