

Ali Marouf

Analyse av eksogene og endogene opioide peptider i dry blood spots ved bruk av HPLC-MS

Masteroppgave i farmasi

Veileder: Dr. Michal Rachel Suissa, Dr Per Ola Rønning

Juni 2019

Analyse av eksogene og endogene opioide peptider i dry blood spots ved bruk av HPLC-MS

Masteroppgave i farmasi 2019

OsloMet – Storbyuniversitetet, Farmasiutdanning (HF/TKD)

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, Fakultet for medisin
og helsevitenskap

Ali Marouf

Veiledere: Dr. Michal Rachel Suissa, Dr. Per Ola Rønning, Juni 2019

OSLOMET



NTNU

Norges teknisk-
naturvitenskapelige
universitet

Sammendrag

Opioide peptider forekommer både som eksogene- og som endogene peptider. Endogene peptider er kroppens egne peptider som blant annet fungerer som eget kontrollsystem på smerter, mens eksogene peptider hovedsakelig kommer utenfra i form av matvarer som f.eks. melk/meieriprodukter og hvete. Eksogene peptider har vist seg å kunne kompleksere seg til target makromolekylær slik som endogene peptider gjør.

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en analytisk metode basert på LC-MS for utvalgte eksogene og endogene opioide peptider i plasma og fullblod. Peptidblanding bestående av 11 peptider ble analysert, hvor noen bestemte peptider ble videre analysert basert på deres fysikalsk og kjemiske egenskaper og deres opphav. Eksogene peptider som kasomorfiner (β -kasomorfin-3, β -kasomorfin-4 amid og β -kasomorfin-7), gluteneksorfiner (gliadorfin-7 og gluteneksorfin-C) og en endogen peptid (met-enkefalin-arg-phe) ble dermed valgt for å studere videre.

Målet i denne oppgaven var delt i 2 deler:

1. Utvikle og optimalisere en eksisterende LC-MS metoden slik at vi kunne detektere lavest mulig konsentrasjon av peptider. Lave deteksjongrenser er en forutsetning for å kunne studere peptider i "dried blood spots" (DBS).
2. Avsette blod med tilsatt peptidblanding som DBS på kommersielle prøvekort (Whatman 903TM Specimen Collection Paper) og se om vi kunne ekstrahere peptider og detektere dem ved bruk av LC-MS. Videre skulle det studeres i hvilken grad peptidene stabiliseres ved adsorpsjon på prøvekortet, og om det eventuelt var behov for tilsetning av peptidasehemmere som sitronsyre. Tidligere metoder for ekstraksjon av peptider som standardproteinfelling og proteinfelling ved brønnplater ble bruk som referanser for å sammenlikne ekstaksjonsutbytte og ekstrajsonsprofil i forhold til dry blood spot metode.

Under metodeutvikling ble det utviklet og optimalisert metoder for både prøveopparbeidelse, HPLC og «Time-of Flight»-massespektrometri.

Under HPLC metodeutviklingen ble 2 typer separasjonskolonner testet ut for å se hvilke kolonner som ga best separasjon og deteksjon av analyttene. C₈-kolonnen viste seg å gi best separasjon og deteksjon av analyttene. Mobilfase som ble kjørt i kolonnene var ultra rent vann og acetonitril der begge var tilsatt 0,1% maursyre, hvor gradientluering ble benyttet

Under MS-metodeutvikling ble 4 parametere ved elektroprayionisasjon testet for optimalisering: Kappegasstemperatur ("Sheat gas"), kappegasshastighet, nebulizer trykk og kapillærespenning. Målet var å overføre så mye av analyttene over til ionisert form for å få best deteksjon ved MS. En kombinasjon av høy kappegasstemperatur, høy kappegass hastighet, lav nebulizer trykk og høy kapillærespenning ga best deteksjon av peptider.

Analyseinstrumentets deteksjonsgrense ble beregnet for rene standarder hvor det ble injisert 125 ng/ml av peptidblanding med 11 peptider. Både statistiske beregninger og signal-støy-forhold målinger ble brukt som deteksjonskriterier for å estimere deteksjonsgrensen (LOD) til 5 utvalgte peptider. Ved å

bruke statistiske bergninger basert på ensidig-t-test for resultatene fra 10 repikatinjeksjoner, ble instrumentets deteksjonsgrene (IDL) estimert. Deteksjonsgrensen for BCM-3 ble 4,3 ng/ml, BCM-4 6,3 ng/ml, BCM-7 6,1 ng/ml, GLU-C 3,5 ng/ml og GLIA-7 2,2 ng/ml. Det ble deretter laget rene standarder for hvert enkelt peptid i IDL konsentrasjonene som ble beregnet for å verifisere de beregnede deteksjonsgrensene. Alle 5 peptider ble detekter ved instrumentetsdeteksjonsgrense-konsentrasjonene. Nye IDL ble til sammenlikning beregnet ved å bruke signal-støy-forhold (SNR) som deteksjonskriterie. Dette viste seg at vi fikk enda lavere LOD når vi bruke SNR som deteksjonskriterie. Deteksjonsgrensen for BCM-3 ble dermed 89,6 pg/ml, BCM-4 254,4 pg/ml, BCM-7 150,9 pg/ml, GLU-C 214,3 pg/ml og GLIA-7 206,3 pg/ml.

I denne oppgaven ble det utprøvd tre typer prøveopparbeidelsesmetoder: To av prøveopparbeidelsesmetodene var basert på proteinfelling ved tilsetning av denatureringsreagenser til blodprøvene - enten i reagensrør eller ved bruk av RPPT-brønnplater. Til disse forsøkene er det benyttet peptidblandinger i plasma. Det viste seg at proteinfelling i RPPT-brønnplater ved å bruke fellingsreagens ACN med 0,1% maursyre ga best gjenfinningsgrad. En peptidblanding som opprinnelig inneholdt 50 ng/ml før ekstraksjon viste å gi gjenfinningsgrad på over 70% for de fleste peptider.

Den tredje metoden var basert på DBS noe som var nytt i denne oppgaven. Her ble peptidblanding løst i henholdsvis vann med 0,1 % maursyre (rene standarder), plasma og fullblod. Deretter ble prøvematerialet spotet på DBS og ekstrahert med MeOH med 0,1% maursyre.

Analyse av ekstrakter fra DBS ble gjort ved å sammenligne rene standarder med peptidblanding i plasma og fullblod hvor begge var tilsatt sitronsyre som peptidasehemmer. Det ble også testet peptidblanding i fullblod uten sitronsyre. Det viste seg at peptidblanding i plasma og fullblod med og uten sitronsyre hadde gjennifningsgrad over 100% for de fleste peptider. Det ble også observert at gjennifningsgraden var høyere for peptidblanding i plasma enn for fullblod. Det ble også sett at sitronsyren ikke hadde stor betydning som peptidasehemmer ved bruk av DBS. Det var variasjoner mellom de samme DBS prøvene som kom av spotte-teknikk og puncheteknikk. Et grovt estimat av metodens dekteksjonsgrense (MDL) ble beregnet for peptidblandinger i fullblod med og uten sitronsyre ved hjelp av SNR. Det ble grovt estimert at MDL for peptider i fullblod med sitronsyre for BCM-3 ble 3,32 ng/ml, BCM-4A 4,66 ng/ml, BCM-7 10,32 ng/ml, Met-enkefalin-arg-phe 28,57 ng/ml og for GLIA-7 42,51 ng/ml. For peptidblanding i fullblod uten sitronsyre ble verdiene for BCM-3 3,42 ng/ml, BCM-4A 4,84 ng/ml, BCM-7 9,89 ng/ml, Met-enkefalin-arg-phe 32,69 ng/ml og GLIA-7 44,15 ng/ml. Realtivutbytte ble beregnet for peptid i plasma for RPPT-brønnplate sammenliknet med DBS. Amid analogene BCM-4A og BCM-5A viste å gi en større reaktivutbytte i DBS.

For å kunne si om metoden er egnet til klinisk bruk er det viktig å ta hensyn til hva som er normale og patologiske verdier hos mennesker. I vitenskaplige studier ble det funnet verdier for patologiske konsentrasjoner i plasma for BCM-5 ca. 15000 ng/ml og BCM-7 ca. 4,7 ng/ml. Patologiske konsentrasjoner i urin er også blitt sett for BCM-7 hvor konsentrasjonen er ca. 75 pg/ml. Det ble ikke funnet noe litteratur på patologiske nivåer av de andre peptidene i denne oppgaven. Resultatinnhenting fra ulike databaser for å finne mer informasjon om plasmakonsentrasjoner av flere av disse peptidene er derfor av stor betydning for å kunne vurdere metodens egnethet ved klinisk bruk.

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført våren 2019 i samarbeid mellom OsloMet – storbyuniversitetet med farmasiutdanningen (Fakultet for helsefag), kjemiingeniørutdanningen (Fakultet for teknologi, kunst og design), forskningsgruppen DIAMED (Diagnostisk teknologi og bedre medisinerer) og Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (Fakultet for medisin og helsevitenskap).

Jeg vil rette en stor takk til mine to veiledere, Dr. Michal Rachel Suissa og Dr. Per Ola Rønning for alle veiledningene og hjelpen jeg har fått. Jeg vil takke min labpartner og medstudent Kavitha Anthonypillai som var støttende og behjelpelig under denne oppgaven. Jeg vil også takke Ingrid Gigstad for praktisk hjelp på laboratoriet. Til sist vil jeg takke moren og faren min som har støttet meg gjennom hele denne perioden. Denne oppgaven hadde ikke vært mulig uten dere.

Innhold

1. Innledning	11
2. Teori	12
2.1 Konformasjonsanalyse	12
2.2 Endogene opioide peptider	15
2.2.1 Endorfiner	15
2.2.2 Enkefalin	16
2.2.3 Dynorfiner	16
2.2.3 Endomorfiner	16
2.4 Opioidreseptorer	17
2.4.1 μ -reseptorer	17
2.4.2 κ -reseptorer	17
2.4.3 δ -reseptorer	18
2.4.4 Transduksjonsmekanismen til opioide peptider:	18
2.5 Fordeling av opioidpeptider hos mennesker	20
2.5.1 Sentralnervesystemet (CNS)	20
2.5.2 Perifert vev	21
2.5.3 Plasma	22
2.5.4 Cerebrospinalvæske (CSF)	22
2.6 Eksogene opioide peptider	23
2.6.3 Farmakofor	23
2.6.2 Kasomorfiner	24
2.6.3 Gluteneksorfiner: Gliadorfin	25
2.6.4 Absorpsjon av peptider fra mage og tarm til Blod-hjerne-barriere	26
2.7 Sykdommer	29
2.7.1 Schizofreni	29
2.7.2 Autisme	30
2.7.3 Krybbedød (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS)	32
2.7.4 Cøliaki (SD)	32
2.8 Dried blood spots (DBS)	33
3. Metode	35
3.1 Prøveopparbeidelse	36
3.1.1 Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV)	37
3.1.2 Standard proteinfelling	37
3.1.3 Resprep PPT ³ 96-brønnplater (RESTEK)	38
3.1.4 Prøveopparbeidelse av dry blood spots (DBS)	38
3.2 Væskekromatografi (HPLC)	38

3.2.1 Stasjonær faser	39
3.2.2 Faktorer som kan påvirke separasjon i HPLC	39
3.2.3 Isokratisk og gradient eluering	41
3.3 Massespektrometri (MS)	42
3.3.1 Oppløsningsevne	42
3.3.2 Massenøyaktighet	43
3.4 Elektrosprayionisering (ESI)	43
3.5 Masseanalytatorer	45
3.6 Detektor	47
3.7 Eksperimentell fremgangsmåte	48
3.7.1 Utstysliste:	48
3.7.2 Oppbevaring og lagring	50
3.7.3 Blodprøvetaking	50
3.7.4 Prøveopparbeidelse	50
3.7.5 Metodeutviklingen for HPLC-MS	52
3.7.6 Metodeutvikling og optimalisering av ESI	55
3.7.7 Deteksjonsgrensebestemmelser (Limit of detection LOD)	56
4. Resultat og diskusjon	60
4.1 Mobilfase valg	61
4.2 Kolonne valg	61
4.2 Optimalisering av gradientprogram	63
4.3 MS-metodeutvikling	66
4.3.1 Kappegass temperatur (SGT)	67
4.3.2 Kappegass hastighet (SGF)	70
4.3.3 Nebulizer trykk	73
4.3.4 Kapilærespenning (VCap)	75
4.3.5 Sensitivitet før og etter optimalisering av MS-instrumentet	77
4.3.6 LOD av peptider ved bruk av statistisk bergning og SNR	80
4.4 Prøveopparbeiding og gjenfinningsgrad	81
4.4.1 Kartlegging av matrikseffekter – bruk av negative kontroller	81
4.4.2 Gjenfinningsgrad ved bruk av standard proteinfelling	83
4.4.3 Gjenfinningsgrad ved bruk av RPPT-brønnplater	84
4.4.5 Gjenfinningsgrad av peptider i fullblod og plasma i DBS	85
4.4.6 Deteksjon av peptider i fullblod med og uten sitronsyre i DBS	87
4.4.7 Sammenlikning av prøveopparbeidelsesmetoder og gjenfinningsgrad	89
5. Konklusjon og videre arbeid	91

Forkortelser/symboler

ALTE	Apparent life-threatening events (Apne-hendelse)
ACN	Acetonitril
AJT	Agilent jetstrøms teknologi
ASD	Autismespekterforstyrrelser
BCM	β-kasomorfin
BHB	Blod-hjerne-barriere
Ca	Kalsium
CA	Sitronsyre
cAMP	Syklisk adenosin monofosfat
CID	Kollisjonsindusert dissosiasjon
CSF	Cerebrospinalvæske
CNS	Sentralnervesystemet
DPPIV	Peptidase-IV
EDTA	Ethylene Diamine-Tetra-acetic Acid
EIC	Extracted ion chromatograms
ESI	Electrospray ionization
FA	Maursyre
FDA	U.S. department of health and human services food and drug administration
GLIA-7	Gliadorfin-7
GLU-C	Gluteneksorfin C
HPLC-MS	HPLC-MS - High pressure liquid chromatography – mass spectrometry
Id	Indre diameter
LOD	Limit of detection (deteksjonsgrense)
LLOQ	Lower limit of quantification (kvantifiseringsgrense)
MeOH	Metanol
MRM	Multireaksjonssøk
NaOH	Natriumhydroksid
Oa-TOF	Orthogonal akse – time of flight
PAG	periaqueduktal gray
POMC	Prepro-opiomelanokortin
Q1	Første kvadrupol

q2	Andre kvadrupol (kollisjonscellen)
Q3	Tredje kvadrupol
RIA	Radioimmun assays
RRA	Radioreseptor assays
RSD	Relativ standardavvik
S/N	Signal-noise (signal-støy forhold)
SIDS	Sudden infant death syndrome (krybbedød)
TIC	Total ion current eller total ion chromatogram
Vcap	Kapillærspenning

1. Innledning

Opioide peptider kan deles inn i to kategorier, endogene opioide peptider og eksogene opioide peptider. Endogene opioide peptider er kroppens egne peptider som blant annet fungerer som kroppens eget kontrollsystem på smerter.[1] De eksogene opioide peptidene er peptider som kommer fra mat, hovedsakelig meieriprodukter og hvete, og kan dannes under fordøyelsen og nedbrytningen av disse matvarene. Eksogene peptider har vist seg å kunne kompleksere seg til opioide reseptorer slik som endogene peptider gjør. [2, 3]

Kasein og gluten er proteiner som kommer fra melk og hvete blir nedbrytt og danner små oligo peptider som β -kasomorfin-7 (BCM-7) og gliadorfin-7 (GLIA-7). BCM-7 er nedbrytningsproduktet av kasein, mens GLIA-7 er nedbrytningsproduktet av gluten. Forhøyede nivåer av gluteneksorfiner og kasomorfiner har blitt assosiert med sykdommer som schizofreni, autisme, krybbedød (SIDS) og asymtomtisk cøliaki (ACD).[3-6] Studier viser til at det kan være en kobling mellom forhøyede konsentrasjoner av eksogene opioide peptidene og disse sykdommene. Mange barn med autisme og de med glutensensitivitet har økt tarmpermeabilitet, noe som kan forklare de høye peptid konsentrasjonene i urin og blod.[3, 7]

Resultater fra studier, hovedsakelig basert på epidemiologiske undersøkelser, kan tyde på at det er en sammenheng mellom forhøyede konsentrasjoner av visse eksogene peptider som f.eks. BCM-5, BCM-7 og GLIA-7, og sykdomsutvikling og forløp for bestemte sykdommer. Disse peptidene er målt i urinprøver og i plasmaprøver. [2, 3, 8, 9]

Patologiske verdier av BCM-5 og BCM-7 har blitt observert i plasma og urin hos mennesker med veldig lave verdier. Det er derfor av stor interesse å finne en effektiv metode der vi kan påvise disse peptidene slik at man kan danne et bilde av i hvilken grad disse peptidene er til stede i kroppen, og om de er i stand til å krysse blod-hjerne-barrieren (BHB).

I denne oppgaven skal vi utvikle og optimalisere en eksisterende LC-MS metode slik at vi kan detektere lavest mulig konsentrasjon av peptider. Målet er å bruke den optimaliserte LC-MS metoden til å detektere peptider i "dry blood spots" (DBS). Vi skal også se nærmere på peptidenes påvirkning av peptidase og om peptidasehemmer som sitronsyre er nødvendig ved bruk av DBS.

2. Teori

Endogene opioide peptider anses å være kroppens egne smertestillende medisin. De er reativ små oligo peptider som har strukturelle fellestrekk som har blitt identifisert i hjernen hos mennesker med agonistisk aktivitet ved opioide reseptorer. Peptidene anses å være endogene opioide peptider med strukturelle likheter til opioidbaserte analgetika. De endogene opioide peptidene har en rekke biologiske funksjoner både som hormoner og nevrotransmittere og de produseres og brytes ned etter kroppens behov. [1]

Eksogene opioide peptider er peptider som er tilført gjennom mat. Disse peptidene dannes under fordøyelsen av matvarer som hvete og meieriprodukter.[3, 4] Kasein og gluten som kommer fra meieriprodukter og hvete kan bli nedbrytt hvor det dannes neuroaktive opioide peptider som kasomorfiner og gluteneksorfiner. Disse peptidene kan i sin tur krysse mage-tarm barrieren og deretter krysse blodhjerne barrieren hvor de kan interagere med target makromolekyler i sentralnervesystemet (CNS) som f.eks. opioid reseptorer. Det har vist seg at eksogene peptider har opioid-liknende effekter som de endogene peptidene. Disse eksogene opioide peptidene er også forbundet med en rekke sykdommer som som f.eks. autisme, schizofreni, krybbedød og cøliaki.[3-6] Peptidenes patologiske konsentrasjoner er veldig lave og det er dermed nødvendig med en optimalt og effektiv analyse metode som kan identifisere disse peptidene i biologiske væsker. Disse peptidene virker primært i CNS, men det har også blitt gjort studier hvor disse peptidene kan være tilstedet i det perifære nervesystemet (PNS).

Vi har ingen mulighet å studere prøver tatt fra selve hjernen, dermed blir fullblod, plasma, serum og urinprøver de mest aktuelle metodene for å finne de eksogene opioide peptider i dag. Studier viser at det har blitt funnet konsentrasjoner i både urinen og plasma. CSF testning hadde vært mest optimalt, men det er ikke så lett. I Norge er det ganske strenge restriksjoner på når CSF kan tappes, blant annet på grunn av fare for mulige bivirkninger (infeksjon, blødning osv.). Selve punksjonen er betydelig mer invasiv enn blodprøvetaking og urinprøve. Til forskning på CSF skal det være en rimelig vitenskapelig gevinst som står i forhold til risikoen og ubehaget ved spinalpunksjon. Vi er imidlertid ikke "der enda", men et mål med peptidforskninger er at man med tiden skal komme til et punkt hvor det også er mulig å inkludere CSF. [10]

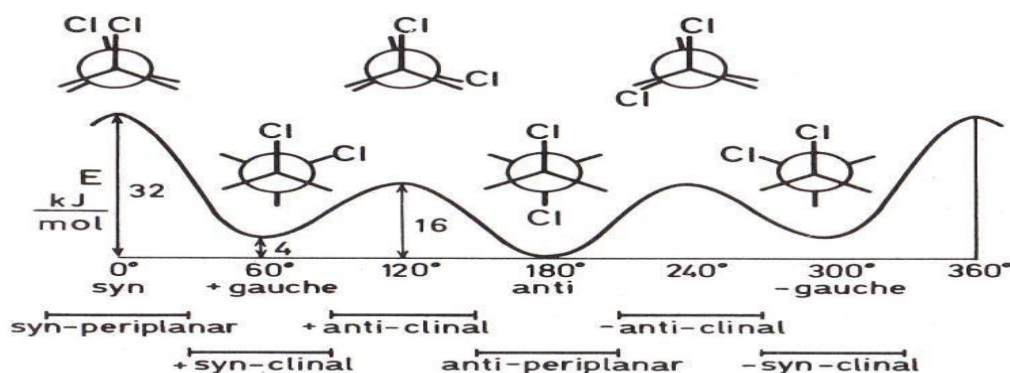
2.1 Konformasjonanalyse

Topologien til et molekyl har en avgjørende betydning for molekylets biologiske effekt. Topologien av molekylet, samt topologien av target makromolekylet avgjør kvaliteten av komplekset som disse to danner seg i mellom. Den biaktive konformasjonen til molekylet behøver ikke å være den mest stabile konformasjon, slik som er tilfelle eksempelvis i acetylkolin. Konformasjoner i et molekyl oppstår som et resultat av fri rotasjon rundt enkeltbindinger, der hver konformasjon gir opphav til en spesifikk topologi, eller ved nitrogen og eller ring inversjoner. Alt i alt kan molekyler eksistere i en svært kompleks termodynamisk likevekt i det fysiologiske miljøet. I tillegg til at det kan oppstå likevekter mellom nøytrale former og ladete former, dersom molekylene inneholder grupper slik som amin- og karboksylgrupper som er ladet ved fysiologiske pH. Antall mulige konformasjoner for et molekyl er avhengig av hvilke bindinger den har. Generelt kan det forventes 3 ulike konformasjoner rundt hver SP^3 – SP^3 binding (g^+ , *anti*, g^-).[11]

To konformasjoner kan oppstå som et resultat av en SP^3 , nitrogen og 2 som et resultat av en sykloheksan ring. Sykloheksaner vil være i likevekt mellom to konformasjoner som de interkonverterer seg i mellom via ringinversjon. Det skjer ved at alle bindinger vris delvis samme vei. Resultatet av en ringinversjon, er at alle substituentene som var i ekvatorial posisjon flyttes til aksial posisjon og motsatt.[11]

Som oftest vil substituentene som er større enn hydrogen være mest stabil i ekvatorial posisjon, for å unngå frastøtninger i aksial posisjon på begge sidene av ringen. Med andre ord vil det si at i ekvatorial posisjon så unngås frastøttende interaksjoner mellom substituentene, det kan også forklares siden delta H for ekvatorial er lavere enn for aksial i de fleste tilfeller.[11]

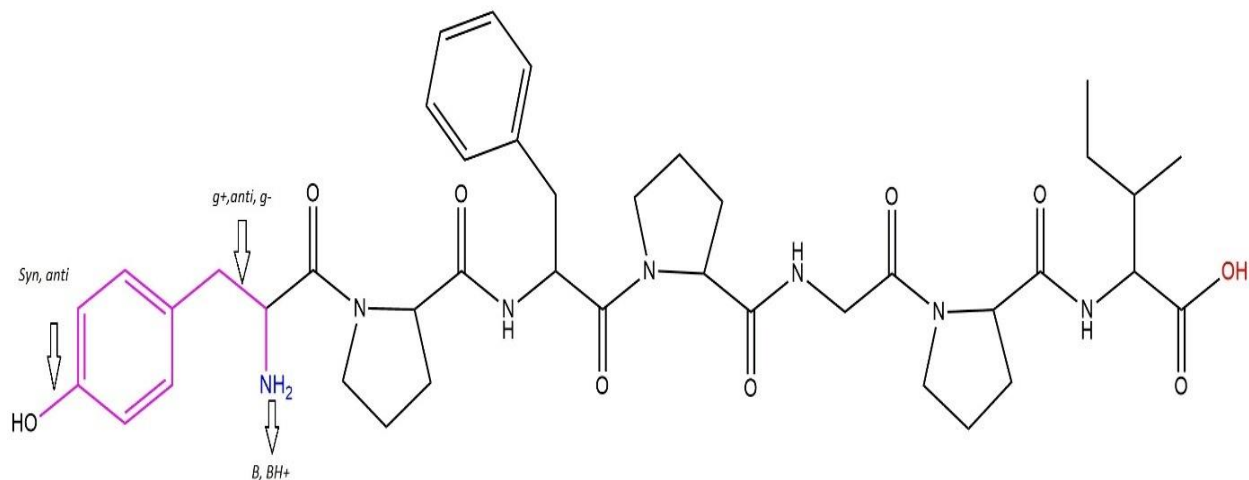
Hvis vi bruker etan som et eksempel så kan man si at hver sigma binding kan føre til 3 like stabile konformasjoner *gauche*⁺ (*g*⁺), *anti* og *gauche*⁻ (*g*⁻) (se figur 1). Men hvis vi endrer et hydrogen gruppe med en større gruppe som f.eks. metyl eller klor, da vil *anti* være den mest stabile konformasjonen, mens *g*⁺ og *g*⁻ vil være moderat stabile. Videre hvis molekylet inneholder et SP^3 hybridisert nitrogen, kan den invertere slik at de to ledige elektronene får 2 mulige konformasjoner.[11]



Figur 1: Viser mulige stabile konformasjoner og deres overgangstilstander rundt en SP^3 - SP^3 C-binding. Her brukes 1,2-dikloretan som et eksempel. I dette tilfelle ser man at *g*⁺, *g*⁻ er identiske mens *anti* konformasjonen har lavere energi og er den mest stabile konformasjonen.[12]

Peptider har en svært kompleks konformasjonsatferd siden de har mange bindinger som kan rotere helt eller delvis og dermed gi opphav for en kompleks termodynamisk likevekt. Konformasjonsstudier av peptider er ikke en del av denne oppgaven og derfor vil dette ikke bli omhandlet videre annet enn at dette komplekssets termodynamiske likevekt må tas i betraktning når det gjelder molekylene interaksjoner med omvendt fase kolonnene som brukes til HPLC-MS i denne oppgaven. Helt generelt er det klart at ulike konformasjoner vil ha ulike topologier og derfor kan de ha ulike affinitet til C_8 / C_{18} grenene i kolonnene som ble brukt i denne oppgaven. Videre kan løselighet og interaksjon med løsningsmiddel-molekylene ha betydning for separasjon av peptidene og bredden av toppene.

Felles for alle peptidene i denne oppgaven er at de har en tyrosin-gruppe. (Figur 2) viser tyrosin-gruppen i BCM-7 som eksempel. Fenolgruppen er nøytral ved fysiologisk pH, mens den alifatiske aminogruppen er ladet.



Figur 2: Viser konformasjonen i tyrosindelen av BCM-7. En relativt svært lite peptid kan ha mange konformasjoner, men siden den består av 3 femringer i skjeletet som gjør molekylet mye mer rigid, er antall konformasjoner redusert ift en tilsvarende peptid uten de femringene.

Som en demonstrasjon så gir tyrosin gruppen i peptidet mulighet til 6 konformasjoner i nøytral form og tilsvarende 6 i ladet form: OH-gruppen på benzen-ringen kan være enten *anti* eller *syn*, og C-C som er SP³-SP³ binding kan være *g*⁺, *anti* eller *g*⁻. (Tabell 1) gir en oversikt over hvilke konformasjoner tyrosin kan ha. Kort sagt kan man si at jo flere aminosyrer et peptid har, desto mer kompleks konformasjon har peptidet. Man ser også at BCM-7 har 3 prolin grupper, dette gjør molekylet mer rigid og gir mulighet for flere konformasjoner, i motsetning til hvis molekylet hadde vært uten femringer.

Tabell 1: Konformasjoner av Tyr kan gi opphav til 6 mulige konformasjoner i nøytral form og 6 i ladet form.

B:	HB⁺
<i>g</i> ⁺ , <i>anti</i>	<i>g</i> ⁺ , <i>anti</i>
<i>g</i> ⁺ , <i>syn</i>	<i>g</i> ⁺ , <i>syn</i>
<i>g</i> ⁻ , <i>anti</i>	<i>g</i> ⁻ , <i>anti</i>
<i>g</i> ⁻ , <i>syn</i>	<i>g</i> ⁻ , <i>syn</i>
<i>anti</i> , <i>anti</i>	<i>anti</i> , <i>anti</i>
<i>anti</i> , <i>syn</i>	<i>anti</i> , <i>syn</i>

2.2 Endogene opioide peptider

Det endogene opioid-systemet inkluderer et stort antall reseptorer med et stort antall opioidpeptider som er ligander for ulike opioidreseptorer som er delt til hovedgrupper, undergrupper og videre til under-undergrupper. Tre viktige familier av endogene opioidpeptider har blitt godt karakterisert - endorfiner, enkefalin og dynorfiner, der enkefalin ble oppdaget først i 1975.[1] I 1997 ble det identifisert to ytterligere korte peptider, endomorf-1 og endomorf-2 som går under endomorf-familien, som viste å ha høy affinitet og selektivitet for μ -opioidreseptorer. De endogene opioidpeptidene binder seg til tre opioidreseptor hovedgruppene, μ , κ og δ . Enkefalin kobler seg hovedsakelig til δ reseptorene, dynorfiner til κ reseptorene og endorfiner binder til både μ og δ reseptorer med en sammenlignbar affinitet.[1]

Opioidforbindelser og deres reseptorer finnes både i det sentralnervesystemet (CNS) og perifere nervesystemet (PNS). Endogene opioide peptider er involvert i et mangfoldig utvalg av homeostatiske funksjoner og bevegelseskontroll, samt behandling av skadelig sensorisk inngang.[13] Det anti-nociceptive systemet som er involvert i smerteregulering og som skal fungere som kroppens egen smertestillende medisin, er i seg selv svært komplisert. Forståelse av det endogene opioid-systemet er nødvendig for forståelse av effektene av eksogene opioidanalgetika så vel som eksogene opioidpeptider.[14, 15]

Hver familie av endogene peptider blir dannet fra et bestemt forløperprotein. Forløperne prepro-opiomelanokortin (POMC), preproenkefalin og preprodynorfin er kodet av tre tilsvarende genkode for respektive enkefalinlin, endorfin og dynorfin.[1]

Felles for de endogene opioide peptidene med unntak av endomorf-1 og endomorf-2 er at de har de samme fire aminoterminale sekvensene i peptidet: Tyr-Gly-Gly-Phe.[1] Man antar at dette sekvenset er en del peptidenes farmakofor. Disse fire aminosyrene som er ved C-terminalen er festet til peptider i størrelser fra 5-31 aminosyrer.[16] Endomorf-1 og endomorf-2 har en prolingruppe istedenfor Gly-Gly. Prolingrupper i et peptid gjør at peptidet blir mer rigid og fører til mindre konformasjoner. Dette kan også være med å forklare hvorfor endomorf-1 og endomorf-2 har en høyere selektivitet for μ -reseptorene. Det kan tenkes at framkoforen i endomorf-1 og endomorf-2 har en bedre tilpasset topologi og bedre interaksjoner med μ -reseptoren. [1, 15]

2.2.1 Endorfiner

Det finnes fire underklasser av endorfiner α , β , γ og σ . De fire underklassene har forskjellige antall og type aminosyrer i deres molekyler, hvor peptidene har mellom 16 og 31 aminosyrer. Av de fire underklassene er β -endorfiner den kraftigste endogene opioidpeptid-neurotransmitteren. De produseres i hypofysen og hypothalamus og befinner seg i nevronene i det sentrale- og perifere nervesystemet. De frigjøres når kroppen møter på noen form for stress eller smerte. Under alvorlige smerter forårsaker endorfinene i kroppen vår en smertestillende effekt, men under stress virker endorfiner annerledes. De frigjøres til det limbiske systemet som reduserer omfanget av angst som kroppen vår føler. Den gir både en smertestillende effekt ved å binde seg til μ -reseptor og fører også til en følelse av eufori ved koble seg til σ -reseptor.[1, 15]

2.2.2 Enkefalin

Enkefalin er pentapeptider involvert i regulering av nociceptive smerter i kroppen. I 1975 ble to former for enkefalin oppdaget met- og leu-enkefalin.[16] De har samme aminosyresekvens bortsett fra at den ene inneholder leucin og den andre metionin, hvor begge stammer fra forløper proteinet proenkefalin A, inkludert met-enkefalin-arg-phe (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe). Met-enkefalin-arg-phe er en av peptidene som ble analysert i denne oppgaven og som vil bli mer omtalt om senere i denne oppgaven. Produksjon av enkefalin skjer hovedsakelig CNS og nyremarg og fungerer som blant annet kroppens eget smertelindring. Met-enkefalinene har sekvensen Tyr-Gly-Gly-Phe-Met. Leu-enkefalinene har sekvensen Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. De fire første aminosyresekvensene (Tyr-Gly-Gly-Phe) er essensiell for aktivering av opioide reseptorer noe som tyder på at farmakoforen befinner seg i denne delen av peptidet. [1, 15]

2.2.3 Dynorfiner

Dynorfiner dannes fra prodynorfin som spaltes ved hjelp av enzymet proproteinkonvertase 2 (PC2). Det dannes flere aktive peptider, inkludert dynorfin A og dynorfin B. Produksjon av dynorfiner skjer i mange forskjellige deler av hjernen, inkludert hypotalamus, hippocampus, midthjernen, forlengede marg (medulla oblongata) og ryggmargen og har mange forskjellige fysiologiske effekter avhengig av deres produksjonssted. Dynorfiner produsert og utgitt av hjernen og ryggmargen regulerer og påvirker viktige kroppsfunksjoner som kroppstemperatur, langtidshukommelse, sult, tørst, søvn og behandling av sensorisk informasjon. Navnet dynorfin kommer fra gresk *dyn* som referer til styrke eller kraft. Dette fordi dynorfiner er meget potente. Det ble funnet ut at endomorfiner var om lag 50 ganger mer potent enn β -endorfinene og omtrent 700 ganger mer potent enn leu-enkefalin.[16]

Dynorfiner utøver deres effekter primært gjennom κ -opioide reseptorene og fungerer som modulatorer av smerterespons, opprettholder homeostase gjennom appetittkontroll og døgnrytme, vektkontroll og regulering av kroppstemperatur.[1, 15]

2.2.3 Endomorfiner

Endomorfinene ble først oppdaget i 1997. Det finnes to typer endomorfiner, endomorfin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) og endomorfin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂).[16] Endomorfiner har høyest affinitet for μ -opioide reseptoren i forhold til de andre endogene opioidepeptidene. Dette kan komme av prolinggruppen i peptiden som gir mindre fleksibilitet, mindre rotasjoner og konformasjoner, slik at peptidet blir mer spesifikt for en type reseptorgruppe. Endomorfin-1 er bredt fordelt over hele hjernen og øvre hjernestamme og er spesielt rikelig i korteks, amygdala, hypotalamus m.m. Endomorfin-1 kan være med å regulere beroligende og opphissende atferd.

Endomorfin-2 finnes mest i ryggmargen og lavere i hjernestammen. De spiller en viktig rolle i oppfatning av smerte, respons relatert til stress og komplekse funksjoner som belønning og årvåkenhet, samt autonom, kognitiv, neuroendokrin og limbisk homeostase.[1, 15]

2.4 Opioidreseptorer

Opioidreseptorer kan deles inn i tre hovedundergrupper μ , κ og δ . De er alle G-proteinkoblede reseptorer som kjennetegnes med 7 transmembrane domener. Opioidreseptorene er lokalisert på flere områder av CNS som er kjent for å være involvert i å motta informasjon om smerte, blant annet hjernestammen, mediantalamus, ryggmargen, hypotalamus og limbiske-systemet. (Tabell 2) gir en oversikt over hvilke endogene forbindelser som har affinitet til de tre reseptor gruppene samt hvor reseptorene befinner seg og hvilke biologisk effekt og bivirkninger de gir. Opioidreseptorer har også blitt identifisert i det perifere systemet.[1]

Tabell 2: Viser en oversikt over lokasjon, effekt, bivirkning og affinitet til reseptor av endogene opioidpeptider.[1]

	μ-reseptorer	δ-reseptorer	κ-reseptorer
Lokalisering	SNS, tarmen og hypothalamus	Basalgangliene neokortikale områder i hjernen.	hjernebarken og hypothalamus
Endogene ligander	Endomorfiner, dynorfin og β -endorfin	Enkefaliner og β -endorfin	Dynorfiner og β -endorfin
Biologisk effekt og bivirkninger	Smertestillende Eufori Økt transittid i GI Temperatur regulering Immunsuppresjon Respirasjondepresjon Kvalme Toleranse Fysisk avhengighet	Smertestillende GI motilitet Luktesans Immunstimulering Respirasjondepresjon Kognitiv funksjon	Regulering av nosisepsjon Smertestillende Sedasjon Meiose Diurese Dysfori Neuroendokrin sekresjon

2.4.1 μ -reseptorer

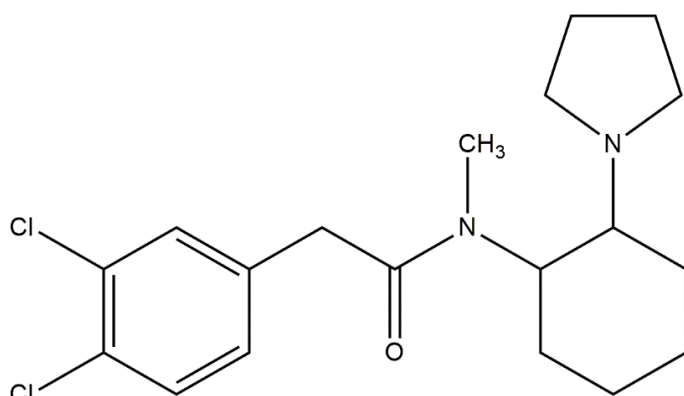
μ -reseptorene er kjent for dets høye affinitet for å binde til det eksogene ligandet morfin. Endogene peptider som binder sterkt for μ -reseptoren er endomorfin-1 og endomorfin-2. Andre opioidpeptider som β -endorfiner, enkefaliner og dynorfiner binder også til μ -reseptor men med lavere affinitet. μ -reseptoren kan videre deles inn i to under grupper μ_1 - og μ_2 -reseptor. μ_1 har høyere affinitet for endomorfiner og morfin og medierer supraspinal analgesi og kan selektivt bli blokkert av nalokson. μ_2 har lavere affinitet for morfin og medierer spinal analgesi, respiratorisk depresjon og forstoppelse.[1]

2.4.2 κ -reseptorer

κ -reseptorer befinner seg i hypotalamus og hjernebarken. Det finnes tre underklasser av κ -reseptoren κ_1 , κ_2 og κ_3 . De fysiologiske effektene generert av de ulike subtypeene er enda ikke fullstendig kartlagt.

Naturlige endogene peptider som binder til κ -reseptoren er β -endorfiner og dynorfiner. Men deres selektivitet for κ ovenfor μ -reseptorer er ikke veldig høy.[1]

Den første forbindelsen som viste å ha høy selektivitet til κ -reseptoren var forbindelsen U50488H, (se figur 3). Det viste seg å ha 50-ganger høyere selektivitet for κ over μ -reseptoren og har vært viktig i karakteriseringen av κ -opioidaktivitet.[16] Andre viktige forbindelser i samme klasse er PD-117302 og CI-977, og disse viser en selektivitet som er 1000 ganger høyere for κ -reseptoren ovenfor μ - eller δ -reseptorer.[16] Aktivert κ -reseptor viser å gi blant annet analgetisk effekt, diurese, sedasjon og dysfori. Sammenlignet med μ -reseptoren, gir ikke κ -reseptoren respiratorisk depresjon, forstoppelse eller sterke vanedannende effekter (eufori og fysisk avhengighet). Dette førte til håp på at κ agonister ville bli nyttige sterke smertestillende midler som manglet vanedannende egenskaper. Det er midlertidig ikke noe ligander som finnes på markedet som er selektivt κ -agonist. Studier har blitt gjort og det har blitt generert mange potente κ -agoniseter, men bivirkningene som ga sterkt beroligende og dysfori var ikke akseptable til å føre studien videre.[1, 16]



Figur 3: Viser struktur til U50488H som viser høy selektivitet for κ -reseptorgruppen

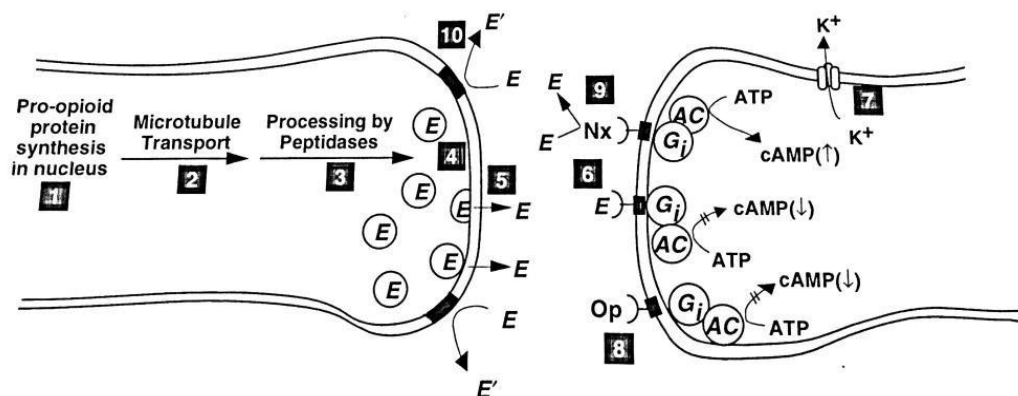
2.4.3 δ -Reseptorer

Reseptorene befinner seg normalt i basalgangliene i hjernen. δ -reseptoren er med på å gi smertestillende effekt, GI motilitet, luktesans, immunstimulering, respirasjonsdepresjon og kognitiv funksjon. Naturlige endogene peptider for δ -reseptoren med høy affinitet er leu- og met-enkepaliner og β -endorfiner.[1]

2.4.4 Transduksjonsmekanismen til opioide peptider:

Signaltransduksjonsmekanismen for μ , κ og δ reseptorer skjer gjennom transmembrane Gi / o proteiner (inhiberende G-protein koblede reseptorer). Dette fører til en rekke reaksjoner inn i cellen, en kaskadereaksjon, (se figur 4). Når opioide peptider fester seg til det aktive sete på reseptoren fører det til en deaktivering av enzymet adenylsyklase (AC) som igjen fører til en reduksjon av cyklisk adenosinmonofosfat (cAMP). Aktivering av opioide reseptorer kobles gjennom G-proteinet til en inhibering av adenylat-syklaseaktivitet. Resultatet er redusert produksjon av cyklisk adenosinmonofosfat (cAMP). cAMP er sekundære budbringere som er med på å aktivere cella ved at kalsiumioner (Ca^{2+}) strømmer inn igjennom kaliumkanaler som medfører til en aksjonspotensil og en viderføring av

strømmen til andre celler. Mindre cAMP fører til effluks av kaliumioner (K^+), og lukking av spenningstyret kalsium kanaler. Dette medfører til hyperpolarisering av nervecellen og dermed en inhibering av aksjonspotensialet.[1]



Figur 4: Figur av en terminal enkefalinergisk nerve hentet fra Foye's Principles of Medicinal Chemistry.[1]

1 og 2: Pro-opioidproteiner (proenkefalin A) syntetiseres i cellekjernen og blir transportert via mikrotubular transport til nerveenden.

3: Aktive endogene opioider (E) dannes fra pro-opioidproteinene ved hjelp av enzymer som bryter ned proteiner (proteaser).

4: De aktive peptidene (E) tas opp og lagres i presynaptiske vesikler og blir frigjort til synapsespalten ved aksjonspotensial.

5: Når et aksjonspotensial har nådd nerveenden frigjøres peptidene (E) til det presynaptiske nerveenden.

6: Når de endogene opioideptidene er i synapsespalten binder seg til postsynaptiske

reseptorer (μ , κ eller δ) og aktivere andre sekundære budbringere (cAMP):

7: For alle opioide reseptorer, er den sekundære budbringeren primært mediert av G-inhiberende proteinkompleks. Dette fører da til inaktivering av adenylatsyklase (AC), en reduksjon i intracellulær cyklisk adenosinmonofosfat (cAMP), og utstrømning av kaliumioner (K^+) fra cellen. Nettoeffekten er hyperpolarisering av postsynaptiske nevroner og inhibisjon av celle avfiring.

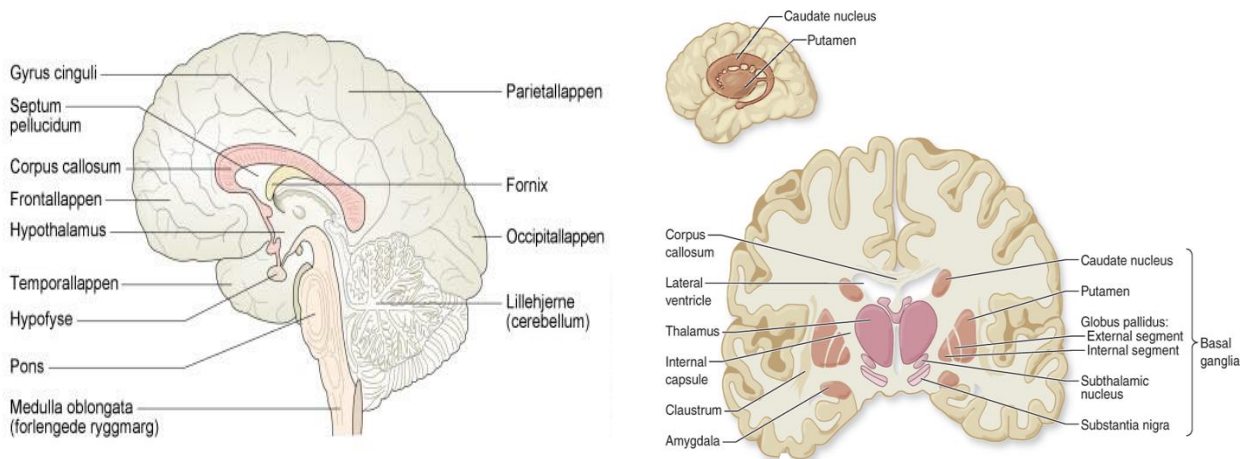
10: aktiveringen av det postsynaptiske nerveenden avsluttes av membran-bundet endopeptidase (enkefalinase), som hydrolyserer bindingen mellom Gly3-Phe4 i enkefalin.

2.5 Fordeling av opioidpeptider hos mennesker

Direkte målinger av opioidpeptider i vev og væsker fra friske mennesker har blitt studert ved hjelp av bioassays, radioreseptor assays (RRA) og spesifikke radioimmunoassays (RIA). RRA og RIA er metoder hvor man kan detektere konsentrasjoner av ligand og ligand-reseptor binding i vev og væsker. Denne metoden brukes sammen med analytiske separasjonsteknikker som f.eks. HPLC for å deretter skille mellom de forskjellige endogene opioide peptidene. Ved bruk av disse metodene ha man klart å detektere endogene opioide peptider i humant vev og i kroppsvæsker.[16]

2.5.1 Sentralnervesystemet (CNS)

Bindingsstudier har vist høye konsentrasjoner av opioidreseptorer i menneskehjernen med bred fordeling og klare variasjoner. Høyeste binding fantes sted i amygdale og talamus, fulgt av hypothalamus og periaqueductal gray (PAG). Mens det har vist lavere binding i hjernebarken og ubetydelig binding i lillehjernen.



Figur 5: Viser menneskehjernes anatomi. Til venstre vises snitt av høyre hjernehalvdel. Til høyre vises en horisontalt snitt av hjernen hvor områder i basalganglier er markert. [17, 18]

Hos friske individer viste det seg at met-enkefalin konsentrasjon var høyeste i globus pallidus, substantia nigra, caudate, og putamen, fulgt av hypothalamus og PAG område, se (tabell 3). Lavere men signifikante konsentrasjoner ble funnet i talamus, amygdala, hippokampus og hjernebarken. Ved teknikker som immunstaining var den mest intense enkefalin farging leu-enkefalin som ble funnet i globus pallidus.[16]

Høyeste konsentrasjoner av β -endorfin ble funnet i hypothalamus, med mindre mengder i PAG. β -endorfin ble også observert i hypofysens baklapp og forlapp, men konsentrasjoner har vært varierende. Disse variasjonene vises til å være pga. anvendelsen av RIA-ene samt mangel på tilgjengelighet av avdøde materiale.[16]

Dynorfiner er også blitt studert og det viste seg at distribusjonen var forskjellig fra met-enkefalin og β -endorfin, se tabell 3. Høyeste konsentrasjon ble funnet i substantia nigra og hypothalamus, og i caudate, globus pallidus og putamen. Lavere konsentrasjoner fantes sted i amygdala, hippokampus, PAG og pons.

Konsentrasjoner for dynorfin var mye lavere enn det som var funnet for met-enkefalin i hjernen. Distribusjon av dynorfin viste seg å være i basalgangliene.[16]

Tabell 3: Viser distribusjon av endogene opioide peptider i hjerne hos friske mennesker etter avdød [16]

Lokasjon	Met-enkefalin (pmol/gm)	B-endorfin (pmol/gm)	Dynorfin (pmol/gm)
Hypotalamus (hele)	141		
Anterior (fram del)		70	20
Posterior (bak del)		45	10
Globus pallidus		<0,5	6
Lateral	1163		
Medial	675		
caudate	116	<0,5	10
Putamen	200	<0,5	10
Substantia nigra (hele)		8	24
Pars compacta	557		
Pars reticulata	661		
Periaqueductal gray	143	32	2

2.5.2 Perifert vev

Ved immunostainingsteknikker er det blitt observert enkefalin utspredd i gastrointestinaltraktus (GI). Spesielt høy tetthet av farging ble detektert ved ventrikkelen og i tolvfingertarmen, mens lavere konsentrasjoner i tykktarm, galleblære, bukspyttkjertel og spiserør. Det meste av enkefalin som ble observert i tynntarmen befant seg i nevronene, mens i ventrikkelen var det tydelig at det var både endokrineceller og nevroner. I spiserøret var enkefalin detektert i glattmusklsturen, noe som tyder på at endogene opioide peptider er med i reguleringen av motilitet i GI.[16]

Konsentrasjonene av β -endorfin ble også observert i humant Ventrikkelen, men med omtrent 50 ganger lavere konsentrasjon enn met-enkefalin. I bukspyttkjertelen har det også blitt detektert signifikante β -endorfinalt materiale ved immunfarging til bukspyttkjertelen.

Dynorfin har også blitt isolert og identifisert fra tolvfingertarm, men fra svin i konsentrasjoner 10 ganger lavere enn met-enkefalin som tidligere ble funnet i ventrikkelen og tolvfingertarm i humane prøver. Dynorfin blir ikke identifisert ved GI i svin.[16]

Enkefalinene tydes også å være utbredt i det perifere nervesystemet (PNS). I dyreforsøk ble det observert både opioide reseptor og met- og leu-enkefalin ved dorsalthorn. Dynorfin har også blitt detektert i ryggmarg og dorsalrotganglier i kanin og rotte. Denne lokaliseringen av opioide peptider i ryggmargen antyder en rolle i smerte-modulering.

Høye konsentrasjoner av met-enkefalin og leu-enkefalinlinns, har blitt påvist i friske humane nyremarg. Binyrene kan være en potensiell kilde til met- og leu-enkefalin, siden høyere nivåer har blitt funnet i binyrene sammenlignet med andre steder.[16]

2.5.3 Plasma

Flere forskningsgrupper har klart å vise β -endorfin i plasma hos friske personer, men med veldig lave verdier. I humanestudier har nivåer av plasma β -endorfin blitt rapportert etter kirurgisk inngrep og mosjon hos normale personer og ved nyresvikt. De fysiologiske endringene som fører til denne økningen er ikke helt kartlagt. Det har også vist i studier at insulinindusert hyperglykemi fører til økt β -endorfin konsentrasjon på grunn av stressfaktorer. Også gjennom graviditet og gjennom fødsel har man sett en økning av β -endorfiner i plasma. Den fysiologiske effekten av forhøyede β -endorfiner i fosterets plasma og mors plasma under graviditet og fødsel er ikke helt kartlagt. [16]

Både met-enkefalin og leu-enkephalin har blitt påvist i det perifære systemet hos friske mennesker. Hos mennesker har det blitt observert høye konsentrasjoner av met-enkefaliner i nyremarg og i binyrene og det har kan tydes på at nyrene kan være en kilde til de sirkulerende peptidene i plasma. Men man har også observert plasma met-enkefalin etter fjerning av nyrene. Det betyr at sirkulerende met-enkefalin må også komme fra andre vev. Tarmen, sympatisk ganglia og autonome nerver er andre områder hvor met-enkefalin har blitt påvist i periferen.

Den fysiologiske rollen av enkefalinene i plasma er fortsatt ikke kartlagt. Studier tyder på at sirkulerende enkefaliner kan direkte dempe effekten av katekolaminer på hjertet. I isolerte rotteatria ble det gitt lave konsentrasjoner av bare metkefalin 10^{-7} M og viste antagonistisk effekt av noradrenalin.

Met-enkefalin nivåer øker ikke etter insulinindusert hypoglykemisk stress, som det var sett for β -endorfiner. Det har også blitt vist at hard fysisk trening øker plasmanivåer av enkefalin hos kvinner

Videre studier er nødvendig for å karakterisere enkefalin peptidene i menneskers plasma, både i blodsirkulasjonen og nyre/binyrene og å forstå deres frisetting og funksjon i plasmaet.[16]

2.5.4 Cerebrospinalvæske (CSF)

I 1975 ble det først detektert opioid aktivitet i human cerebrospinalvæske (CSF). Peptidene som var oppfaget ble delt i 2 fraksjoner, fraksjon 1 og fraksjon 2. I videre studier kunne man fortelle at fraksjonen 2 peptider, kunne ha kommet fra enkefalin-forløperen mens fraksjon 1 peptider ha kommet fra dynorfin. Studier på schizofrene og maniske individer viste forhøyet konsentrasjon av dynorfin sammenlignet med kontrollprøver.

I 1980 ble det funnet at enkefalin i CSF ble redusert etter migrene- og gjentakende hodepine i forhold til kontrollnivåer, mens nivå økte betydelig etter elektrisk stimulering for lindring av kronisk smerte. Høyfrekvent elektroakupunktur økte også CSF-met-enkefalin nivåene. Mulige kilder for enkefaliner og dynorfin i CSF kan både være hjerne og ryggmargen. Kilden til β -endorfin i CSF er uklart, men generelt er det observert høyere konsentrasjon av β -endorfin, dynorfin og met-enkefalin i CSF enn i plasma. [16]

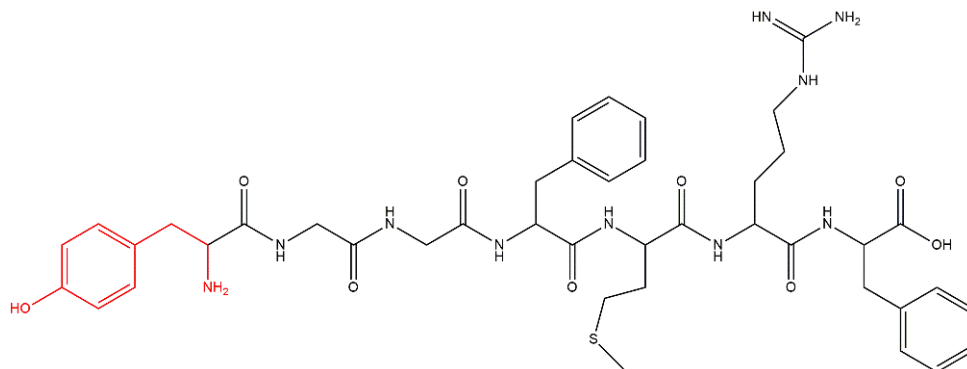
2.6 Eksogene opioide peptider

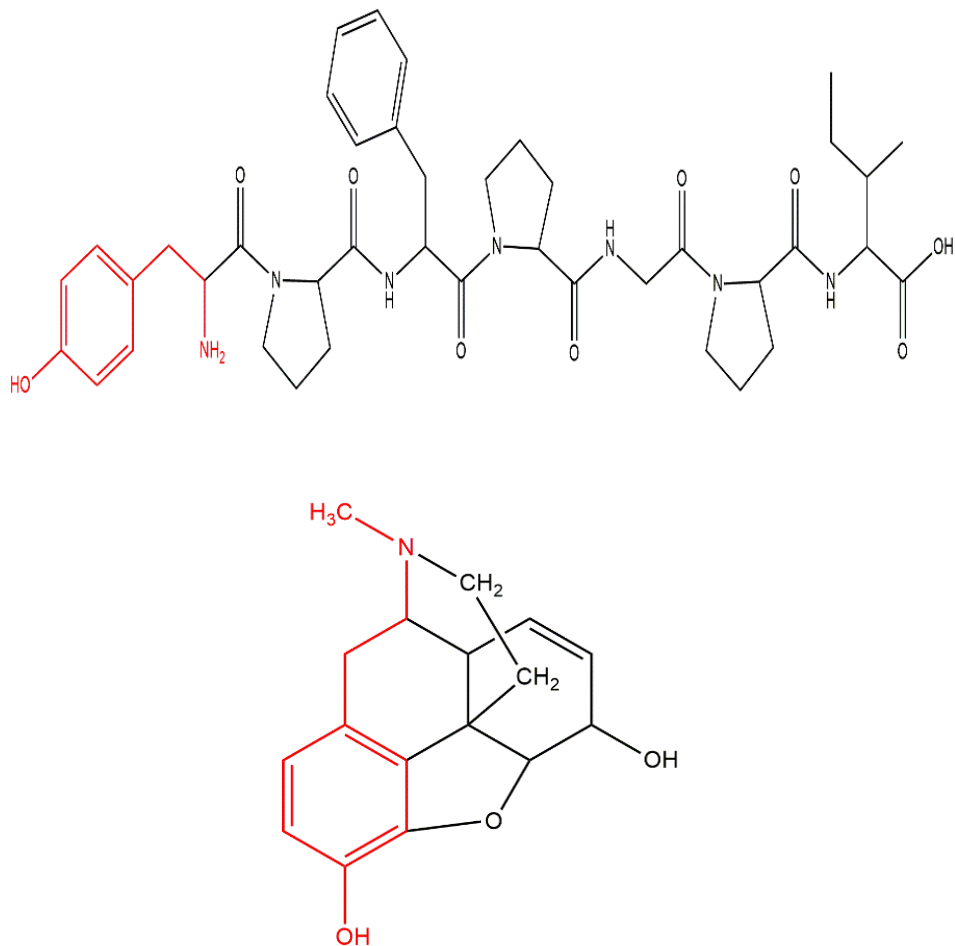
Eksogene opioide peptider (eksorfiner) stammer fra plante- og dyreproteiner som inntas gjennom dietten. Melk/meieriprodukter og hvete er blant de største matvarene som består av eksogene opioide peptider.[3] Melk og meieriprodukter inneholder proteinet kasein som nedbryts i gastrointestinal traktus (GI) til bioaktive peptider (kasomorfiner). Gluten er hoved proteingruppen i hvete og består av gluteniner og gliadiner. Under nedbrytning av gluten kan den på samme måte som for kasein, bli nedbrytt til bioaktive peptider (gluteneksorfiner). Både kasomorfiner og gluteneksorfiner blir dannet ved hjelp av enzymene pepsin, elastase og leucin aminopeptidase i GI.[3, 19] Kasomorfiner og gluteneksorfiner som dannes er rike på prolingrupper, som gjør dem stabile mot videre nedbrytning av de samme enzymene. DPPIV blir dermed en viktig enzym som er med å nedbryte disse peptidene. Studier har vist til at ved lave verdier eller inaktivering av DPPIV enzymet, så er nivåer av kasomorfiner og gluteneksorfiner forhøyet. Kasomorfiner og gluteneksorfiner har vist seg å kunne kompleksere seg med targetmakromolekyler, blant annet opioid reseptorer. Dette tyder på at eksogene peptider har en tilsvarende farmakofor med riktig topologi som gjør det mulig for den å danne kompleks med reseptorene.[20]

2.6.3 Farmakofor

En farmakofor er en abstrakt beskrivelse av molekylære egenskaper som er nødvendige for gjenkjenning av en ligand av et biologisk targetmolekyl. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definerer et farmakofor som et "ensemble av steriske og elektroniske egenskaper som er nødvendig for å sikre et optimalt supramolekylære interaksjoner med et bestemt biologisk mål for å utløse (eller blokkere) dets biologiske respons".[21]

I denne oppgaven er det ikke blitt lagt vekt på farmakofor, struktur, konformasjoner og topologier i forbindelse med target molekyl siden det ikke var en del av oppgaven. Men generelt ble det observert at alle endogene opioide peptider og eksogene opioide peptider har en tyrosingruppe til felles som første aminosyre, se (figur 6). Det kan tenkes at denne delen av peptidet er essensielt for binding til targetmolekylet. Morfin som også er vist i figuren har ikke en tyrosingruppe, men man kan likevel se en felles lihetstrekk.





Figur 6: Viser tyrosingruppe i BCM-7 (øverst) og met-enkefalin-arg-phe (midten). Morfin (nederst) har ikke denne tyrsingruppen, men man kan se noen likhetstrekk mellom morfin og tyrosindel som befinner seg i de nevnte opioide peptidene.

2.6.2 Kasomorfiner

Kasomorfiner med opioid-liknende egenskaper er funnet i melk og meieriprodukter. [22] Melk inneholder to store proteingrupper, kasein og myse. Det er blitt identifisert 4 typer kaseiner: α -s1, α -s2, β og κ , hvor β -kasein er av interesse og vil bli omtalt i denne oppgaven. Kasein er hoved melkeproteinene i kumelk og utgjør ca. 80 % av proteinenes innhold mens de resterende 20 % er myse. [23] Ved proteolytisk spaltning av β -kasein under fordøyelsen dannes kasomorfiner med 3 – 11 aminosyrer. [24] En analog av β -kasomorfin 1-4 med en amidgruppe i C-terminalen har også blitt isolert fra kommersiell kumelk. [25] I denne oppgaven vil BCM-3, BCM-4A og BCM-7 bli omtalt nærmere, da de er 3 av peptidene som ble studert i denne oppgaven, se (tabell 4) for oversikt over β -kasomorfiner.

Tabell 4: viser aminosyresekvenser for et utvalg av β -kasomorfiner og deres amidderivater.

β-Kasomorfiner	Aminosyresekvens
BCM 1-3	H-Tyr-Pro-Phe-OH
BCM 1-4	Tyr-Pro-Phe-Pro
BCM 1-4 amid	H-Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂
BCM 1-5	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly
BCM 1-5 amid	H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-NH ₂
BCM 1-6	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro
BCM 1-7	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile
BCM 1-8	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro
BCM 1-11	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu

Amidanaloger av BCM gjør peptidene mer motstandsdyktige mot enzymatisk nedbrytning ettersom enzymer i kroppen er programert til å metabolisere karboksylsyre-grupper i forhold til amid. Amidsubstituenten beskytter dermed peptidet fra karboksypeptidaser som hydrolyserer peptidbindingen i C-terminalen. Amidanalogene vil dermed ha en lengre halveringstid i forhold til deres karboksylanaloger. Studie på BCM-4A har vist å ha en høy selektivitet for μ -opioidreseptoren. [26, 27] Men flere omfattende studier på eksogene opioide peptider fra meieriprodukter er nødvendige for å oppklare deres effekter og ikke minst deres potensielle skadelige effekter.

2.6.3 Gluteneksorfiner: Gliadorfin

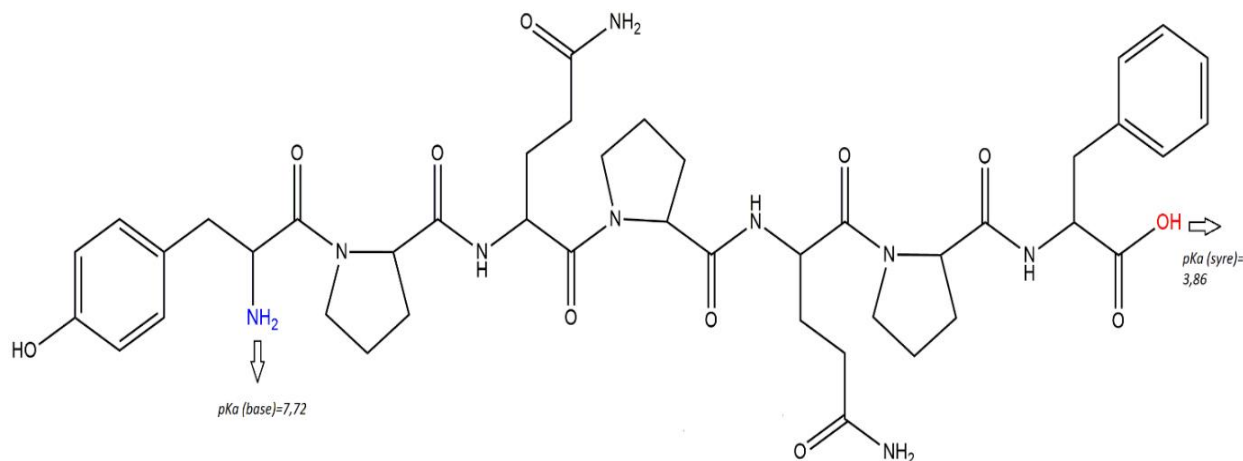
Hvete er den største kilden til gluten, som finnes blant annet i brødvare og pasta. Glutenoproteinet kan deles inn i to grupper, gluteniner og gliadiner. Glutenin og gliadin kan brytes ned til henholdsvis gluteneksorfin A-C og gliadorfiner gjennom hydrolysering med fordøyselsenzymene pepsin, leucinaminopeptidase og elastase. Gliadorfin-7 (GLIA-7) er en av gluteneksorfinene som vi har studert i denne oppgaven og som vil bli omtalt videre. GLIA-7 består av 7 aminosyrer (Tyr-Pro-Gln-Pro-Gln-Pro-Phe).[22]

Tabell 5: Oversikt over et utvalg av gluten eksorfiner og deres aminosyresekvens.

Eksorfiner	Aminosyresekvens
Eksorfin A4	Gly-Tyr-Tyr-Pro
Eksorfin A5	Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr
Eksorfin B4	Tyr-Gly-Gly-Thr
Eksorfin B5	Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu
Gliadorfin-7	Tyr-Pro-Gln-Pro-Gln-Pro-Phe
Eksorfin C5	Tyr-Pro-Ile-Ser-Leu

GLIA-7 er blant annet assosiert med nevrologiske lidelser slik som autisme og schizofreni.[28] Det har blitt hevdet at gluten eksorfiner kommer seg til blodbanen gjennom permeabiliteten i tarmen, som har blitt forandret ved genetiske eller patologiske tilstander. [29] Under disse endrede forhold, kan gluteneksorfiner nå CNS der de kan binde seg til targetmolekyler og påvirker adferden. Gliadin er ofte forbundet med cøliaki som er en kronisk tarm sykdom som skyldes gluteninntak. Dette vil bli nærmere omtalt i denne oppgaven.[3]

GLIA-7 har en logP på - 3,67 ved nøytral pH. Den relativ sterkeste basen i peptidet er den frie alifatiske aminogruppen i Tyr med en pKa-verdi på 7,72 (HB⁺). Den sterkeste syren er karboksylsyregruppen i Phe med en pKa-verdi på 3,86 (HA), se (figur 8). Ved pH 7,4 (i tynntarmen) har 32,28 % av gliadorfin molekylene en total ladning -1, der karboksylgruppen i Phe er ladet. 67,72% av molekylene har total ladning 0, der alifatiske aminogruppen i Tyr og karboksylsyregruppen i Phe er ladet, se (tabell 6).



Figur 7: Viser gliadorfin-7 med de respektive pKa-verdiene, hvor NH₂-gruppe er 7,72 og COOH-gruppe er 3,86

Tabell 6: Viser hvilke funksjonelle grupper i peptidet som er ladet ved pH 7,4 og peptidets totale ladning. [30]

Ved pH 7,4	R-COO ⁻ (%)	R-NH ₃ ⁺ (%)	Ph-O ⁻ (%)	Andel molekyler (%)	Total ladning
GLIA-7	100	67,72	-	32,28 67,72	-1 0

2.6.4 Absorpsjon av peptider fra mage og tarm til Blod-hjerne-barriere

Epitelcellene i tarmen er en av kroppens viktige barriere som hindrer absorpsjon og transportering av makromolekyler. For å hindre opptak av uønskede molekyler til å inntrengne tarmens barriere, er en intakt celleforbindelse nødvendig (tight junction). Ved en del sykdommer har man sett at epitelet ikke lenger er intakt. Lekk tarm er et begrep som blir brukt i tilstander hvor epitelcellene ikke lenger er intakt og dermed fått en økt permabilitet. Deffekt i tarmbarrieren kan føre til at potensielle patogene komponenter lettere inntrenger kroppens interne miljø. Makromolekyler kan da passere gjennom tarmslimhinnen ved paracellulærdiffusjon. I flere typer sykdommer har man funnet en tilstand der tigh junction proteinene er nedregulert og man har en økt tarmpermabilitet hvor større peptider og molekyler lettere kan tas opp i sirkulasjonen. [31, 32]

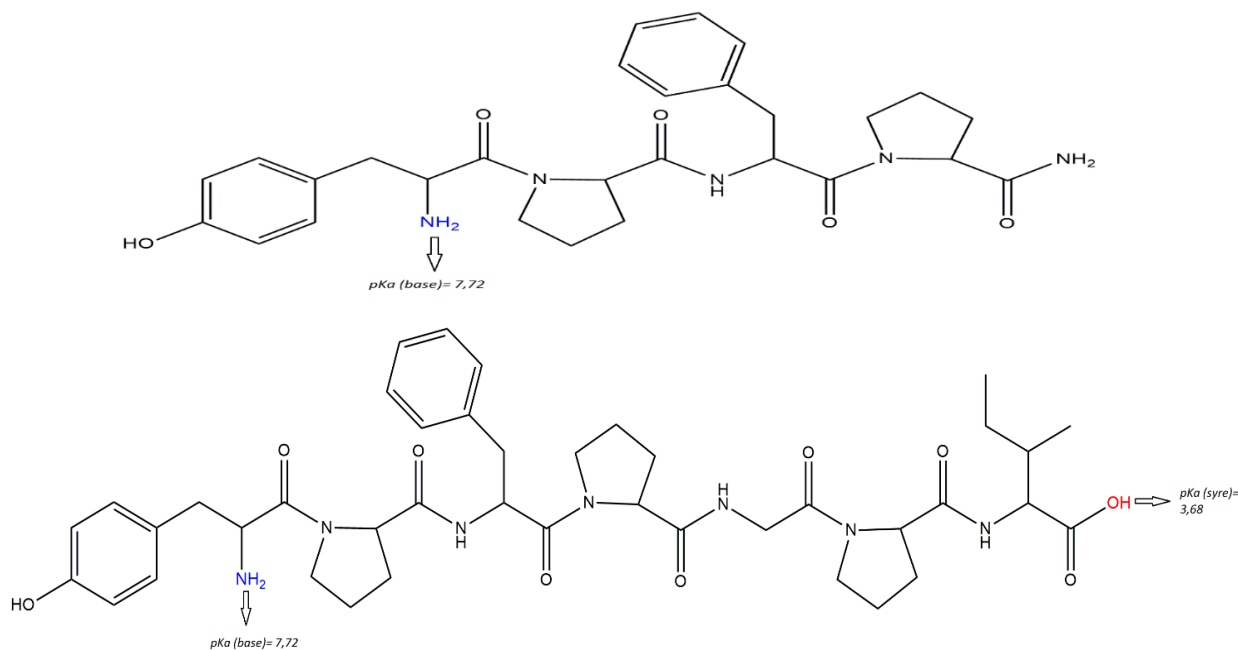
Mekanismene bak lekk tarm er ikke helt klarlagt og synes å kunne ha forskjellige forklaringer. Den kan skyldes både maten vi spiser, tilstedeværelse av bakteriene vi har i tarmen og ikke minst hvilke genetisk disposisjon vi har for immunologisk sykdom.[31, 32]

Tidligere studier har påvist relativ høye konsentrasjoner av BCM-7 i urinen hos pasienter med autisme.[2] Funn av peptidet i urin, tyder på at peptidet har blitt absorbert via mage og tarm og kommet seg til plasma. Noen studier indikerer at absorpsjon av kasomorfiner fra tynntarmen til blodet er mulig, spesielt

hos spedbarn grunnet umodne epitelcellelag.[6] Tilstedeværelsen av store mengder kasomorfiner og gliadorfiner som finnes i urinen hos autistiske barn og voksne pasienter med schizofreni kan være av flere grunner. En økt permeabilitet i tarmslimhinnen (tight junction) har blitt observert hos barna med autisme og voksne med schizofreni, som kan være en argument for hvorfor disse peptidene kan krysse over til blodbanen. En annen mekanisme kan være utilstrekkelig eller mangelfull enzymer enten i tarm- eller blodplasma som fører til store mengde av disse peptidene[3, 4].

In vitro studier har blitt gjort hvor man har sett absorpsjon av kasomorfiner i humane epitelceller. Caco-2 celler har blitt foreslått til å være transportveien for kasomorfiner fra tynntarm til plasma. In vitro gjennomgår Caco-2 celler en prosess med spontan differensiering som fører til dannelse av av celler som viser flere morfologiske og funksjonelle karakteristika av modne epitelceller, med eget transportsystemer for di/tri peptider, aminosyrer og glukose med tettliggende endotelceller (tight junction). På denne måten blir de fullt i stand til å etterligne funksjonene i epitelet og kan brukes i analyse av intestinal absorpsjon in vitro. Studien var gjort på BCM-5 og BCM-7 og viste at disse peptidene krysser caco-2-cellelaget ved diffusjon, siden det ikke viste noe metnings karakteristisk i transporten. [33]

Faktorer som begrenser permeabiliteten til peptider gjennom epitelium har å gjøre både med struktur og kjemiske egenskaper. Molekylets ladning, molekylær masse og lipofilitet vil i hovedsak bestemme om et legemiddel kan passere de ulike transportbarrierene. BCM-4A har en log P 0,42 og BCM-7 har en log P på - 1,47, se (figur 8). Log P er fordelingskoeffisienten mellom n-otanol og vann og brukes som et uttrykk for å beskrive legemidlets evne til å diffundere passivt over biologiske membraner.[34] BCM-4A har en høyere log P og vil være mer lipofil enn BCM-7.



Figur 8: Viser strukturen til BCM 1-4A (øverst) og BCM 1-7 (nederst) med deres respektive pKa-verdier. OH-gruppen på benzen ringen har en pK på 9,51, men dette vil ikke bli ladet ved fysiologisk pH, og vil dermed ikke ha en syre funksjon.[30]

Tabell 7: Viser hvilke funksjonelle grupper i peptidet som er ladet ved pH 7,4 og peptidets totale ladning

Ved pH 7,4	R-COO ⁻ (%)	R-NH ₃ ⁺ (%)	Ph-O ⁻ (%)	Andel molekyler (%)	Total ladning
BCM 1-4A	-	67,5	-	67,5 32,5	+1 0
BCM 1-7	100	67,5	-	32,5 67,5	-1 0

Blod-hjernebarrieren (BHB) har en grunnleggende rolle i å opprettholde et stabilt miljø i hjernen. Homeostasen i hjernen opprettholdes gjennom tre sentrale barrierer; en fysisk barriere, en metabolsk barriere og en transport barriere. [33, 35]

Den fysiske barrieren i BHB består av tettliggende endotelceller (tight junctions), astrocytter og pericytter. Den fysiske barrieren er veldig robust mot transendotel migrering for å beskytte CNS fra kjemiske forbindelser og skade.[36] Den fysiske barrieren kan svekkes under spesielle forhold, blant annet ved infeksjoner i CNS. Man har også sett at barrieren er svekket ved ulike degenerative sykdommer som f.eks. alzheimers og muliple sklerose. Man har blant annet vist at barrieren blir mer svekket ved infeksjoner i sentralnervesystemet og ved ulike degenerative sykdommer som multippel sklerose, parkinsons sykdom og alzheimer. Pro inflamatoriske stoffer som TNF, IL-1 og IL-6 er også blitt vist å øke BHB permeabiliteten.[37]

Næringsstoffer fra det perifære systemet transporteres inn i hjernen ved passiv og aktiv transportsystemer. Fettløselige stoffer diffunderer pasivt gjennom membranen mens hydrofile molekyler som glukose og peptider bruker makromolekyle transportere. BHB har også en såkalt effluks-transportssystem som avgrensner eksponeringen av hjernevev for potensielt skadelig stoffer. [38, 39].

BHB uttrykker også en god del enzymer i endotelcellene, blant annet aminopeptidaser og karbokylpeptidaser. Influx transportssystem i BHB har vist å transportere både endomorfine 1 og endomorfine 2 i dyreforsøk. Endomorfine 1 og endomorfine 2 har vist å være stabile i forhold til andre peptider pga. at de inneholder proliningrupper. [40] Det kan tenkes at de eksogene opioide peptidene også kan oppføre seg på en slik måte og bli transportert inn i BHB ved influksystemer. De eksogene peptidene som inneholder prolingrupper kan tenkes å gi større effekt i CNS ettersom de er mer resistente for nedbrytning pga. deres innhold av prolingrupper. Det kan også antas at nedbrytningsprodukter av de eksogene opioide kan migrerer inn i CNS, hvor farmakoforen er inntakt som kan uttrykke sin effekt på target makromolekyler i CNS.

β-kasomorfiner og gluteneksorfiner brytes ned av dipeptidylpeptidase IV (DPPIV). DPPIV er et proteolytisk enzym som spalter ned lange peptidsekvenser til kortere kjeder. Enzymet tilhører klassen eksopeptidaser, som spesifikt bryter bindinger av aminosyre prolin og alanin i andreposisjonen fra N-terminalen av aminosyresekvensene. [20, 41, 42] Av 11 peptider som er med i dette studiet, har 9 av peptidene enten en prolin eller en alaninaminosyre i andreposisjon (med unntak av met-enkefalin og deltorfin). Nedbrytningsmønsteret av BCM-4A kan være en blanding av Try-pro, Phe-Pro-NH₂. BCM-7 kan bli metabolisert til en blanding av Tyr-Pro, Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, Phe-Pro, Gly-Pro-Ile, Ile. Mangel på eller inaktivitet av DPPIV kan resulterer i høy plasmakonsentrasjon av eksogene opioide liknende peptider.

2.7 Sykdommer

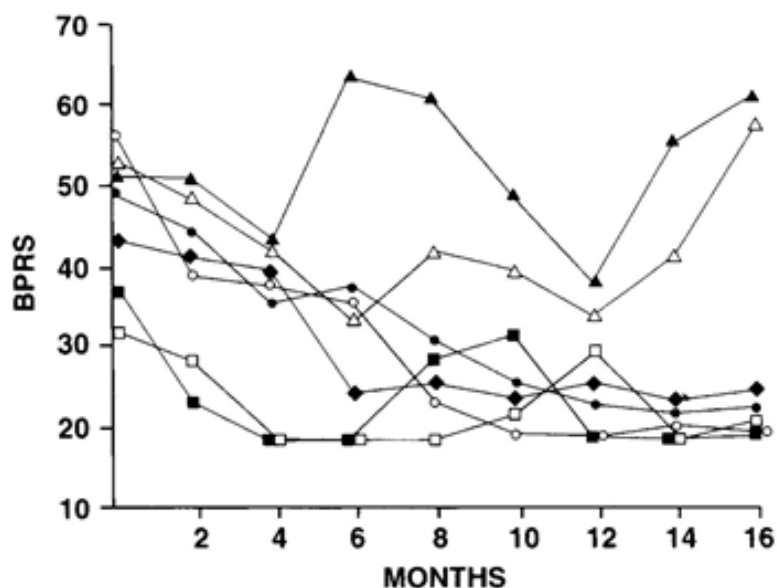
Flere vitenskapelige arbeid tyder på at endogene opioidpeptider har en vis rolle i CNS relaterte sykdommer. Alkaloider fra planter som f.eks. morfin som har blitt administrert i friske individer kan forårsake psykoaktive effekter inkludert forandring av humør, eufori, og lindring av angstfølelse. Endogene opioide peptider er distribuert i hjernestammen og limbiske strukturer og dette passer godt sammen med at de har en rolle i regulering av stemning og oppførsel.[16]

Eksogene opioide peptider har en del karakteristiske likheter med endogene opioide peptider, og kan dermed tenkes at de kan oppføre seg på en lignende måte som endogene opioide peptider. Disse peptidene er koblet opp mot flere sykdommer, blant annet schizofreni, autisme, krybbedød og cøliaki. De fleste studier som er gjort i forbindelse med eksogene opioide peptider er basert på epidemiologiske studier og studier hvor kasein- og glutenfri diett er blitt implementert. Det er mange ubesvarte spørsmål angående patofysiologi av disse sykdommene, samt hvordan de er koblet opp mot eksorfinene. Det er nødvendig å forstå patofysiologien til disse sykdommene og hvordan de blir påvirket av eksorfinen og ikke minst hvor og i hvilke konsentrasjoner disse peptidene befinner seg i.

2.7.1 Schizofreni

Schizofreni er en psykisk lidelse som omfatter mange mentale forstyrrelser, sosial tilbaketrekning og svekket sosialfungering.[43] Schizofreni rammer omtrent 0,5-1 % av befolkningen i Norge.[44] Symptomene til schizofreni deles ofte inn i positive og negative symptomer. Positive symptomer er oftest synlige ovenfor andre mennesker i motsetning til negative symptomer som er vanskelig å oppdage. Positive symptomer beskriver symptomer vrangforestillinger, tankeforstyrrelser og hallusinasjoner, mens negative symptomer beskriver tap av motivasjon, tilbaketrukkethet, tap av empati, m.m. Schizofreni har blitt anslått til å være en arvelig sykdom på i 70 % av tilfellene. Den utløsende faktoren ser ut til å være miljøpåvirkninger som f.eks. oppvekstvilkår, infeksjoner og underernæring under svangerskapet og fødselskomplikasjoner.[45] Ulike studier hevder også at schizofreni hos enkelte kan skyldes en kombinasjon av genetiske årsaker sammen med gluten og kasein inntak.

En studie basert på kasein- og glutenfri som ble utført i USA har vist at kasein- og glutenfri diett kan potensielt gi forbedringer i symptomer hos schizofrene pasienter. Studien besto av 57 frivillige schizofrene pasienter der studien varte i 16 måneder. Symptomer ble målt i form av BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale), der 18-24 symptomer blir skåret fra 1-7, der 1 er normal og 7 er svært alvorlig. Under studien droppet 28 pasienter ut i perioden 1-6 måneder, og 29 pasienter fullførte hele studien. Resultatene i BPRS viste store forbedringer og eller fullstendig bedring i symptomer hos alle pasientene. Det ble også sett forbedringer hos pasientene før de droppet ut av studien. Figur 9 viser resultatet i form av BPRS hos 7 pasienter. Alle pasientene viste store forbedringer av symptomer allerede i løpet av de første månedene.[4] Denne studien viser at kasein- og glutenfri diett kan potensielt gi forbedringer i symptomer hos noen schizofrene pasienter.



Figur 9: Viser utviklingen av symptomer i 7 pasienter i løpet 16 måneder på kasein- og glutenfri diet. Symptomer er målt i form av BPRS

2.7.2 Autisme

Autismespekterforstyrrelser er en type utviklingsforstyrrelser som omfatter vansker med gjensidig sosialt samspill, kommunikasjon og repeterende atferd. Symptomene ved autismespekterforstyrrelse varierer fra person til person, men kommer vanligvis i løpet av barnets 3 første leveår. Noen har alvorlig psykisk utviklingshemning og svært lite språk, mens andre har gode intellektuelle evner og normalt språk. Forskning viser at så mange som 1 % av befolkningen kan være innenfor autismespekteret.[46] Omtrent fire ganger flere gutter enn jenter får en diagnose i autismespekteret. Patofysiologien bak sykdommen er ikke fullstendig kartlagt, men det man vet er at ASD er i stor grad arvelig. En rekke teorier bak sykdommen har blitt foreslått, hvor sykdomsårsaken bak autisme er blitt koblet opp mot metabolske forstyrrelser. Pankepp i 1979 fåreslo at årsaken til autisme kunne være en akkumulering av opioide peptider i det perifere og sentrale nervesystemet, hvor han kalte teorien for "The opioid excess theory". [47]

Pankepp påviste at morfin i lave doser kunne indusere ASD atferdsmønstre hos dyr. Fra denne observasjonen hos dyr har Panksepp ekstrapolert hypotesen til pasienter med ASD. Studier utført av Panksepp med lavdosert morfinbehandling til dyr viste følgende spesifikke effekter:

- 1 Redusert smerteopfatning ved fysiske skader
- 2 Gråting hos dyrene ble signifikant redusert, og mindre spontant sammenlignet med normale dyr
- 3 Dyrene klamret seg ikke til foreldrene sine
- 4 Det ble observert ingen sterke ønsker om sosiale interaksjoner

5 Dyrene viste også til uvanlige innlæringsatferder, som ekstrem bestemtthet selv ved fravær av ekstern belønning. Likhetstrekkene med ASD-pasienter kan tyde på en underliggende nevrokjemisk ubalanse, med overflødig og uvanlig aktivitet av endogene opioider i hjernen. [47]

Noen av symptomene til barn med ASD kan allerede observeres i spedbarns alder. Det har blitt observert lite gråting, ikke klamring inntil foreldrene og en generell mangel på behov for et sosialt felleskap. Disse trekkene tyder på at ASD-pasienter ikke er i stand til å føle de normale emosjonene som kan oppstå i et sosialt forhold. [47]

De endogene opioidene kan regulere emosjonelle følelser, og endorfinene antas å bli frigjort under sosiale interaksjoner. En nylig studie fra 2017 fant blant annet økt frigjørelse av endorfiner i hjernen under latterfulle sosiale sammenhenger. [48] Studiet observerte også at deltagerne med flere opioide reseptorer i hjernen lo betydelig mer under eksperimentene, i forhold til deltagerne med færre reseptorer.

Høye konsentrasjoner av den mest potente endogene opioide peptidet endorfiner (og endomorfine) har blitt funnet i enkelte hjerneregioner hos prenatale rotter. Med tid og utvikling mot voksen alder skifter produksjonen av de potente endomorfine mot svakere endorfiner (f.eks. enkefaliner) med kortere halveringstid. Den biologiske hensikten med dette er ikke fullstendig forstått, men dette kan muligens reflektere den reduserte utviklingen av hjernens systemer hos pasienter med ASD. ASD-pasienter kan følgelig være i et konstant infantilstadium med overaktivitet av potente endorfiner. Forsinkelsen i hjernens utvikling kan dermed forhindre hjernen i å respondere adekvat til de sensoriske og sosiale omgivelsene. [47]

Mange barn med autisme har gastrointestinale symptomer som inflammasjon, diare, sure oppstøt og økt intestinal permeabilitet, som kan føre til at eksorfiner lettere penterer gjennom tarmen. Det er blitt påvist patologiske konsentrasjoner i urin av BCM-7 hos autistiske barn.[2]

Tidligere forskning har også vist en sammenheng mellom kostholdsendring og sykdomstilstand.[4, 5, 49] I en studie bestående av 20 deltagere, ble 10 satt på kasein- og glutenfri diett, mens resterende 10 var kontrollgruppe. Deltagerne i studien var barn mellom 7-8 år og utfall av symptomer av autisme ble målt på sosial isolasjon, kommunikasjon og adferd. DIPAB, et dansk verktøy ble brukt for å måle utfallene av symptomene.[49]

Skårssystemet for tilbaketrukkethet, uvanlig oppførsell skulle være lavest, mens for kommunikasjonsferdighet skulle den være høy. (Tabell 8) viser at en kosthold bestående av kasein og glutenfri kan potensielt være effektiv mot symptomlindring av autisme. Det skal også sies at antall deltagere i denne studien var lav og dermed vanskelig å si om denne effekten var basert på diettendring eller bare tilfeldigheter. Flere studier trengs innenfor dette feltet for å få en klarere forståelse om hvordan kasein og gluten påvirker pasienter med autisme. Og om disse peptidene finnes i større konsentrasjoner hos autistiske personer og eventuelt hvordan disse påvirker CNS.

Tabell 8: Viser effekt av symptomstilstand til autistiske barn etter 1 års kostholdsending uten kasein og gluten.

Test av autistiske symptomer	Før Diet	Etter diet
Diet gruppe	12.5 ± 2.2	5.6 ± 2.4
Kontroll	11.5 ± 3.9	11.2 ± 5
Tilbaketrukket	7.6 ± 1.7	3.0 ± 1.4
kontroll	7.1 ± 2.8	3.0 ± 1.4
komunikasjonsferdigheter	3.9 ± 0.9	6.2 ± 1.2
Kontroll	4.3 ± 1.3	4.5 ± 1.6
Uvanlig oppførsel	4.9 ± 1.5	2.6 ± 1.7
Kontroll	4.5 ± 2.6	4.8 ± 2.6

2.7.3 Krybbedød (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS)

SIDS defineres som dødsfall hos friske spedbarn innen 1 års alder. ALTE (Apparent life threatening events) kan sees på som forstadiet til SIDS som blant annet karakteriseres ved apné-hendelse. Det vil si at et spedbarn har hatt respirasjonsstans i 15 – 20 sekunder. Dersom det samtidig opptrer fall i hjertefrekvens til < 100 slag/min, kan respirasjonsstansen være kortere enn 15 – 20 sekunder. [50]

Studier har vist at hos spedbarn med ALTE så er det blitt funnet høyere konsentrasjoner av BCM-5 og BCM-7 i plasma sammenlignet med kontrollgrupper. Det ble også funnet lave konsentrasjoner av DPPIV hos dem med ALTE. Det kan tolkes at den lave DPPIV aktiviteten kan være ansvarlig for opioidindusert respirasjondepresjon induert av BCM-7. [51]

En felles kilde for alle spedbarn som utvikler SIDS og ALTE er melk – enten det er humant melk eller morsmelkerstatning. Derivater av kasein har blitt funnet i hjernestammen til spedbarn som har dødd av SIDS. Det har derfor blitt foreslått at BCM muligens er en forklaring til dette. BCM-5 og BCM-7 kan bli absorbert via tarm hos spedbarn med umodne epitelceller, samt krysse BHB fordi CNS ikke er ferdig utviklet.[24, 33, 52] BCM er biologisk aktiv ovenfor μ -reseptoren med liknende effekt som morfin. Hvis BCM penterer inn i en spedbarns umodne CNS kan den muligens inhibere respirasjonssystemet i hjernen som dermed fører til åpne hendelser og død.[2]

2.7.4 Cøliaki (SD)

Cøliaki (CD) er en kronisk betenneslessykdom som skyldes av gluteninntak og rammer ca. 1-2 % av befolkningen i Norge. Det oppstår en atrofi av tarmtottene og tarmens overflate reduseres. Denne totteatrofien skjer hovedsakelig i duodenum (tolvfingerarmen) og proksimale jejunum (første del av tynntarmen). Typiske symptomer i CD er løse og hyppige avføringer, magesmerter, luftplager, vekttap og slapphet.[53]

Det har merkelig nok også blitt oppdaget store pasientgrupper som har blitt diagnostisert med CD, men som mangler de klassiske symptomene ved SD, og dermed blir referert som "asymptomatisk CD" (ACD). Disse gruppene er blant annet pasienter som har depresjon, schizofreni og autisme.[3]

En menneskestudie med 2089 eldre personer hvor det ble påvist at 54% av personene var anti-gliadin antistoff (AGA) positive som led av tarmbetennelse, men bare et lite antall klagde over gastrointestinale

symptomer. Spørsmålet ble dermed hvorfor pasienter med positiv ACD ikke kjente på de samme symptomene, og om det kunne være forbindelser i gluten som ga opioideffekter som maskerte symptomene for ACD.[3]

Nedbrytning av gliadin fra hvete skjer via hydrolysering vha. pepsin, leucinaminopeptidase og elastase, som resulterer til opioidlignende peptider, inkludert GLIA-7. Videre nedbrytning av disse peptidene, som inneholder prolingrupper, er avhengig av enzymet DPPIV. Muligens DPPIV mangel eller inaktivitet kan resultere i flere GLIA-7 peptider som kan gi opphav til opioid liknende effekter. Gliadin fra matvarer har blitt påvist å gi overraskende høy substratspesifisitet for DPPIV sammenlignet med andre endogene DPPIV-substrater som glukagon og substans S. Studie av inhibisjon av DPPIV har vist at gliadin virker hemmende på DPPIV med henholdsvis 52%. Dette kan muligens forklare hvorfor mange pasienter med påvist CD er asymptomatiske. Inhibering av DPPIV ved gliadin resulterer i økte nivåer av ikke-metaboliserte gliadin molekyler som deretter hydrolyseres til GLIA-7 med opioid aktivitet.[3]

2.8 Dried blood spots (DBS)

Dry blood spot (DBS) er en analysemetode hvor blod samles på et papirkort og tørkes og deretter analyseres. Ideen om å samle blod på et papirkort oppsto i 1963 av Robert Guthrie.[54] Metoden var laget for å screene nyfødte barn som hadde tegn på funksjonshemming. I dag brukes DBS som en analytisk metode for nyfødt screening. Med nyfødt screening menes en undersøkelse av nyfødte barn hvor man tester for avvik eller medfødt sykdom hos barnet. [55] Alle nyfødte i Norge får tilbud om å bli undersøkt for 25 sjeldne sykdommer som det er viktig å starte behandling av så raskt som mulig. Tilbudet omfatter to endokrinologiske sykdommer, 21 metabolske sykdommer, alvorlig kombinert immunsvikt (SCID) eller andre alvorlige T-celledefekter og cystisk fibrose. [56]

DBS-samlingen er av stor interesse innenfor analyse på grunn av sine mange fordeler. DBS-prøvetaking krever bare en liten mengde blod 20-80 µl, noe som er gunstig for innsamling av blodprøver spesielt for spedbarn og for hyppig prøvetaking, som oppfølgingsbehandling. Vanligvis utføres en punktering i fingeren eller hælen med en lansett. Bloddråpet påføres i DBS paret (spot) på 12 mm (brukt i dette prosjektet) i diameter, som tar opptil 75-80 µl plasma eller fullblod, (se figur 9). Noen ganger blir hele spotten brukt til analyse, men vanligvis blir bare en del av spotten analysert. Da tar man enten en senter punch eller en punch i enden av spotten. Når bare en del av spotten tas ut, bruker man enten en manuell eller en automatpuncher. I denne prøven ble det brukt en manuellpuncher med 3.0 mm i diameter. [57]

Fordelene med å bruke DBS-prøver sammenlignet med ordinære plasma- og urinprøver, er enkelt og vennlig prøvetaking, enkelt lagring og transport. [54, 58, 59] Risikoen for infeksjoner for personalet i laboratoriet ved bruk av DBS sammenlignet med venøs prøvetaking ser også til å være redusert. Forskere har blitt optimistiske om de potensielle bruksområdene av DBS, og den har blitt brukt til en rekke kliniske verktøy som legemiddeltoksikologi og sportsdoping screening.



Figur 9: Viser til venstre DBS papir som er spottet med fullblod med peptidmiks. Til høyre ser man et eksempel på senterpunch.

Det er mange filterkort tilgjengelig for fullblodsinnnsamling. Egenskapene til de forskjellige typer filterpapirkortene som for eksempel materialetype, tykkelse og størrelsespore er med å påvirke adsorpsjonshastigheten og fordelingen av fullblod. Whatman 903 filter papirkort består av 100% cellulose og ble brukt i dette prosjektet. Dette er en av to korttyper godkjent av Food and Drug Administration (FDA). [54, 60]

Utfordringene med DBS er å sikre optimal en optimal opparbeidelsesteknikk av spotting av prøve, punching og ekstraksjon av prøvene. Når man jobber med fullblod vil forskjellige parametere i blodet som hematokritverdi, grad av hemolyse og antikoagulanttype (hvis den er påført) påvirke DBS. Hematokrit er anerkjent som den mest signifikante parameteren som påvirker DBS målinger. Tørketid, diffusjon og homogenisitet er utfordringene som oppstår når hematokrit er tilstedet, og dette kan påvirke både resultat og reproduserbarheten i prøvene. Hematokriteffekten er større når en senterpunch/hjørnepunch tas, i forhold for hele DBS-prøven. Metodevalidering av DBS prøver må til og ikke minst undersøkelser av virkningen av hematokritvariasjoner på måling for å kunne bruke en slik metode i stor skala [54, 61]

3. Metode

Peptider i vann, plasma, fullblod og DBS ble analysert med LC-MS. DBS-prøvene på sin side ble laget ved å avsette peptidløsninger i vann, plasma og fullblod på papirkort. Metodeutviklingen var todelt i denne oppgaven, hvor den første delen gikk ut på å videreutvikle og forbedre den eksisterende metoden slik at vi kunne oppnå en lavere deteksjonsgrense.[62, 63] Den andre delen gikk ut på å prøve ut DBS papir hvor det ble tilsatt både plasma og fullblod med spiket peptidblanding for å deretter se om vi klarer å ekstrahere og detektere peptider ved hjelp av LC-MS. Samtidig prøvde vi også forsøkene med DBS uten sitronsyre for å se om i kunne unngå å bruke sitronsyre.

Analyser av peptidblandinger i biologiske væsker som blod og plasma kan være krevende og dermed krever sensitive og robuste analysemetoder. Prøveopparbeidelse er også essensiell for analysemetoden da mengdene av peptider funnet i patologiske prøver er i størrelsesorden av omtrent 0,075 ng/ml-15000 ng/ml, se (tabell 9). Fullblod og plasma inneholder dessuten store proteiner, lipider, metabolitter, hematokritt (i fullblod) som kan påvirke utvinning av analyttene i prøvene under ekstraksjon. I selve separasjonen kan store proteiner tette LC-kolonnen og ødelegge den. Prøvens matrikskomponenter vil generelt kunne ha stor innvirkning på deteksjon og kvantifisering av analyttene. Disse forbindelsene er typisk en rekke endogene forbindelser (f.eks. metabolitter, proteiner eller lipider) eller eksogene forbindelser (alle substanser som påføres under prøveopparbeiding og analyse). [64]

Instrumentet som ble benyttet i denne oppgaven for å analysere peptidene var væskrokromatografi sammen med massespektrometri (LC-MS), for både separasjon og analyse. I denne oppgaven ble det brukt et «orthogonal acceleration time-of-flight» instrument, forkortet oa-TOF. Ulike MS-typer har imidlertid ulike egenskaper, som gjør at noen er mer egnet til kvalitative undersøkelser, mens andre er bedre til kvantitative. Denne oppgaven tar for seg hovedsakelig kvalitativ analysing av peptidene som er brukt, og oa-TOF er godt egnet til den bruken. Gullstandard for kvantitativ analyse i hehold til IUPACs anbefalinger er en trippel kvadrupol massespektrometeret (TQMS) som ikke ble benyttet i denne oppgaven. [65]

For at en metode skal kunne brukes i klinikken må den valideres. Analyttkonsentrasjoner i patologiske prøver kan være veldig lave, se (tabell 9). Det er derfor viktig at man utvikler en metode som oppfyller de krav man stiller til egnethet for tiltenkt bruk av metoden.

Tabell 9: Viser normale konsentrasjoner og patologiske konsentrasjoner av BCM-5 og BCM-7 i serum og urin

Peptid	Prøvetaking	Kons. i sykdom	Kons. i kontroll
BCM-5	Serum	> 15000 (ng/ml) ALTE [9]	30-1000 (ng/ml) [9]
BCM-7	Serum	4,7 ± 0,8 (ng/ml) ALTE [8]	1,6 ± 0.3 (ng/ml) [8]
BCM-7	Urin	75 ± 10 (pg/ml) autisme [2]	58 ± 7 (pg/ml) [2]

3.1 Prøveopparbeidelse

Når man jobber med biologiske prøver som fullblod, plasma eller serum så er det oftest fullblod som tappes først (venetapping). Derfra bearbeider man fullblodet til enten plasma eller serum etter det man ønsker. For analyse av plasma ble det brukt rør med tilsatt EDTA (etylendiamintetraacetat) som antikogulant. Deretter sentrifugerer man blodprøvetakingsrøret for å skille blodlegmene fra plasmaet. Plasmaet vil man pipettere ut og gå videre med. For serumprøver blir det ikke benyttet antikoagulant ved tapping av fullblod. Det er viktig at blodet får tid til å koagulere i 30-60 minutter før man begynner å sentrifugere. Når blodet har koagulert, sentrifugerer man prøven og vil se at koagelet vil synke til bunns og en klar væske vil være øverst som vil være serumet. [66]

Valg av analyse av plasma eller serum har sine fordeler og ulemper. En fordel med å bruke plasma fremfor serum som matriks for bioanalyse er at plasma inneholder flere proteiner. [34] Dette kan skyldes koagulasjonsprosessen når man skal produsere serum. Her er det ikke utenkelig at proteiner og peptider "fanges" i koagelen og blir fjernet ved sentrifugering. Plasma vil således være bedre å måle på enn serum, da små peptider i stor grad kan være proteinbundet og dermed tapes under koaguleringen. Serumprøver blir på den andre siden generelt noe "renere" enn plasma siden noe av proteinene samt koagulasjonsfaktorer blir fanget opp i koagelet. Serum kan dermed være fordelaktig å velge når man jobber med andre stoffer enn proteiner og peptider. [66]

Fullblod består av bla. blodplasma og tre typer blodceller: røde blodceller (erytrocytter), hvite blodceller (leukocytter) og blodplater (trombocytter). Det kan være veldig krevende å jobbe med fullblod grunnet koagulasjonsprosessen og hematokriteffekter på peptidene.

Effekten av hematokrit er den mest diskuterte temaet når det kommer til analyse av fullblod på DBS. Hematokritnivået kan variere og er avhengig av flere faktorer som kan påvirker de røde blodcellene. Et eksempel er hydrering og dehydrering. Når volumet av vann i kroppen minker (dehydrering), øker prosentvolumet av hematokrit, mens når volumet av vann er høy i kroppen vil prosentvolumet av hematokrit være lavere. Studier har indikert at arterielt blod har en litt lavere hematokritnivå enn venøst blod. Dermed vil det også ha betydning tapper blodet fra. [67]

Neste trinn i prøveopparbeidningen er proteinfelling. Fullblod og plasma inneholder mye proteiner og disse må fjernes før man kan analyserer prøvene i LC-MS. For å ikke tape våre peptider er det viktig å bryte bindinger mellom peptidene og proteinene før de utfelte proteinene sentrifugeres. Bindingene mellom peptider og de store proteinene i fullblod og plasma brytes ved bruk av maursyre og gjennom denaturering av proteinene. Tidligere oppgaver har påvist at tilsetning av maursyre i prøveopparbeidelsen øker gjenfinningsgrad av peptider. [62] Utfordringen er å velge et løsemiddel som feller ut de store proteinene, med maksimalt mulig gjenvining av analyttene. Løsemiddelet etter utfelling blir oppkonsentrert gjennom inndamping og deretter rekonstituert i mobilfasen.

Fokus for prøveopparbeidningen i denne oppgaven har vært å fjerne store proteiner. Ulike opparbeidningsteknikker og metoder ble undersøkt og sammenlignet. Den lipofile fraksjonen av prøvene ble lagt mindre vekt i denne oppgaven på grunn av begrenset tidsrom. Et problem med lipidfraksjonene er at det kan gi opphav til betydelig ionesuppresjon. Salter i høy nok konsentrasjon kan også føre til ionesuppresjon og fosfolipider kan felle ut i kolonnen. Hvis man ønsker å fjerne den lipofile fraksjonen

kan omvendt-fase ekstraksjon testes ut, der sorbenten er hydrofob. Lipider adskilles fra analytten ved hydrofobe interaksjoner mellom lipid og sorbent.

3.1.1 Dipeptidyl peptidase-4 (DPPIV)

Dipeptidyl peptidase-4 (DPPIV) er et nedbrytningsenzym som spalter ned lange aminosyrekjeder til kortere kjeder og frie aminosyrer. Denne peptidasen finnes i store mengder når man jobber med biologiske prøver som fullblod og plasma. DPPIV bryter ned spesifikt prolin og alaninaminsyrene i andreposisjon fra N-terminalen i oligo- og polypeptider. [68]

En bachelorgruppe ved HiOA (nå OsloMet) testet ut ulike syrer for å se hvilken syre som best hemmet DPPIV i blodet. Syrene som ble testet ut var benzosyre, sitronsyre og eddiksyre. De kom frem til at sitronsyre med konsentrasjon 0.075M i matrisks ga lite til ingen tegn til hemolyse, samtidig som det ga effektiv inhibering av peptidasene. Lavere konsentrasjoner ga lavere gjenfinningsgrad i MS, noe muligens skyldes at det fortsatt var peptidase aktivitet. Konsentrasjoner høyere enn 0.075M førte til hemolyse. Det er viktig at sitronsyre løses i NaCl-løsning (salin) på grunn av forskjell i osmotisk trykk ved bruk av destillert vann, som vil føre til at blodet hemolyserer. Fullblod og plasma med tilsatt sitronsyreløsning 0.075M har en pH på omtrent 4. DPPIV-enzymet ved pH 4 vil bli denaturert på grunn av ionisering av sidegruppene. [69]

3.1.2 Standard proteinfelling

Proteinfelling er en svært utbredt teknikk som benyttes ved opprensing av biologiske prøver som fullblod og plasma. Ved proteinfelling denatureres de store proteinene. Denaturering vil si at den tredimensjonale strukturen til proteinet ødelegges og dette fører til at proteinene sedimenterer ned til bunn.

Proteinene som befinner seg i fullblod og plasma har en komplisert tredimensjonal struktur, mens oligopeptider slik som peptider i denne oppgaven, ikke har det. Den tredimensjonale strukturen gjør proteinene mer løselig i blodet. Ved å ødelegge den tredimensjonale strukturen til proteinene vil løseligheten endres drastisk og proteinene vil felles ut, mens for våre peptider vil være upåvirket. Løsningsmidlene reduserer løseligheten av de store proteinene ved at molekylene går inn i peptidstrukturen og ødelegger inter- og intra molekylære interaksjoner, og proteinene felles ut. Man kan benytte ulike løsningsmidler for å separere store proteiner fra peptider. Peptidene kan være bundet til proteiner under proteinfellingen, som dermed feller peptidene med seg. Det tilsettes derfor også 0,1% maursyre i fellingsreagensen. Dette medfører til at binding mellom plasmaproteiner og våre peptider brytes og man får mest mulig analytt med seg videre til analysering.[62]

Organiske løsningsmidler som acetonitril (ACN) og metanol (MeOH) blir oftest anvendt til proteinfelling. Tilsetting av løsningsmidler fortynner naturligvis prøven, noe som kan kreve en oppkonsentrering før analysen. Tidligere studier har vist at ACN i forhold 3:1 i plasma har vist å gi best proteinfelling og høyest gjenvinningsgrad av peptider. [70, 71]

3.1.3 Resprep PPT³ 96-brønnplater (RESTEK)

Resprep PPT³ 96-brønnplater (RPPT) ble utprøvd under prøveopparbeidelsen for å gjøre proteinfelling. RPPT brønnplater er laget av polypropylen, og tilbyr en effektiv måte å fjerne proteiner fra plasma og serumprøver. RPPT består av en dobbel membran med ulik porøsitet i hver membran. Membranene hindrer brønnplaten fra å tette seg under filtreringen, som igjen tillater en hurtigere filtrering. [72] Prinsippet bak RPPT er den samme som ved en standard proteinfelling. Brønnplatene tilsettes en proteinfellingsreagens og deretter plasma. Deretter blandes reagensene i brønnplatene på en ristemikser, før prøven ekstraheres ved hjelp av en vakuummanifold. Utfelte proteiner holdes i gjen i brønnplaten. Fordelen med RPPT er at man slipper å pipettere supernatanten over til en ny beholder (unngår tap av analyttene). Prosedyren er enkel, gir effektiv opprensing og krever mindre tid i forhold til en standard proteinfellingprosess.

3.1.4 Prøveopparbeidelse av dry blood spots (DBS)

DBS papiret som ble brukt i dette prosjektet var Whatman 903 som består av 100% cellulose. Dette er en av to korttyper godkjent av Food and Drug Administration (FDA). [73] Man kan spotte analytter i fire uavhengige områder på papiret som er 12 mm i diameter, der hvert område tar omtrent 75-80 µl fullblod. Ette påsetting skal pørvekortet settes til tørking i minst 2 timer, før punching av prøvene. Store proteiner felles ut på papiret, mens analyttene ekstraheres ved å bruke et velegnet løsningsmiddel. MeOH og ACN ble brukt som ekstraksjonsmidler i tidligere studier, men MeOH har vist å gi en bedre gjenfinningsgrad av analytter.[74, 75] I denne oppgaven ble det anvendt 80% MeOH i vann med 0,1% FA. Denne metoden er basert på tidligere oppgave gjort på DBS der man skulle analysere metabolitter. Denne metoden er godt egnet til analysering av metabolitter og er anvendt i Ullevol sykehus.[76] Hvor egnet denne metoden var for peptidene i denne oppgaven er usikkert, og man må muligens optimalisere den. På grunn av begrenset tid ble det ikke mulig å optimalisere den anvendte metoden.

3.2 Væskekromatografi (HPLC)

Væskekromatografi (HPLC) er en teknikk i analytisk kjemi som brukes til å separere, identifisere og kvantifisere komponenter i en blanding. En HPLC-instrument består vanligvis av to eller flere løsemiddeltanker (resorvar), pumpe, injektor, kolonne, detektor og et datasystem, se (figur 10). Resorvaret består av mobilfaser.[77] I denne oppgaven ble det brukt vann og ACN hvor begge var tilsatt 0,1 % FA. Pumpen leder mobilfasen i en gitt strømhastighet (flow rate) inn til kolonnen. Analytten blir injisert i mobilfasen ved hjelp av en injektor, og prøveforbindelsene separeres av kolonnen fylt med stasjonærfase. Analyttene speareres fra hverandre basert på deres interaksjon med stasjonær fasen. Hvor stoffer som har svak interaksjon med stasjonærfasen elueres tidlig, mens stoffer som har sterk interaksjon blir holdt igjen lengre og elueres på et senere tidspunkt. Forbindelsene detekteres av en detektor og signalene visualiseres som en funksjon av tiden og presenteres som et kromatogram. Datasystemet styrer instrumentasjonen og håndterer dataene.[77]



Figur 10: LC-MS instrumentet som ble benyttet i denne oppgaven hvor de forskjellige delene er: 1. mobilfasereservoar, 2. pumpe, 3. autosamplere, 4. kolonne, 5. detektor

3.2.1 Stasjonærfaser

Det finnes flere forskjellige separasjonsprinsipper i HPLC. Den stasjonære fasen som benyttes vil være avgjørende for hvordan forbindelsene vil separeres. Silika er det mest brukte materialet til å forberede stasjonære faser i HPLC, som danner sfæriske porøse partikler med jevn partikkelstørrelse. Silisiumdioksidet kan anvendes som en stasjonær fase, eller som bærer for funksjonelle grupper som er kovalent bundet til overflaten. Normal-fase-kromatografi bruker polar stasjonær slik som silika, alumina og ulike silikaderivater. Polare forbindelser vil retare mest i dette tilfellet. Hydrofilisk interkasjonsvæskerkromatografi (HILIC) bruker polar stasjonær fase som i normal fase men med delvis polar mobilfase også som f.eks MeOH og ACN. I HILIC vil de polare forbindelser være mest retardert. Omvendt fase væskerkromatografi er den mest brukte separasjonsprinsippet i HPLC. Her benyttes stasjonær fase som er upolare som f.eks. oktyl (C₈) og oktadekyl (C₁₈) og polare mobilfaser typisk bestående MeOH og/eller ACN samt vann. Her er de ikke-polare forbindelser som blir mest retardert på kolonnen. [77, 78]

3.2.2 Faktorer som kan påvirke separasjon i HPLC

Hver forbindelse i prøven vil reagere forskjellig med den stasjonære fasen og mobilfasen basert på deres fysiske og kjemiske egenskaper. Separasjonen er derfor styrt av blant annet likevektskonstanten, K som uttrykkes ved følgende måte:

$$K = \frac{C_{sp}}{C_{mp}} \quad (1)$$

Hvor, C_{sp} er konsentrasjon av analytt i stasjonærfasen og C_{mp} er konsentrasjonen av analytt i mobilfasen.[34]

Er likevektskonstanten høy, betyr det at konsentrasjonen av analytt i stasjonærfasen er høyere enn i mobilfasen, dvs. at det er sterke interaksjoner mellom analytten og den stasjonære fasen. Dette vil

resultere lengere elueringstider for analyttene. Forbindelsene separeres med tid som faktor, og forbindelser med høy affinitet til den stasjonære fasen vil bli sterkt tilbakeholdt og dermed elueres sent fra kolonnen. Tiden en analytt oppholder seg i separasjonskolonnen (retensjonstid) påvirkes av mange faktorer, som interaksjonen mellom analyttene og stasjonærfasen, løsningsmiddelvalg og løsemiddelstyrke, kolonnedimensjoner og mobilfasehastigheten.[34] Retensjonsfaktor (k) er en parameter som er avhengig av disse faktorene og uttrykkes på følgende måte:

$$k = K \times \frac{V_{sp}}{V_{mp}} \quad (2)$$

Hvor K er likevektskonstanten i henhold til analyttkonsentrasjon i stasjonærfase i forhold til mobilfase (se formel 1), V_{sp} er volum av stasjonærfase i separasjonskolonnen og V_{mp} er volumet av mobilfase i separasjonskolonnen. Hvis volumforholdet mellom stasjonærfase og mobilfase i kolonnen økes, så vil retensjonsfaktoren øke proporsjonalt.[34]

Et av hovedmålet i HPLC-analyser er å separere analytter med et optimalt oppløsningsevne. Med oppløsningsevne menes hvor godt to analytter, som elueres etter hverandre, er separert fra hverandre. En oppløsningsverdi på 1,5 eller høyere mellom to topper vil sikre at prøvekomponentene er godt separerte (grunnlinjeseperasjon).[77, 79] Oppløsningsevne beregnes ved å måle retensjonstidene til 2 nabotopper og deretter dividerer det med den gjennomsnittlige toppbredden til toppene ved grunnlinjen, ved følgende formel:

$$RS = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 \times (W_{b1} + W_{b2})} \quad (3)$$

Hvor t_R er retensjonstidene til toppene og W_b er toppbreddene ved grunnlinjen.

Det er 3 viktige forhold som kan påvirke oppløsningsevnen som er vist ved følgende formel:

$$RS = \frac{1}{4} \sqrt{N} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{1 + k} \quad (4)$$

α er separasjonsfaktoren. Separasjonsfaktoren er et mål på hvor godt 2 topper er separert fra hverandre. Det kan igjen beskrives ved:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} = \frac{k_2}{k_1} \quad (5)$$

Teoretisk sett kan ikke α være lik 1, da vil 2 analytter elueres til samme tid. Jo større α er, desto bedre separasjon.

k beskriver den gjennomsnittlige retensjonsfaktoren til nabotoppene. Høy k -verdi indikerer at analyttene retarderes lenge på stasjonærfasen. Retensjonsfaktoren bør ikke være for høy eller lav for å oppnå optimal separasjon. Verdi under 1 indikerer at separasjon ikke er godt nok, og kan eventuelt elueres med andre komponenter eller mobilfase. Høyest oppløsning oppnås når k verdi er mellom 1-10, eventuelt opp til 20 for mange analytter.[80]

N er antall teoretiske plater og er et mål for båndspredningen på HPLC-kolonnen, som reflekterer kolonnens effektivitet. Flere plater betyr mindre spredning, smalere topper og en bedre separasjon. En «plate» er den strekningen langs kolonnen som trengs for at det skal innstilles likevekt mellom analytt i

mobil- og stasjonærfasen. Platene er et mål på kolonneeffektivitet, enten ved å angi antall teoretiske plater i en kolonne, N (jo flere plater jo bedre), eller ved å angi platehøyde (jo mindre jo bedre). Platenes effekt kan forklares gjennom Van Deemter-ligningen:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \times u \quad (6)$$

hvor u er gjennomsnittshastigheten til mobilfasen (ml/min). A , B og C er faktorer som bidrar til båndbredde.[80]

A beskriver Eddy diffusjon; mobilefasen beveger analytter gjennom en pakket stasjonærfase. Analytter i mobilfasen vil tilfeldigvis ta forskjellige veier gjennom den stasjonære fasen og føre til båndspredning fordi forskjellige veier gir forskjellige lengder.

B Longitudinal diffusjon; Det vil være høy konsentrasjon i sentrum av analytten. Analysen diffunderer ut fra senteret der det er høy konsentrasjon til hvor det er lavt. Dette fører til båndspredning. Hvis hastigheten til mobilfasen (u) er høy, tilbringer analytten mindre tid på kolonnen, noe som reduserer diffusjon og dermed båndbredde.

C Motstand mot masseoverføring; Analytten tar en viss tid for å likestilles mellom den stasjonære og mobile fasen. Hvis hastigheten til mobilfasen er høy, og analytten har en sterk affinitet til den stasjonære fasen, vil analytten i mobilfasen bevege seg foran analytten i den stasjonære fasen, skape båndbredde. Jo høyere hastighet (u), jo større båndbredde.[80]

3.2.3 Isokratisk og gradient eluering

Analytter kan elueres ut av separasjonskolonnen ved isokratisk- eller gradient eluering. Ved isokratisk eluering er har mobilfasen samme sammenasetning og løsemiddelstyrke under elueringen. Mens ved gradienteluering endres mobilfasesammensetningen underveis i elueringen. Isokratisk eluering benyttes for prøver hvor det ikke er for stor forskjell mellom første og siste analytt som skal elueres fra separasjonskolonnen. Gradienteluering velges når det er stor forskjell i retensjon til analytter som elueres først og sist fra separasjonskolonnen. For komplekse prøver, som plasma, er ofte gradienteluering nødvendig for å skille analyttene fra matriksforbindsler. [81]

Man bestemmer type eluering ved å kjøre en testgradient fra lav til høy løsemiddelstyrke, og deretter bruke følgende formel:

$$\frac{\Delta t_R}{t_g} \quad (7)$$

Hvor Δt_R er differansen mellom den første og siste toppen. t_g er den totale gradienttiden i analysen. Hvis $\Delta t_R/t_g > 0,4$ er gradienteluering anbefalt, verdi under 0,25 betyr at isokratisk eluering er mest hensiktsmessig.

Når man vet at man skal bruke gradienteluering, kan toppkapasitet beregnes for å sjekke kolonnens effektivitet og separasjonsevne. Toppkapasitet er et teoretisk mål på hvor mange topper man klarer å adskille i løpet av en gradienttid, når R_s er lik 1.[82] Toppkapasitet beregnes etter følgende formel:

$$P_C = 1 + \frac{t_g}{\bar{w}_b} \quad (8)$$

Hvor t_g er gradienttid i prøven og \bar{w}_b er gjennomsnittlig bredde av toppene (målt som 4σ -bredder) som elueres i løpet av gradienten. En høy verdi for P_C indikerer høy separasjonsevne.[82]

3.3 Massespektrometri (MS)

Massespektrometri (MS) er en analytisk teknikk som separerer forbindelser i gassfase basert på deres masse til ladet form (m/z) ved bruk av et elektrisk og / eller magnetfelt. Et massespektrometer består av en ionekilde, masseanalysator og en detektor. I denne oppgave ble det brukt elektroprayionisasjon ESI) som ionekilde. Her foregår det en ioniseringsprosess som fører til at analytten går fra væskefase til gassfase og blir enten protonert eller deprotonert. I masseanalysatoren skilles de deretter ulike ionene fra hverandre ut i fra deres masse til ladete form(m/z). Etter at ioner med en bestemt masse (m/z) har passert gjennom masseanalysatoren, vil de treffe en detektor. Ionestrålen vil da gi opphav til en signaltopp, og etter hvert som et masseområde skannes, vil nye ionetopper registreres i detektoren som funksjon av m/z . Hvor godt signaltoppene til de ulike ionene er adskilt, er avgjørende for ytelsen til massespektrometeret. Ytelsen til et massespektrometer kan beskrives ved hjelp av oppløsningsevnen og massenøyaktigheten. [77, 83]

3.3.1 Oppløsningsevne

Oppløsningsevnen beskriver instrumentets evne til å skille ionemassene fra hverandre. Tradisjonelt er oppløsningsevnen R_s definert ved å betrakte to nabo-massetopper i et massespekter som har lik intensitet og med 5 % toppoverlapp ("10 % valley"):

$$R_s = \frac{m}{\Delta m} \quad (9)$$

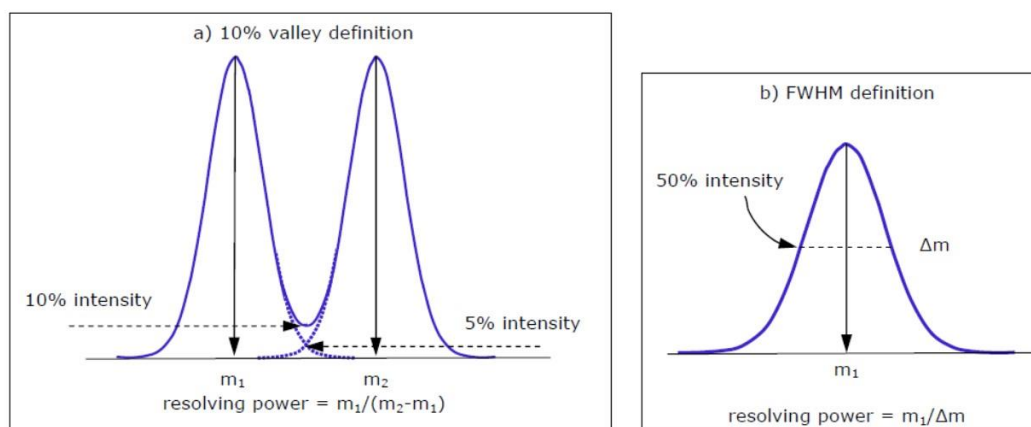
m (massen, m/z) til det minste av de to nabo-ionene, mens Δm er forskjellen i m/z mellom de to nabotoppene. Eksempelvis vil oppløsningen for et ion med masse (m/z) 1000 som separeres fra et «naboion» med en masseforskjell lik 0,1, være lik 10 000 ($R_s = 1000/0,1$). [83]

En nyere definisjon av oppløsningsevnen tar utgangspunkt i toppens masse (m/z) og toppbredden målt ved halv topphøyde, $w_{0,5}$:

$$R_s(FWHM) = \frac{m}{w_{0,5}} \quad (10)$$

Denne måten å beregne oppløsningen på er mye brukt i dag, og den omtales gjerne som FWHM metoden. FWHM står for «Full Width Half Maximum» - altså toppbredde målt ved halv topphøyde.[83]

Eksempelvis vil en topp med masse (m/z) 500,0 og toppbredde ved halv topphøyde lik 0,1, tilsvare en oppløsning på 5000 FWHM (dvs. $R_s = 500,0/0,1$).



Figur 11: Definisjoner av oppløsningsevne i massespektrometri: (a) er beregning av R_s ut fra to nabotopper, mens (b) er FWHM definisjonen.

3.3.2 Massenøyaktighet

Instrumentets massenøyaktighet kan på sin side beskrives med utgangspunkt i FWHM definisjonen. Hvis man antar at massetoppen følger en normalfordeling, vil toppens standardavvik, σ , kunne beregnes ut fra toppbredden $w_{0,5}$ ved bruk av følgende formel:

$$w_{0,5} = 2,35\sigma \quad (11)$$

Det er vanlig å angi massenøyaktigheten som det relative standardavviket uttrykt i ppm. Siden ca. 95 % av en normalfordelt topp ligger innenfor $\pm 2\sigma$, er massenøyaktigheten som regel oppgitt ved følgende formel:

$$Nøyaktighet (ppm) = \frac{2\sigma}{m} \times 10^6 \quad (12)$$

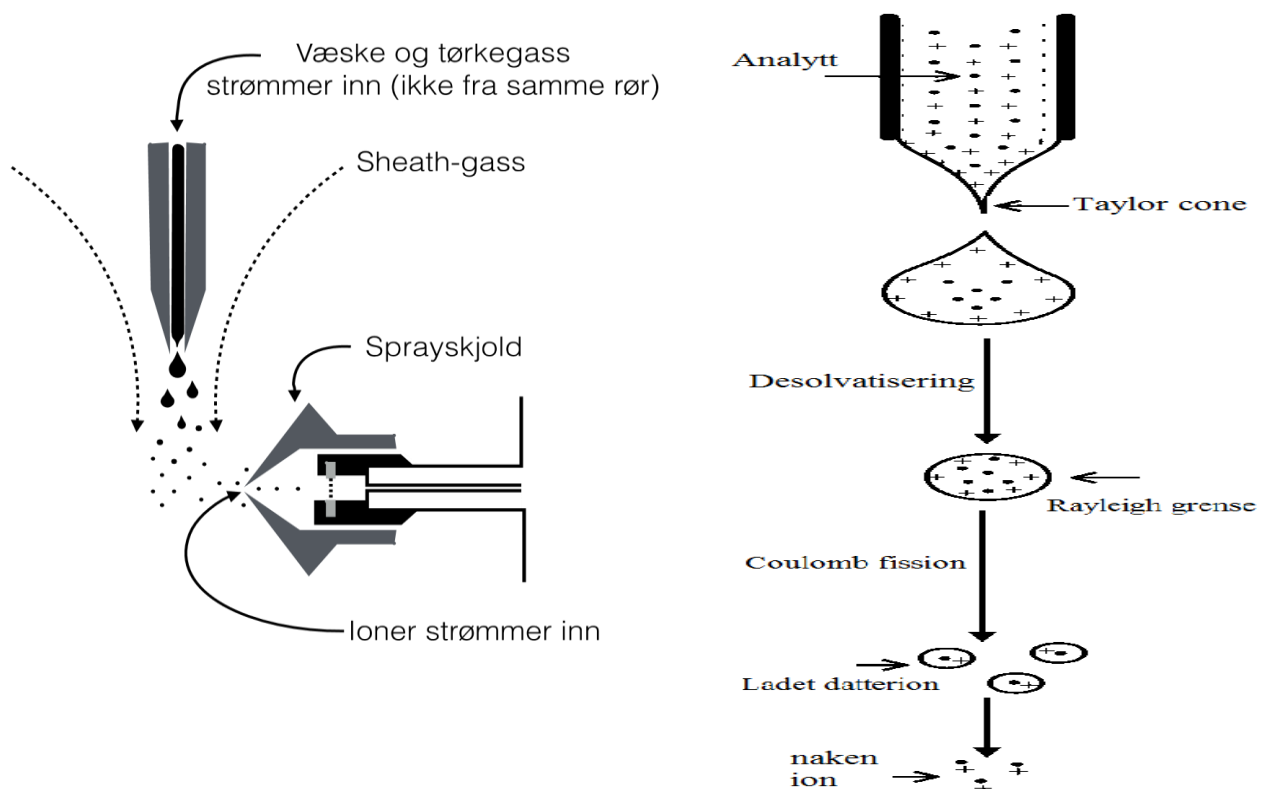
For et ion med masse (m/z) lik 1400 og standardavvik (σ) lik 0,04, kan massenøyaktigheten skrives som 57 ppm.[77]

3.4 Elektrosprayionisering (ESI)

Elektrosprayionisering (ESI) er en ioniseringsmetode som benyttes i når væskrokromatografi kombineres med massespektrometri. Metoden bringer ioner fra væskefase over til gassfase slik at massen kan bestemmes ved MS-analysatoren. Ioniseringen foregår enten gjennom en protonering (positive ioner) eller en deprotonering (negative ioner) og er derfor egnet forbindelser med sure- og eller basiske funksjonelle grupper. Justering av pH i mobilfasen er derfor av betydning for hvilke ioner av analytter en får av analyttene. ESI bruker elektrisk energi, høye temperaturer og pneumatisk assistert aerosoldannelse til å omdanne ioner fra væskefase til gassfase. Forholdet mellom masse og ladning (m/z) registreres og

brukes til å beregne massen til forbindelsen. Prosessen produserer ioner av forbindelser uten å fragmentere dem, og kalles derfor for en mild ioniseringsteknikk. [77, 84]

Den første prosessen under ESI er å produsere ioniserte dråper. Væsken som kommer fra HPLC-kolonnen bestående av mobilfase og analytt føres gjennom en tynn spraynål (forstøver). Inne i spraynålen føres det en varm nitrogengass som skal hjelpe til med forstøving og fordampning av løsemidlet slik at analyttene går over til ionisert form. Forgassing av prøven fører til at væsken omdannes til en spray av små væskedråper ved utgangen av spraynålet. På spissen av spraynålen dannes det en kjegleformet væskemenisk (Taylor cone), se (figur 12). Ladningstettheten inne i dråpen øker med fordampning av væsken, og når det overstiger en grense (Rayleighs grense), blir menisken såpass ustabil at det dannes en væskestråle som fordamper og gir opphav av flere små dråper. Fra dette stadiet går dråpene gjennom en prosess kalt, "Coulomb fission". Dråpene sprekker opp og det dannes mindre og mindre dråper for å stabilisere stresset (frastøtningen) mellom ladningene på overflaten. Ved hjelp av en tørkegass (N_2) reduseres størrelsen på dråpene ytterligere. Hastigheten og temperaturen på tørkegassen kan enten økes eller reduseres for å forbedre fordampningseffekten. Til slutt vil det elektriske feltet innen hver av dråpene nå et kritisk punkt, hvor det er mulig for ionene å komme ut av dråpene til å bli et «nakent ion» og gå videre til gassfase. [77, 84, 85]



Figur 12: Til venstre viser ESI instrumentet, hvor mobilfase med analytt blir desolvatisert. Man ser at sheatgass fra begge sider av spraynålen konsentrerer analytt videre til kapillære. Til høyre ser man i detalje hva som skjer under desolvatiseringen i ESI før analytten går inn i kapillæren (illustrert fra agilent[62, 86].

Avhengig av analyttens kjemiske egenskaper velges det mellom positiv eller negativ ionemodus i akkvisisjon (ESI+/ESI-). Peptidene som har blitt analysert i denne oppgaven har alle mulighet for å bli positivt ladet ved aminogruppen i surt miljø, derfor er det benyttet positiv ionemodus. Da har det blitt tilsatt t 0,1% FA i mobilfasen slik at analyttene er på forhånd protonerte. Når man analyserer i positiv modus, vil kapillærspenningen (Vcap) ha et negativt potensial slik at den tiltrekker de positive ionene til analytten. Kapppegass temperaturen, kapppegass hastighet, kapilærespenning og nebulizer trykket er viktige parametere som avgjør desolvatisering og overføring av ioner til gassfase. Agilent Jet Stream har parameteren kapppegass, hvor hovedmålet er å desolvatisere mobilfasen fra analytene slik de er ioniserte. Samtidig har kapppegassen en annen funksjon hvor den skal fokusere ionene videre til kapilæren slik at mest analytter blir detekter i MS. Generelle anbefalte områder for ESI er angitt i (tabell 10). Disse parameterne kan videre optimaliseres for å få mest mulig analytt videre til gassfase og videre til detektoren.[83, 84]

Tabell 10: Viser en oversikt over de viktigste parameterne under optimalisering av ESI[62]

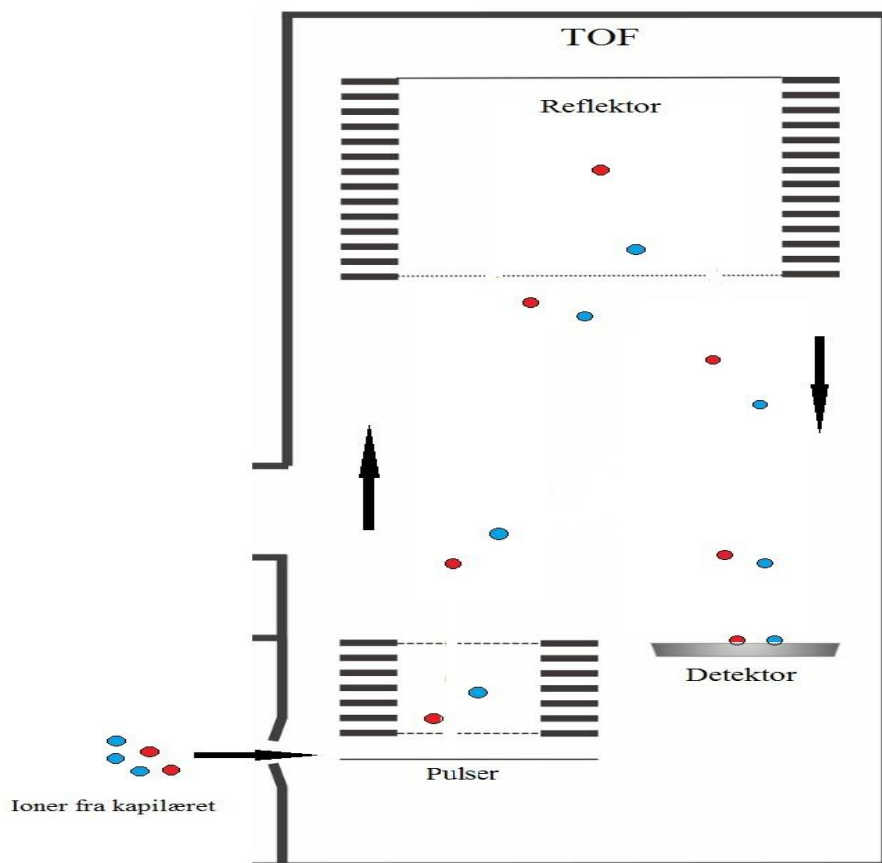
Standard område i Masshunter	Økning, (område)
Kapppegass temperatur (325°C)	50°C, (250-400)
Kapppegass hastighet (10 L/min)	2L/min, (8-12)
Nebulizer trykk (40psi)	5psi, (25-50)
Kapilærespenning (Vcap) (3500V)	500V, (2500-4500)

3.5 Masseanalyser

Analyse av masser på en MS-instrument kan gjøres ved forskjellige teknikker. Vi har i denne oppgaven brukt et oa-TOF instrument. Analysen som gjøres i oa-TOF utføres under svært lavt trykk for å unngå kollisjoner mellom analyttioner og molekyler fra luften. For å opprettholde det lave trykket må instrumentet være tett samtidig som luft pumpes ut av systemet ved hjelp av en nitrogengenerator pumpe. Pumpen er koblet til ionekilden og masseanalyseren og sørger for at trykket i systemet er veldig lavt. Under arbeidstiden på labben var trykket bestandig under 4×10^{-7} torr.[34]

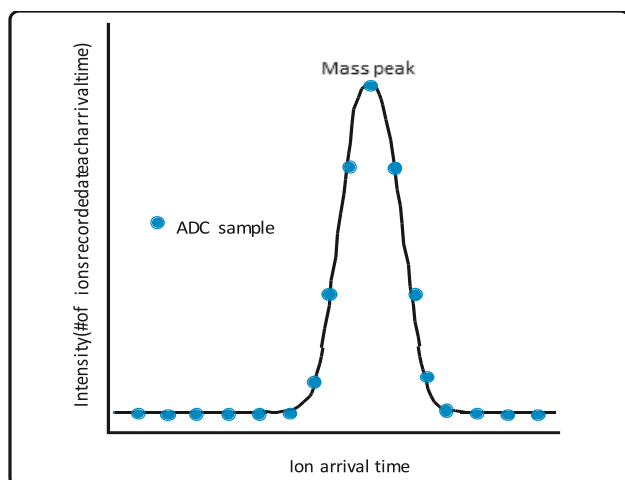
Etter at prøven har vært gjennom ionekilden og blitt desolvatisert og blitt til et fritt ion, vil disse ionene ledes inn i oa-TOF-en ved hjelp av et elektrisk felt. Det elektriske feltet kan være positivt eller negativt, etter behov. Ionene fra kapilæren beveger seg videre inn til TOF-en med en potensiell energi ved hjelp av elektisk spenning. Inni TOF-en påføres ionene kinetisk energi når de blir skytet oppover 90°, ved hjelp av en pulser.[77] Ioner med forskjellige masser vil ha forskjellige sveve tid i TOF-en, hvor tyngre ioner vil bevege seg langsommere enn lettere ioner. Alle ioner skal i prinsippet ha identisk kinetisk energi i det de begynner å bevege seg gjennom sveverøret, men en viss spredning i kinetisk energi er likevel ikke til å unngå ut fra pulseren. Dette korrigeres ved hjelp av en elektrostatisk linse som sitter i toppen av sveverøret. Det vil dermed si at ioner med samme masse, men med litt forskjellig hastighet føre til at ionene med størst hastighet går lengst inn i linsen, mens ionene med lavere hastighet går kortere inn i feltet. Ionene får ulik oppholdstid i reflektoren, noe som korrigerer for spredningen mellom ionene. se (figur 13).[83] På denne måten vil to ioner med forskjellig kinetisk, men samme masse, ankomme detektoren samtidig. MS-instrumentet registrerer tiden det tar fra ionet blir akselerert fra pulseren til den ankommer

detektoren. Avstanden ionene beveger seg i er kjent, og hastigheten kan dermed beregnes. Tiden som måles er også avhengig av molekylets ladning, det beregnes derfor m/z . Ut i fra disse parameterne kan programvaren fastslå molekylets massetall. Teknologien i dette instrumentet gir massene med høy oppløsningsevne. Dette tillater analyse av analyttenes masse med høy nøyaktighet og presisjon. Metoden egner seg derfor godt for kvalitative analyser.[83]



Figur 13: Viser en skisse av hvordan ioner inn i TOFen beveger seg. Her kan vi se at ioner med samme masse svever ulikt i TOF, men blir korigert i reflektoren (illustrert fra agilent[86])

TOF målinger baserer seg ikke på enkeltmålinger av ioner som pluserer av pulseren til detektoren, men i stedet er summering av signaler som kommer fra mange pulser. Hver gang en høyspenning påføres pulseren, registreres et ionespekter som kalles en enkelt transient. Dette legges til tidligere transienter inntil et totalt ionestrømskromatogram (TIC = totalione kromatogram). For analyser som krever en skannehastighet på ett spektrum per sekund, kan omtrent 10 000 transienter summeres før overføring av data fra instrumentet tilbake til vertsdatabasemaskinen som skal skrives til disk, se (figur 14). Hvis målprogrammet innebærer høyhastighetskromatografi (UHPLC), summeres færre transienter, og skannehastigheten må økes. Typisk innstilles det mellom 7070 og 20 000 transienter per sekund. Antall transienter vi kan måle per sekund er avhengig av mass området vi måler i. Når pulseren trigges venter den på at analytten med høyest masse har truffet detektoren før den trigges igjen på nytt. Dersom dette ikke hadde vært tilfelle og pulseringen hadde vært konstant, ville lette ioner fra den neste transienten kunne nå frem til detektoren før de tunge ionene. Dette hadde ført til overlapp av flere spektra. [87]



Figur 14: Viser datapunkter i TIC. Hvert punkt representerer en sum av transienter[87] (i vår tilfelle 10 000 transienter)

ESI-teknikken produserer et massespekter med relativt høy kvalitet. Dette gjenspeiles ikke nødvendigvis i TIC. Ekstraherte ionestrømskromatogrammer (EIC) er en viktig databehandlingsprosedyre i LC-MS baserte bioanalyser. Data som genereres fra ESI er som oftest støyete og inneholder et høyt antall signaler fra bakgrunnen. I et EIC blir en eller flere masser (m/z -verdier) fra de korresponderende analyttene "ekstrahert" fra et helt sett med data for hele LC-MS analysen. Den totale intensiteten av en analytt innen et massetoleranseområde rundt dets m/z plottes deretter ved hvert punkt i analysen. Databehandlingen ved bruk av EIC gir en unik selektivitet i oa-TOF-instrumentet.[87]

3.6 Detektor

Detektoren som ble benyttet i denne oppgaven er mikrokanalplatedetektor (MCP) som er koblet til oa-TOFen. Prinsippet bak MCP er ioneforrsterkning ved hjelp av sekundær emisjon. Mikroplaten består av mange separate mikrokanaler hvor hver av dem fungerer som en uavhengig elektronmultiplikator. Ionene vil treffe de separate mikrokanalene og derfra emitteres sekundærelektronene fra kanalveggene. Hver mikrokanal er dekket av et halvledermateriale som emitterer elektroner når partikler kommer i kontakt med den. Flere mikrokanalplater kobles i en serie som gir signalforsterkning. Avstanden mellom platene er korte, dette muliggjør rask respons i detektoren, noe som gjør denne typen detektor velegnet for TOFinstrumenter.[88]

3.7 Eksperimentell fremgangsmåte

3.7.1 Utstysrliste:

- HPLC-instrument: UltiMate 3000 Series
 - DIONEX UltiMate™ 3000 Series Pump (LPG-3400A)
 - DIONEX UltiMate™ WPS-3000TSL Autosampler
 - DIONEX UltiMate™ 3000 Column Compartment
- Massespektrometer Agilent Technologies TOF 6230
- HPLC-instrument: Agilent Technologies 1100/1200 series
- Kolonneovn (temperature Control Module). Leverandør Waters
- Pipetter (PIPETMAN Classic), Leverandør: Gilson
- Vorteksmikser (VORTEX-2), Leverandør: Scientific Industries
- Vorteksmikser (Reamix 2789), Leverandør Assistant
- Sentrifugeinndamper (CentriVap), Leverandør: Labconco
- Sentrifuge (Galaxy 16DH), Leverandør: VWR Collection
- Vakuumpumpe (Mini diaphragm VP 86), Leverandør: VWR Collection
- Resprep PPT3 96-Well Plates, Leverandør: Restek
- Whatman 903 Protein Saver card, Levrandør Sigma-Aldrich
- Thermomixer Comfort, Levrandør: Eppendorf

Programvarer:

- Agilent Masshunter Data Acquisition versjon B.05.00
- Agilent Masshunter Qualitative Analysis versjon B.05.00
- Chromeleon versjon 6.80 SP4, fra Thermo Scientific
- Agilent MassHunter Qualitative analysis versjon B.03.01
- Agilent Masshunter Data Acquisition for Triple Quad versjon B.03.01
- Agilent MssHunter Peptide Optimizer B.03.01
- Keynote versjon 6.5.3 (2151)

Tabell 11. Viser kjemikalieliste

Kjemikalie	Renhet (%) /kvalitet	Leverandør
Metanol	≥ 99,9	Merck
Acetonitril	≥ 99,9/ LC-MS kvalitet	Merck/ VWR Chemicals
HPLC-acetonitril (0,1 % FA)	LC-MS kvalitet	Merck
Maursyre	98,0/ 98,0-100,0	Sigma-Aldrich/ Merck
Sitronsyre	99,0	Sigma-Aldrich
HPLC-vann	LS-MS kvalitet	VWR Chemicals

Tabell 12. Viser rene peptidreferanser levert av Bachem

Peptid	Eksakt molekylmasse (g/mol)	Molekylformel	Renhet (%)	Peptid- innhold (%)
β-kasomorfin (1-3)	425,195	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₅	99,4	88,8
β-kasomorfin (1-4)	522,248	C ₂₈ H ₃₄ N ₄ O ₆	99,0	81,5
β-kasomorfin (1-4) amid	521,264	C ₂₈ H ₃₅ N ₅ O ₅	98,4	84,7
β-kasomorfin (1-5)	579,269	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₇	97,8	84,0
β-kasomorfin (1-5) amid	578,285	C ₃₀ H ₃₈ N ₆ O ₆	98,0	78,4
β-kasomorfin (1-7)	789,406	C ₄₁ H ₅₅ N ₇ O ₉	98,7	79,6
Gluteneksorfin C	591,327	C ₂₉ H ₄₅ N ₅ O ₈	97,0	81,0
Gliadorfin-7	875,418	C ₄₃ H ₅₇ N ₉ O ₁₁	96,0	83,3
Met-Enkefalin-arg-phe	876,395	C ₄₂ H ₅₆ N ₁₀ O ₉ S	97,8	89,0
Dermorfin	802,365	C ₄₀ H ₅₀ N ₈ O ₁₀	98,9	83,0
Deltorfin	954,409	C ₄₄ H ₆₂ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	98,7	81,0

3.7.2 Oppbevaring og lagring

Peptidene som ble brukt i tidligere oppgaver og i denne oppgaven ble bestilt fra Bachem. [62, 63] Stammløsninger på hvert enkelt peptider samt stamløsning av en blanding av alle peptidene ble laget og brukt til forsøkene i denne oppgaven. Stammløsningene ble oppbevart i 2 mL polypropylen sentrifugerør, med 1% maursyre (FA) i Milli-Q vann i konsentrasjon på 10 000 ng/ml. Propylenrør brukes fordi peptider har en tendens til å adsorberes på glassrør. [89] FA tilsettes for å øke peptidenes løselighet i vann. Ferdige stamløsninger ble deretter oppbevart i fryser ved -20 °C og brukt etter behov.

3.7.3 Blodprøvetaking

Blodprøver fra friske personer ble tatt på Bioingeniørutdanningen ved Oslomet. Det ble benyttet 4 ml EDTA rør til tapping av blodet som ble sentrifugert deretter, plasma ble pipettert over til nye rør og sitronsyreløsning 0,75 mol/L ble tilsatt plasma slik at total konsentrasjon av sitronsyre ble 0,075 mol/L. Det er viktig at total konsentrasjonen ikke overstiger 0,075M da det kan føre til hemolyse av blodlegemer. Sitronsyre ble tilsatt som peptidasehemmer for å forebygge nedbryting av peptider. Luminal peptidaser, som trypsin og kymotrypsin, har maksimal aktivitet ved $\text{pH} \geq 6,5$. [90] Plasma med sitronsyre ble oppbevart for videre bruk i fryser, ved - 20 °C.

Blodprøvetakingen ble benyttet enten til plasma eller som fullblod som ble tappet på 4 mL EDTA rør og deretter vendt et par ganger (omtrent 10-12 vendinger) opp og ned slik at fullblodet var godt blandet med antikoagulantet for å sikre at blodet ikke koagulerte. Prøvene ble deretter sentrifugert ved (1000 rpm/min) i 10 minutter. Plasmaet ble overført til et ny rør og sitronsyreløsning 0,75 mol/L ble tilsatt slik at total konsentrasjon av sitronsyre ble 0,075 mol/L. Deretter tok vi ny blodprøve der det ble tappet på 2 ganger 4 mL EDTA rør, uten sentrifugering. Den ene røret ble tilsatt sitronsyre dråpevis slik at den totale konsentrasjonen ble 0,075 M. Det er viktig at total konsentrasjonen ikke overstiger 0,075M for å unngå hemolyse av blodlegemer. Det andre røret med fullblod var uten sitronsyre, for å se om peptidasehemmereffekten har noe effekt på forsøkene med DBS. Fullblod og plasma med- og uten tilsatt sitronsyre ble oppbevart i fryser ved -20 °C.

3.7.4 Prøveopparbeidelse

I denne oppgaven ble 3 prøveopparbeidelsesteknikker testet ut. Disse var standard proteinfelling, proteinfelling ved hjelp av brønnplater og proteinfelling i DBS. Opparbeidelses metode med stadardproteinfelling og brønnplater ble brukt som referasne metode som skulle sammenliknes med opparbeiding og ekstraksojn med DBS. Målet var å sikre minst mulig tap av analyttene ved opparbeidelsesprosessen og for å se hvilken av de 3 metodene som ga best gjenfinningsgrad av de testede peptidene.

Plasma ble spiket med peptidblanding (totalt 11 peptider, se tabell 12) fra samme stamløsning. LC-MS veilene var laget av glass, innleggør av polypropylen ble derfor benyttet som et innlegg til glassveilene.[89] Peptidene ble analysert LC-MS etter opparbeided peptider ved standardproteinfelling, proteinfelling på brønnplater og proteinfelling ved DBS.

3.7.4.1 Standard proteinfelling

200 µL plasma med 0,075 M sitronsyre ble spiket med 50 µL spikemiks. ACN med 0,1% FA ble brukt som fellingsløsningsmiddel. Der forholdet var 3:1 (600:200 µL; ACN: plasma (v/v)). Blandingen ble deretter sentrifugert ved 12 000 rpm i 10 minutter. Etter sentrifugering utfelte proteiner på bunnen og supernatant øverst. Supernatanten blir pipettert ut over til et nytt 2 mL sentrifugerør og dampes til tørrhet ved 75 °C i 80 minutter. Prøven rekonstitueres i 200µL Milli-Q vann med 0,1% FA og sette på ultralyd vannbad i 10 minutter. 100 µL pipetteres til innlegsrør og plassert som et innlegg inni LC-MS vialen.[62, 70]

3.7.4.2 Proteinfelling på PPT3 96-brønnplate

Brønnplaten tilsettes først 600 µL acetonitril etterfulgt av 200 µL plasma og deretter 50 µL peptidblanding. Deretter dekkes blandingen med en forseglelsesmatte under ristingsprosessen for å unngå søl. Blandingen mikses på en vorteksmikser i 0,5-2 minutter ved 2000 rpm. Deretter kobles brønnplaten på en vakuummanifold der brønnplaten ble utsatt for vakuum ved 2-9 Hg i omtrent 5 minutter eller til man ser at supernatantet er fullstendig filtrert. Supernatanten dampes til tørrhet og rekonstitueres i samme prosedyre som for standard proteinfelling.[72]

3.7.4.3 Opparbeiding og ekstraksjon av DBS

Fullblod med- og uten 0,075 M sitronsyre, plasma med 0,075 M sitronsyre og Milli-Q vann med 0,1 % FA der alle var spiket med peptidblanding i konsentrasjoner 1000-2000 ng/ml ble spottet på DBS papir. Milli-Q vann med 0,1% FA med tilsatt peptider ble spottet med 20 µL på DBS, der det også ble tatt blindprøver bestående av bare Milli-Q vann og 0,1% FA for å se effekter av DBS papir. Fullblod med spike ble spottet ved 50 µL og det samme gjelder for plasma. Grunnen til volumforskjell i spotting mellom vann, plasma og fullblod var viskositet. Det ble observert at mer en 20 µL vann førte til at spredningen av væsken gikk ut av spotte-området som var 12 mm. Mens viskositeten til fullblod og plasma tillot høyere spottevolum. En annen grunn til høyere volum tilsatt i fullblod og plasma var å sikre at man fikk peptider med seg videre til LC-MS siden plasma og fullblod består av komponenter som proteiner og hematokritt som kan påvirke hvor mye peptid som blir ekstrahert ved ekstraksjonsprosessen.

Etter spotting skal DBS papiret legges til tørking i egen manifold i minst 2 timer ved romtemperatur.[54] Hvis man skal oppbevare DBS papir over lengre perioder, skal det oppbevares i +4 °C til -24 °C. Studier viser til at DBS papir kan oppbevares ved disse temperaturene opptil 30 år. [91]

Etter tørking ble DBS papiret punchet med en manuellpuncher der en punch tilsvarte 3 mm. For hver spot så ble det punchet 6 puncher for å sikre at det var nok peptider som kom videre til LC-MS. Det ble prøvd single puncher hvor vi punchet en gang i sentrum av spotten eller ytre kanten av papiret. Dette ble gjort for å se hvordan peptidene var distribuert på papiret. Men hverken punch i sentrum eller ved ytre kant ble vellykket på grunn av lite peptid overføring til LC-MS. 6 puncher av blodspots ble plassert inni 2 ml propylen-sentrifugerør og ekstrahert med 200 µL ekstraksjon-midlet metanol og vann med tilsatt 0,1 % FA (Forhold 80 MeOH: 20 vann). Ekstraksjonsløsningen ble deretter satt på termomikser ved 700 rpm i 45 minutter ved 45°C. Deretter ble løsningen overført til en ny 2 ml propylen sentrifugerør. Løsningen ble

addert til inndamping i samme prosedyre som for standard protein felling og deretter analyser ved LC-MS.[76]

3.7.5 Metodeutviklingen for HPLC-MS

Metodeutviklingen for HPLC-MS er delt i to der den første delen går ut på å finne en god HPLC metode for å detektere og separere peptidene, mens den andre delen går ut på å optimalisere MS parametere for å gi best mulig deteksjon av peptidene. Metodeutviklingen i HPLC er basert på arbeid som ble utført i denne forskningsgruppe, av tidligere studenter.

HPLC-instrumentet består av 3 aktive mobilfasekomponenter der mobil fase A og B ble brukt til separasjonsprosessen, mens C var en vaskeløsning. Sammensetningen av mobilfase A bestod av Milli-Q vann med 0,1 % FA og mobilfase B bestod av acetonitril med 0,1 % FA. Vaskeløsningen i komponent C besto av 100% MeOH. For mobilfase A og B ble det tilsatt 0,1 % FA på grunn av ESI i MS kjøres ved positiv ioniseringen. Dermed fungerer FA som protondonor.

Ulike HPLC-kolonner er blitt testet ut i denne oppgaven (tabell 13). I denne oppgaven ble det benyttet to ulike kolonner, en C₁₈ og en C₈. Kolonnene skiller seg fra hverandre indre diameter (Id) hvor C₈ har en id på 2,1 mm og C₁₈ har 3,0 mm. Det er også selvsagt forskjell i karboninnhold i de to kolonnen hvor C₁₈-kolonnen består av en mye lengre karbonkjede enn C₈-kolonnen. Ulike metoder har blitt kjørt for C₁₈ og C₈-kolonnene på grunn av ulik Id. 6 metoder ble utviklet for C₈ kolonnen og 6 metoder ble utviklet for C₁₈-kolonnen.

Tabell 13: Viser oversikt over separasjonskolonner som er brukt i denne oppgaven

Stasjonærfase materiale	Kolonne dimensjon (mm)	Partikkel størrelse (µm)	Porestørrelse (Å)	Produsent navn
C ₁₈	150 x 3,0	3	100	ACE
C ₈	150 x 2,1	3	100	ACE

Tabell 14: Oversikt over metodene som ble benyttet under HPLC-metodeutvikling av C₈-kolonne

C ₈ -kolonne fra ACE	Metode 1	Metode 2	Metode 3	Metode 4	Metode 5	Metode 6
Mobilfase B (ACN + 0,1 % FA)	100 % ACN	100 % ACN	100 % ACN	100 % ACN	100 % ACN	100 % ACN
Mobilfasehastighet (ml/min)	0,2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Injeksjonsvolum (µL)	5	5	5	5	20	20
Kolonnetemperatur (°C)	35	35	35	35	35	35
Ekvibreringstid før start (min)	3	5	5	5	5	3
Gradient 1	Mobilfase B (%)	15-40	20-35	15-35	20-30	20-30
	Gradienttid (min)	5	5	5	5	5
Gradient 2	Mobilfase B	40-90	35-90	35-90	30-90	30-90
	Gradienttid (min)	3	3	3	3	3
Holdes konstant ved 90% (min)	10	4	4	5	5	2
Total analyse tid (min)	24	15	15	17	17	15

3.7.5.1 Metodeutvikling C₈- kolonne (1-6)

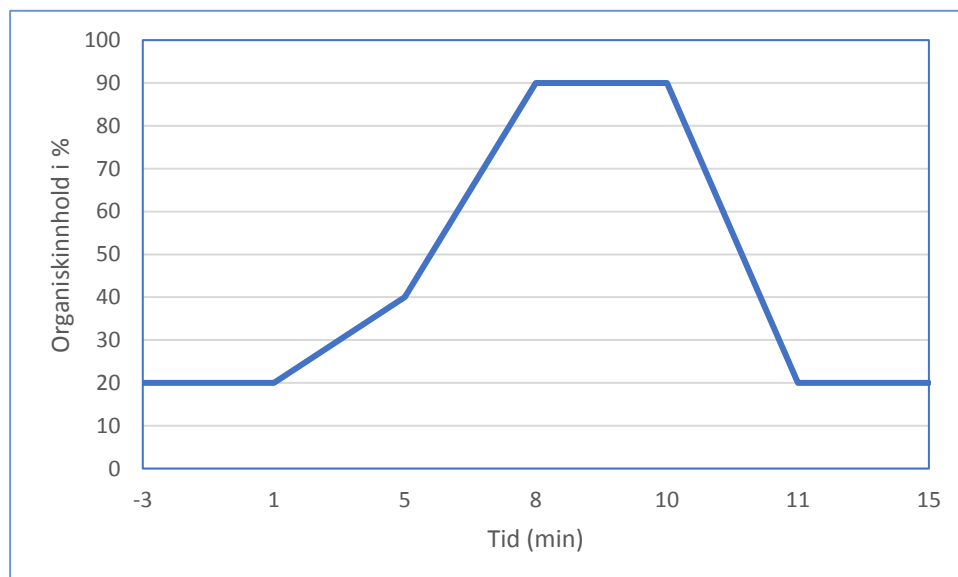
Metode 1 som ble kjørt var basert på tidligere analyser av peptider av studenter ved OsloMet.[62, 63] Dette brukte vi som utgangspunkt for å lage egen metode. Analysen startet med 15 % mobilfase B der det var en ekvilibrerings tid på 3 minutter før kjøring. Gradienten ble satt deretter fra 15% ACN til 40% i løpet av 5 minutter. Økning fra 40% til 90% tar 3 minutter, og mobilfasen holdes konstant ved 90% ACN i 10 minutter. Deretter brukes det 1 minutt før å få gradienten tilbake på 15% og det holdes konstant i 3 minutter før nesten kjøring.

(Tabell 14) viser en oversikt over de 6 metodene som ble utført. I metode 2 er mobilfasehastigheten økt til 0,25 ml/min og ekvilibrerings tiden økt til 5 minutter. Gradienten går fra 20 til 35 på 5 minutter og videre fra 35 til 90 på 3 minutter. Mobilfase B konsentrasjonen holdes på 90 % i 4 minutter.

Ved metode 3 senkes startkonsentrasjonen til 15 % og total analyse tid er 15 minutter.

Ved metode 4 er startkonsentrasjonen av mobilfase B satt til 20 %. Den bruker 5 minutter til å komme seg til 30 %. videre økes gradienten til 90 % og bruker 3 minutter på det, og holdes konstant på 90 % i 5 minutter. Totalanalyse tid ble 17 minutter.

Ved metode 5 er injeksjonsvolumet økt til 20 ul/inj, ellers er metoden den samme som metode 4. Ved metode 6 er ekvilibrerings tid satt til 3 minutter før kjøring ved 20% ACN. Gradient fra 20 % til 40 % tar 5 minutter og derfra økes gradienten til 90 % og det tar 3 minutter. Ved 90 % holdes det i 2 minutter konstant. Total analyse tid på metode 6 ble 15 min. (Figur 15) viser metode 6 der man ser organisk løsningsmiddel (ACN+0,1% FA) som funksjon av tid:



Figur 15: Viser innhold av organiskfase (ACN+0,1%FA) som funksjon av tid for metode 6

Tabell 15: Oversikt over metodene som ble benyttet under HPLC-metodeutvikling av C₁₈-kolonne

C-18 kolonne fra ACE	Metode 1	Metode 2	Metode 3	Metode 4	Metode 5	Metode 6	
Mobilfase B (ACN + 0,1 % FA)	100 % ACN	100 % ACN	100 % ACN	100 % ACN	100 % ACN	100% ACN	
Mobilfasehastighet (ml/min)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
Injeksjonsvolum (uL)	20	20	20	20	20	20	
Kolonnetemperatur (°C)	35	35	35	35	35	35	
Ekvibreringstid før start (min)	5	5	5	5	5	5	
Gradinet 1	Mobilfase B (%)	10-90	20-30	20-50	30-50	10-30	15-18
	Gradienttid (min)	30	5	8	8	5	5
Gradient 2	Mobilfase B	-	30-90	50-90	50-90	30-90	18-30
	Gradienttid (min)	-	8	5	5	8	3
Gradinet 3	Mobilfase B	-	-	-	-	-	30-90
	Gradienttid (min)	-	-	-	-	-	3
Holdes konstant ved 90% (min)	5	5	4	5	10	3	
Total analyse tid (min)	40	25	25	25	30	18	

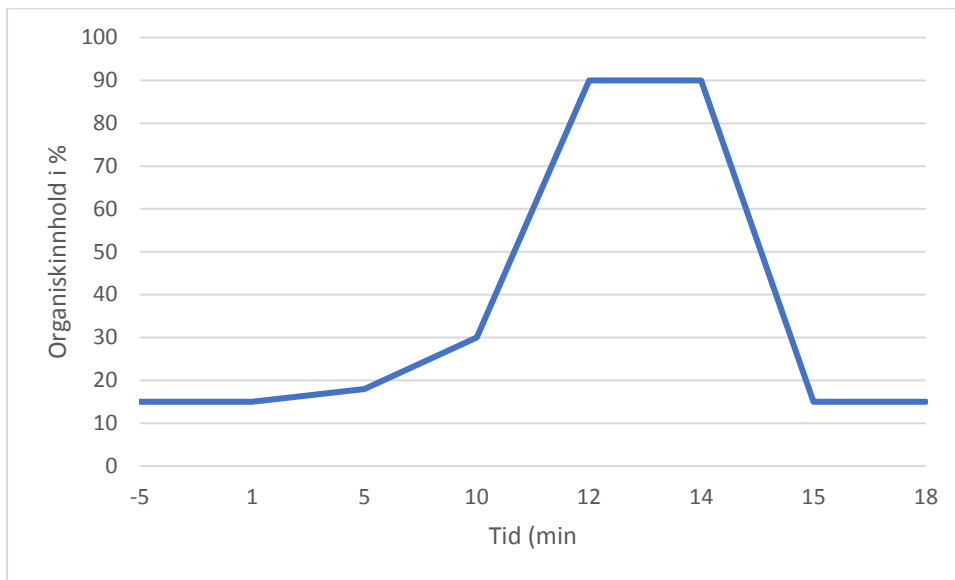
3.7.5.2 Metodeutvikling C₁₈- kolonne (1-6)

Metodeutvikling på C₁₈-kolonne ble laget fra bunn av. Metode 1 kjøres i en gradient der man starter med 10 % ACN til 90 %, og bruker 30 minutter på denne gradient økningen. Ved 90 % ACN holdes det konstant i 5 minutter. Deretter senkes gradient tilbake til 10% i løpet av 1 minutt og ekvibreres i 4 minutter.

Tabell 16 viser en oversikt over de 6 metodene som ble utført. Ved metodene 2-4 ble det observert at at en del av peptidene kom ut når ACN hadde nærmet seg 20 %. Dermed har det blitt prøvd ut ulike gradienter ved den konsentrasjonen. Samtidig har den totale analyssetiden blitt redusert til 25 minutter.

Ved metode 4 ble startkonsentrasjon av ACN senket til 10 %, der det ble kjørt en gradient opptil 30 % ved 5 minutter. Deretter fra 30 % til 90 % med 8 minutter, og holdt konstant ved 90 % i 10 minutter.

Ved Metode 6 er det blitt gjort 3 gradient økninger. Fra 15 % til 18 % i løpet av 5 minutter, deretter fra 18 % til 30 % i 3 minutter og fra 30 % til 90 % på 3 minutter og deretter holdt konstant ved 90 % i 3 minutter. Totalanalysetid ble også redusert til 18 minutter. (Figur 16) viser metode 6 der man ser organisk løsningsmiddel (ACN+0,1% FA) som funksjon av tid:



Figur 16: Viser innhold av organiskfase (ACN+0,1%FA) som funksjon av tid for metode 6.

3.7.6 Metodeutvikling og optimalisering av ESI

Optimalisering av ESI parametre er viktig for å få best mulig sensitivitet. Forsøk der én og én parameter ble testet ut, mens alle de andre parametre ble holdt konstante ble gjort for å optimalisere betingelsene i ESI. Tidligere har det blitt gjort faktorforsøk med 2k design der 2 parametre ble endret under kontrollerte forhold, der det viste seg at det var svake interaksjoner mellom parametrene.[62, 63] Dermed undersøkte vi hver og én av de ulike parametrene under kontrollerte forhold. Effektene av variablene ble observert gjennom analyttens respons (toppareal).

De viktigste parametrene i ESI som har betydning for ionisering av prøven er kappegass temperatur, kappegass hastighet, nebulizer trykk og kapilærespenning. En oversikt av parametrene og deres normale brukteområder er gitt i (tabell 16).

Tabell 16: Viser en oversikt over de viktigste parametrene under optimalisering av ESI

Standard område i Masshunter	Økning, (Område)
Kappegass temperatur (325°C)	50°C, (250-400)
Kappegass hastighet (10 L/min)	2 L/min, (8-12)
Nebulizer trykk (40psi)	5psi, (25-50)
kapilærespenning (3500V)	500 V, (2500-4500)

Det ble gjort forsøk med alle 4 parametre som vises på (tabell 16). Vi startet med kappegass temperatur der det ble testet i 250°C, 300°C, 350°C og 400°C. Deretter gikk vi videre med det resultatet som ga høyest areal av peptidene. Deretter gikk vi videre til å teste kappegass hastighet i områdene 8 L/min, 10 L/min og 12 L/min. På samme måte ble den parameteren som ga mest utbytte av peptidene tatt med

videre. Deretter ble nebulizer trykket teste med følgende trykk: 25 psi, 30 psi, 35 psi, 40 psi, 45 psi og 50 psi. Til slutt testet vi kapillærespenningen med: 2500 V, 3000 V, 3500 V, 4000 V og 4500 V.

Målet var som sagt å få best mulig kombinasjon av disse parameterne som gir mest deteksjon av peptidene i MS. Den nye optimaliseringsmetoden ble deretter sammenlignet med tidligere metode før optimalisering for å se om den nye metoden var bedre. (Tabell 17 og 18) viser innstillingene på de 4 parameteren før og etter optimalisering.

Tabell 17: Viser standard parameter på ESI før optimalisering [62, 63]

Parameter	Innstilling (oa-TOF)
Ionemodus	Positiv polaritet
Nebulizer trykk	50 psig
Kappegasstemperatur	400 °C
Kappegasshastighet	12 l/min
Kapillærespenning	4000 V

Tabell 18: Viser standard parameter på ESI etter optimalisering

Parameter	Innstilling (oa-TOF)
Ionemodus	Positiv polaritet
Nebulizer trykk	25 psig
Kappegasstemperatur	400 °C
Kappegasshastighet	12 l/min
Kapillærespenning	4000 V

3.7.7 Deteksjonsgrensebestemmelser (Limit of detection LOD)

Deteksjonsgrensen (LOD) i en analysemetode beskriver den laveste konsentrasjonen av analytt som med høy sikkerhet kan skiller fra støyet i grunnlinjen. Det er flere fremgangsmåter for bestemmelse av LOD, og hver av dem vil gjengi ulike definisjoner på denne grensen. LOD som bestemmes ved en ordinær metodeutvikling, vil ikke nødvendigvis ha samme betydning som en LOD for en analysemetode i sin helhet. Man skiller derfor mellom instrumentets deteksjonsgresne (IDL) og analysemetodens deteksjonsgrense (MDL). Innen kromatografi er det vanlig å beskrive LOD som den injiserte mengden som gir en topphøyde som er minst 3 ganger større enn støyet i grunnlinjen. Dette er også bedre kjent som et mål på signal-støy-forhold (SNR). Man kan også beregne LOD basert fra analyttense areal ved å bruke statistiske fremgangsmåter.[92]

3.7.7.1 Instrumentetsdeteksjonsgrense (IDL) og metodensdeteksjonsgrense (MDL)

Instrumentetsdeteksjonsgrense (IDL) forteller oss hva instrumentet kan detektere av rene standarder. Her er målet å se hvor my analytt som kan detekteres ved de angitte betingelsene i instrumentet. Man kan i etterkant endre parametere i instrumentet hvis man ønsker å se om dette vil gi høyere deteksjon, noe som vi prøvde ut under denne oppgaven.[92]

Metodens deteksjonsgrense (MDL) er deteksjon av analytter etter de har vært gjennom en prosess av prøveopparbeiding, ekstraksjon og rekonstruering. Ved MDL vil vi naturligvis få en lavere deteksjon enn ved IDL. Man starter dermed alltid med en høyere konsentrasjon når man skal beregne MDL, slik at det er sikkert at vi får med oss noen analytter til instrumentet. Forskjellen i MDL og IDL beregnes som gjennfinnisgrad.[92] Et enkelt eksempel er hvis vi ved IDL injiserer 5 ng/ml av et enkelt peptid og det gir en toppareal på 10 000, og deretter bruker samme konsentrasjon (5 ng/ml) ved MDL og det gir oss en toppareal på 5000, er gjennfingsgraden 50%. Det vil si at vi må øke konsentrasjonen for peptidet med faktor 2 ved MDL metode for å oppnå samme arealtopper som for IDL ved 5 ng/ml.

3.7.7.2 Deteksjonskriterier

Når man benytter SNR som estimat for å beregne LOD så tar man utgangspunkt i enkelte injeksjoner, og deretter lese av SNR og deretter estimere denne rasion i forhold til en SNR som er ved grunnlinjen. Oftet brukes en SNR som er 3 ganger større enn grunnlinjen en signifikant toppareal. Følgende formel ble brukt for å beregne LOD ved å bruke SNR som deteksjonskriterie:

$$C(LOD) = \frac{C(kjent)}{SNR(m\ddot{a}lt)} \times 3 \quad (13)$$

Hvor $C(kjent)$ er konsentrasjon av analytt som er tilsatt, SNR (m\ddot{a}lt) er signal-st\ddot{o}y forholdet som er m\ddot{a}lt, og 3 er SNR man \ddot{o}nsker.

En annen m\ddot{a}te \ddot{a} estimere IDL og MDL er ved \ddot{a} bruke statistiske fremgangsm\ddot{a}ter. Dette foreg\ddot{a}r ved en en-side-t-test. To hypoteser settes opp hvor den ene er nullhypotesen (H_0) og den andre er alternativ hypotesen (H_1).

H_0 : Arealet i analyttoppen er ikke forskjellig fra null (dvs. kun st\ddot{o}y)

H_1 : Areal i analyttoppen er st\ddot{o}rre enn null (dvs. signifikant forskjellig fra st\ddot{o}y)

US EPA (United States Environmental Protection Agency) har utarbeidet en statistisk tiln\ddot{a}rming til bergning MDL og IDL, og finnes i de anbefalte EPA-retningslinjene for \ddot{a} etablere testprosedyrer for analyse av forurensninger. EU har ogs\ddot{a} st\ddot{o}ttet denne stillingen. [93]

Denne metoden krever injisering av flere replikatstandarder (i denne oppgaven ble det brukt 10 ineksjonsreplikater) for \ddot{a} vurdere usikkerheten i m\ddot{a}lesystemet. Analytten som m\ddot{a}les skal ha en konsentrasjon n\ddot{a}r forventet deteksjonsgrense (LOD). Hvert trinn i pr\ddot{o}vetakingsprosessen kan introdusere variasjoner i den endelige m\ddot{a}lte verdien av det kromatografiske topparealet, noe som resulterer i en pr\ddot{o}ve-til-pr\ddot{o}ve-variasjon. Disse avvikene vil generelt begrense den praktiske IDL og MDL som kan oppn\ddot{a}s. N\ddot{a}r antall injesjonsreplikater n er lite ($n < 30$), brukes en ensidig t-test (11) til \ddot{a} bestemme deteksjonsgrensen. Verdien av t_α hentes fra en tabell av ensidig t-fordeling ved hjelp av $n-1$ (antall ineksjonsreplikater minus 1) som er antall frihetsgrader. Jo st\ddot{o}rre antall m\ddot{a}linger n , jo mindre er verdien av t_α , og mindre usikkerheten i estimatet til IDL eller MDL. Her brukes areal av topper som m\ddot{a}l for \ddot{a} beregne LOD.

Den statistiske fremgangsm\ddot{a}ten for \ddot{a} besemme LOD ble gjort ved \ddot{a} m\ddot{a}le variasjonen i analyttsignalene ved \ddot{a} injisere den samme pr\ddot{o}ven 10 ganger. Deretter benyttes gjennomsnittsverdier (\bar{x}) og

standardavviket (SD) av arealet til toppene til å beregne deteksjonsgrensen. Estimatet baserer seg på variasjonen i respons mellom flere målinger gjennom en ensidig t-test på 95 % konfidensnivå (eller alternativt 99 % konfidensnivå). Den statistiske utregningen finner da en teoretisk LOD-verdi ved å beregne det arealet en topp må ha for å være signifikant forskjellig fra støybakgrunnen i kromatogrammet. Den teoretiske deteksjonsgrensen gir en indikasjon på hvor langt ned i konsentrasjon en kan gå med metoden som benyttes, og fortsatt ha et signal som er signifikant større enn den rene støyen i grunnlinjen.[92]

Den statistiske beregningen ble gjort på exel. Følgende trinn er involvert i beregning av LOD:

1. Beregne gjennomsnittsareal av for den kromatografiske toppen for $n = 10$ injeksjoner av peptidet.
2. Beregne standardavviket i topparealet (SD)
3. Beregne standardavviket (SE) i gjennomsnittlig toppareal, $SE = SD/\sqrt{10}$
4. Beregning av av det minste signifikante arealet (MSA) som den kromatografiske toppen må ha for å skille seg fra støyen i grunnlinjen:

$$MSA = t_{\alpha} \times SE \quad (14)$$

$$C(LOD) = \frac{MSA}{Gjennomsnittareal(10 inj.)} \times C(standard) \quad (15)$$

C (kjent) er konsentrasjon av peptidet som ble tilsatt prøven.

3.7.7.3 Forskjell mellom SNR og statistiske beregninger

Før var en felles standard for støy å måle topp-til-topp (minimum til maksimal) verdi av grunnlinjestøy, målt 60 sekunder før toppen eller 30 sekunder før og etter toppen. Etter hvert med utvikling av datasystemene ble topp til topp målinger ersatt med støy beregnet som standardavviket (SD) eller root-mean-square (RMS) av basislinjen over et bestemt tidsintervall. [92]

Automatisk beregningen av SNR har gjort det mye enklere for laboratorier, spesielt hvis man er opptatt og eller kjører mange forsøk. Men støymålingskriteriene er blitt mindre kontrollert. I noen tilfeller har leverandørene estimert støy basert på et svært smalt intervall (f.eks. 5 sekunder) og intervallet kan ligge mange toppbredder vekk fra toppen som brukes til å beregne signal. Disse "håndplukkede" støyvinduerne kan enkelt gi en høyere SNR ved å velge regioner av grunnlinjen der støyen er lavest. Vanligvis blir støyen beregnet i grunnlinjen automatisk hvor støyen er lavest, men dette må korrigeres alt etter hvor analyttene kommer ut. Hvis man kjører prøver med flere stoffer hvor stoffene er fordelt i kromatogrammet, må man manuelt korigere hvor støyen skal beregnes, slik at den ikke blir beregnet på selve analytten. SNR verdiene vil imidlertid ikke korrelere med den «virkelige» IDL eller MDL for automatiserte analyser som laboratoriet utfører. Derfor vil bruken av signal-støy som et mål av deteksjonsgrensen tydeligvis ikke produsere den absolutte verdien når støyen flukturerer i kromatogrammet og valget av hvor det skal måles blir dermed er subjektivt. Når man bruker statistiske beregninger for å estimere LOD bruker med hovedsakelig areal av analyttene som utgangspunkt og deretter beregner gjennomsnittsarealer og SD. Dette vil gi et mye mer objektivt resultat som ikke flukturerer på samme måte som om man brukte SNR. [92] Hvis man skal sammenligne ulike instrumnter som f.eks. MS-0a

TOF og TQMS bør sammen fremgangsmåte for beregning av IDL og MDL brukes for å kunne si noe om hvilke instrument som er bedre. I dette tilfellet kan man ikke bruke SNR som mål for TOF og TQMS grunnet at TQMS er SNR betydelig lavere og vil dermed gi en mye lavere IDL og MDL. Dermed bør det brukes en metode som vil være likt for begge.

4.Resultat og diskusjon

Deteksjonsgrensen av peptidene som ble analysert i denne oppgaven er avhengig av flere parametere. Nøyaktighet rundt opparbeidelsesprosessen av både blodprøvene og plasmaprøvene, hvor nøyaktig dette har blitt gjort vil være avgjørende for hvor mye av peptider som blir videre til analysen. Det vil være avhengig av den kromatografiske separasjonen i HPLC-instrumentet, hvor godt parameterne i LC-instrumentet er blitt optimalisert for best mulig separasjon av peptidene. Det vil være avhengig av ioniseringsprosessen i ESI og parameterne som kan innstilles der for å få en optimal ionisasjon av peptidene som så detekteres. Alle disse faktorene vil kunne påvirke deteksjonsgrensen av peptidene. Alle peptidmengder som er beregnet i denne oppgaven har blitt korrigert for renhet og assay for innkjøpte peptidstandarder, som er gitt i (tabell 12). I (tabell 19) vises en oppsummering av samtlige forsøk som ble utført under denne oppgaven.

Tabell 19: Viser oversikt over hvilke forsøk som ble utført under denne oppgaven

Forsøk	Hensikt	Antall utført forsøk	Antal injeksjonsreplikater
Metode 1	Optimalisere LC-instrumentet ved bruk av C ₈ -kolonne	1	4
Metode 2		1	4
Metode 3		2	4
Metode 4		3	4
Metode 5		3	4
Metode 6		10	4
Metode 1	Optimalisere LC-instrumentet ved bruk av C ₁₈ -kolonne	1	4
Metode 2		1	4
Metode 3		2	4
Metode 4		1	4
Metode 5		1	4
Metode 6		5	4
Optimalisering av MS	Optimalisering av ESI-parametere	8	4
LOD	Finne lavest konsentrasjon som ga SNR=3	5	3
RPPT	Anvende den opparbeidelsesteknikken som ga best gjennfing av peptidene	18	4
Standard proteinfelling	Anvende den opparbeidelsesteknikken som ga best gjennfing av peptidene	18	4
DBS (peptidblanding i vann)	Å kunne detektere peptidene etter punching og ekstraksjon	6	4
DBS (peptidblanding i plasma med sitronsyre)	Å kunne detektere peptidene etter punching og ekstraksjon	8	4
DBS (peptidblanding i fullblod med sitronsyre)	Å kunne detektere peptidene etter punching og ekstraksjon	12	4
DBS (peptidblanding i fullblod uten sitronsyre)	Se om peptider kunne detekteres uten peptidasehemmer (sitronsyre)	6	4

4.1 Mobilfase valg

Mobilfasesammensetning som er vanlig å bruke i LC-MS ved bruk av omvendt fase kolonner er en polar mobilfase med rent vann og en delvis polar, organisk mobilfase som oftest MeOH eller ACN. I denne oppgaven ble det valgt vann og acetonitril som mobilfasekomponenter hvor begge var tilsatt 0,1% FA. FA er tilsatt for å protonerer peptidene som må være ioniserte for både å forkorte deres tid i C₈-kolonnen som vi brukte, samt å få molekylene i ladet form ved deteksjon i MS. MeOH og ACN kan begge brukes som mobilfase, der begge har sine fordeler og ulemper. ACN gir generelt et lavere trykk i kolonnen i forhold til MeOH (gitt at det benyttes samme mobilfasehastighet). I tillegg til dette har ACN en meget høy elueringsstyrke. Dette reduserer oppholdstid for analyttene i kolonnen, og resulterer i noe kortere analysetid. Ulempen med ACN er at det er mer kostbar i forhold til MeOH og samtidig også mer toksisk.[79, 94]

4.2 Kolonne valg

I denne oppgaven ble 2 forskjellige separasjonskolonner benyttet hvor den ene var C₈- og den andre C₁₈-kolonne fra ACE. Kolonnene er forskjellige fra hverandre i kjedelengde på de funksjonelle gruppene: C₁₈ har en lengre karbonkjede som vil være en mer lipofil kolonne enn C₈ som er kortere. Kolonnene skiller seg også fra hverandre ved at C₁₈-kolonnen har en større indre diameter enn C₈-kolonnen, se (tabell 20).

Vi testet ut både C₈- og C₁₈-kolonnene for å observere hvilken som ga best separasjon og deteksjon av peptidene. Her ble det benyttet (20-22) ng/ml peptidblanding i Milli-Q vann med 0,1% FA for både C₈- og C₁₈-kolonnen, hvor begge kjøringene ble gjort på samme dag. Resultatene viser klart at deteksjonen er bedre når man bruker C₈-kolonne enn C₁₈-kolonne, se (figur 17).

Tabell 20: Viser oversikt over separasjonskolonne som er brukt

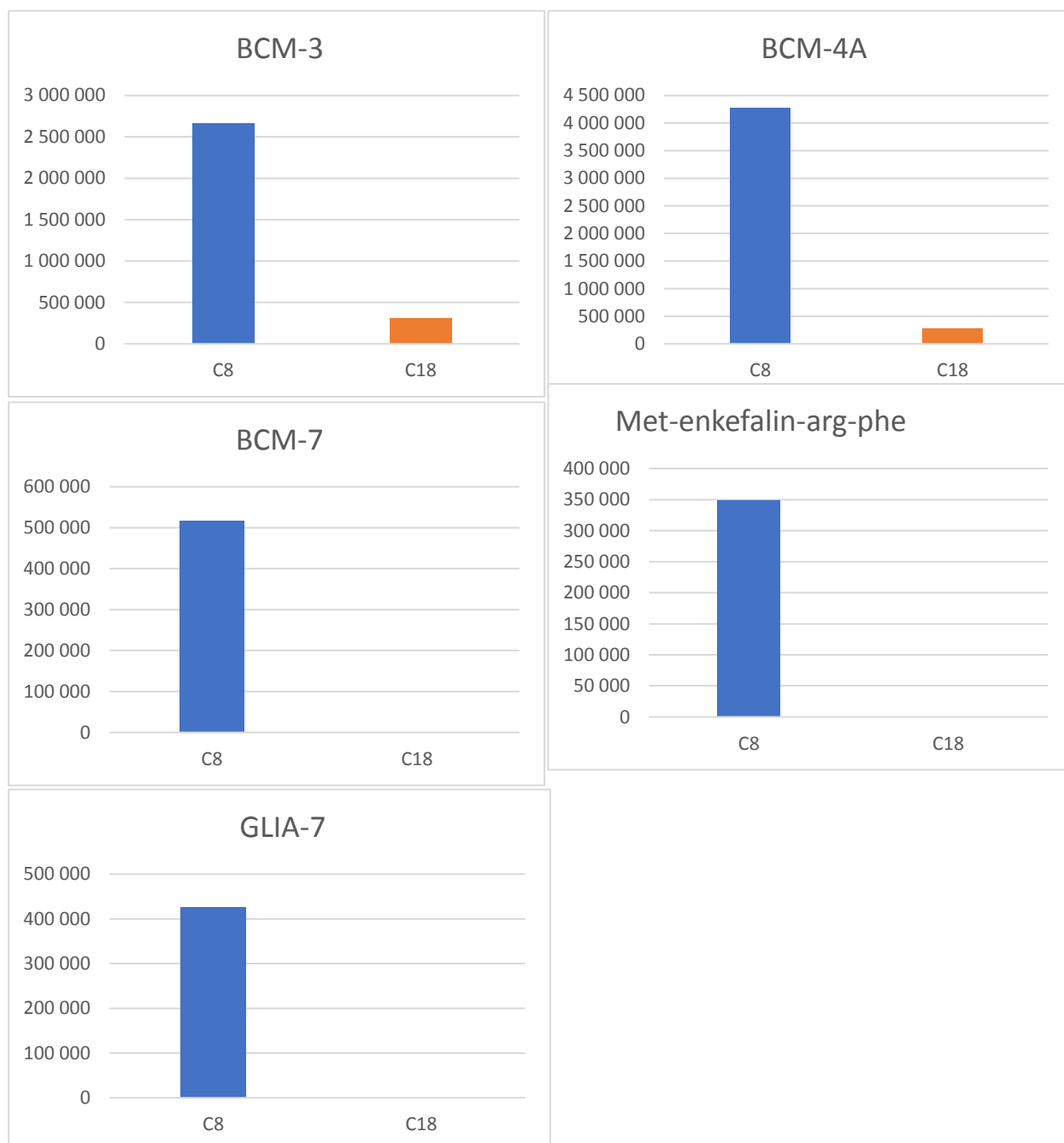
Stasjonærfase materiale	Kolonne dimensjon (mm)	Partikkel størrelse (µm)	Porestørrelse (Å)	Produsent navn
C ₁₈	150 x 3,0	3	100	ACE
C ₈	150 x 2,1	3	100	ACE

Stor indre diamter (Id) kan påvikre anlyttene ved følgende måte:

1. Fortynning av analyttene: Større Id i kolonne tilater en høyere mobilfase til å strømme inn i kolonnen med analyttene. Jo mer mobilfase er med analyttene, jo mer blir prøvene fortynnet. Dette har en sammenheng med Id. C₁₈-kolonnen har en Id som er 3,0 mm, mens C₈ har 2,1 mm. Det kan tenkes at prøvene i C₁₈-kolonnen blir så mye fortynnet at det ikke er mulig å detektere dem under de betingelsene som er brukt under LC-MS.
2. Båndspredning: Høy Id kan også foresake til båndspredning. Hovedårsaken til båndspredning er diffusjon hvor analytten går fra et område med høy konsentrasjon til et område med lav

konsentrasjon. Når Id er høyere kan det tenkes at båndspredning økes og bredden til peptidene blir større. Peptidene intensitet vises som topphøyder i TIC, og vis toppene til peptidne er brei, kan det føre til at de ikke blir detektert.

Kort oppsumert kan man si at høy Id kan foresake til fortykning og brede topper av peptidene som blir analysert. Dette kan ses i figur 19 hvor signalintensiteten ved C₈-kolonnen er betydelig høyere enn for C₁₈-kolonne. Vi brukte C₈-kolonne videre i hele oppgaven etter dette forsøket.

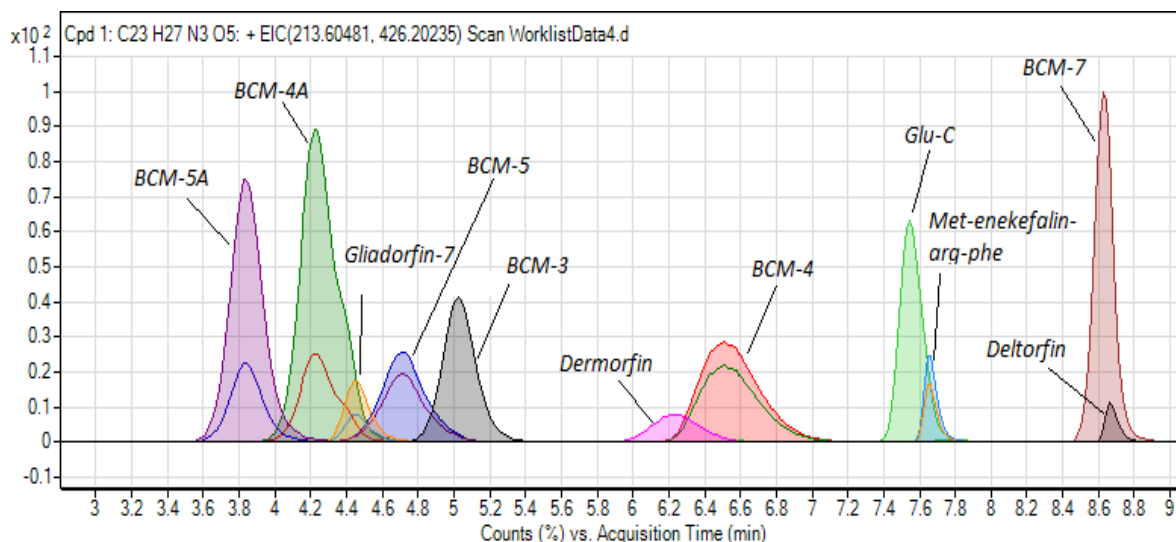


Figur 17: Viser intensitet av 5 peptider ved bruk C₈- og C₁₈-kolonne med rene peptidstandarder.

Peptidkonsentrasjon er korigert for renhet og assay

4.2 Optimalisering av gradientprogram

11 peptider ble separert ved å bruke gradienteluering hvor mobilfasesammensetningen varierte som funksjon av tid. Her var det ikke mulig å bruke isokratisk eluering med en konstant mobilfase sammensetning ettersom peptidene elueres på et bredt område som overskrider det som er optimalt ved isokratisk separasjon. I (figur 18) vises separasjon av 11 peptider i C₈-kolonne ved bruk av metode 6.

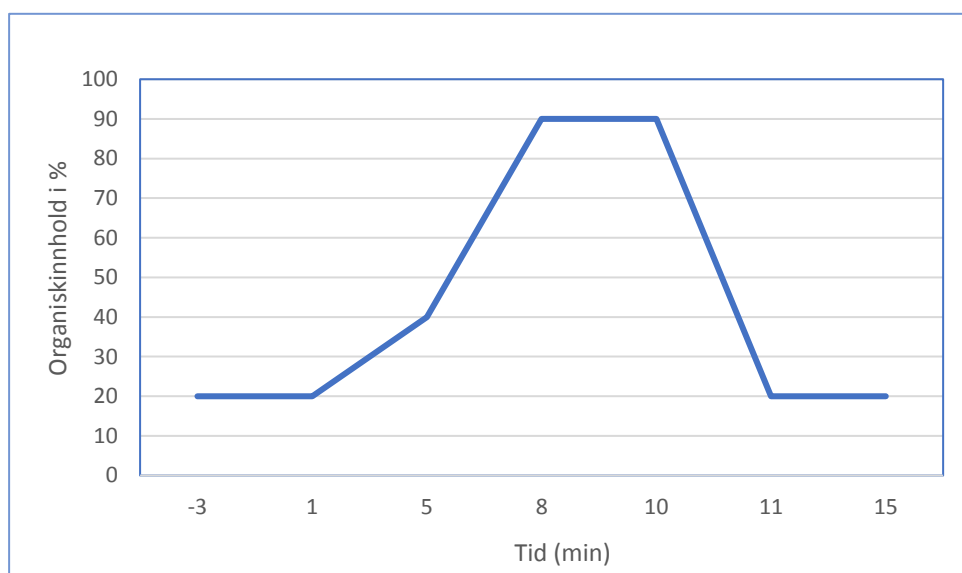


Figur 18: Viser ekstrahert ionestrømskromatogram av 11 peptider på oa-TOF-instrumentet med c8-kolonne metode 6

Ved metode 6 er ekvilibreringsstid satt til 3 minutter før kjøring på 20% ACN med 0,1% FA. Deretter økes gradienten fra 20% til 40% og bruker 5 minutter på dette. I dette tidsrommet elueres 5 peptider: BCM-5A, BCM-4A, GLIA-7, BCM-5 og BCM-3. Derfra økes gradienten opptil 90% i løpet av 3 minutter, her elueres de resterende peptidene dermorfin, BCM-4, GLU-C, met-enkefalin-arg-phe, BCM-7 og deltorfin. Mobilfasen holdes isokratisk ved 90 % ACN i 2 minutter for å eluere ut det som er av hydrofobe forurensninger i systemet og prøvematerialet. Gradientprogrammet synker deretter fra 90 % til 20 % ACN i løpet av 1 minutt, og holdes konstant i 3 minutter slik at kolonnen ekvilibrerer og inneholder korrekt løsemiddelstyrke før neste prøveinjeksjon. Denne metoden ble brukt videre i oppgaven ettersom den ble som ga best separasjon og deteksjon av peptidene ut fra de forsøkene som vi har utført.

Tabell 21: Oversikt over metode 6 som ble benyttet under HPLC-metodeutvikling av C₈-kolonne

C8 kolonne		Metode 6
Mobilfase B (ACN + 0,1 % FA)		100% ACN
Mobilfasehastighet (ml/min)		0,25
Injeksjonsvolum (uL)		20
Kolonne temperatur (°C)		35
Ekvibreringstid før start (min)		3
Gradient 1	Mobilfase B (%)	20-40
	Gradienttid (min)	5
Gradient 2	Mobilfase B	40-90
	Gradienttid (min)	3
Holdes konstant ved 90% (min)		2
Total analyse tid (min)		15



Figur 19: Viser innhold av organiskfase (ACN+0,1%FA) som funksjon av tid for metode 6

Peptidenes elueringsrekkefølge kan forklares ved å ta utgangspunkt i deres kjemiske- og fysiske egenskaper. Dermed blir molekylstørrelse, hydrofile/hydrofobe-grupper og syre/base-grupper viktig. pH blir også en viktig parameter i eluering av peptidene hvor den har en avgjørende effekt på peptidenes totale ladning, og dermed påvirker deres totale topologi og interaksjon med stasjonærfasen. I denne oppgaven består mobilfasen av Milli-Q vann og ACN med 0,1 % FA som gir pH lik 3.

Ved bruk av C₈-kolonne med metode 6 kom peptidene ut i rekkefølgen som er vist i (figur 18). For videre diskusjon av elueringsrekkefølgen har vi valgt 4 peptider, der vi skal prøve å forklare elueringsrekkefølgen ut fra av deres kjemiske – og fysiske egenskaper. Retensjonstid til de 4 valgte peptidene er oppgitt i (tabell 22).

Tabell 22: Viser retensjonsintervall i minutter for analyttene ved metode 6

	BCM 1-4A	GLIA-7	Met-enkefalinarg-phe	BCM-7
Metode 6 (R_T intervall i minutter)	3,7-4,7	4,3-4,7	7,6-7,8	8,5-8,9

Valg av peptider er basert på å få med seg en β -kasomorfin, en gluteneksorfin, en naturlig peptid og en amidvariant av β -kasomorfin som representanter for peptidvariantene i analysen. Dermed ble det valgt BCM-4A, BCM-7, met-enkefalin-arg-phe og GLIA-7. Elueringsmønsteret til BCM-4A, met-enkefalin-arg-phe og BCM-7 kan redegjøres basert på molekylens totale ladning ved pH 3, molekylstørrelse og topologi under disse forholdene. Man kan generelt si at eluering av peptidene er basert på peptidene interaksjoner med stasjonærfasen. Stasjonærfasen i vår oppgave var en omvendtfase stasjonærfase som besto av C₈-kolonne. Det vil si at de peptidene som er mest upolare vil elueres sist og de polare raskest. BCM 4A elueres først av de 4 valgte peptidene pga. dens størrelse i forhold til de andre peptidene. Det at BCM-4A består av mindre karbonkjeder gjør molekylet mindre lipofilt og dermed mindre interaksjon med C₈-kolonnen og blir dermed eluert raskt.

Tabell 23: viser oversikt over Peptidenes fysikalsk og kjemiske egenskaper

	BCM-4A	BCM-7	Met-enkefalinarg-phe	GLIA-7
Formel	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₇	C ₄₁ H ₅₅ N ₇ O ₉	C ₄₂ H ₅₆ N ₁₀ O ₉ S	C ₄₃ H ₅₇ N ₉ O ₁₁
Molekylmasse, (g/mol)	521,62	789,93	877,03	875,98
Monoisotopisk masse, Da	521,26	789,41	876,40	875,42
Ionemasse, Da (M+H)⁺	522,26	790,41	877,40	876,42
pKa-verdi	NH ₂ : 7.72	NH ₂ : 7.72 COOH: 3.68	NH ₂ : 7.73 COOH: 3,90	NH ₂ : 7.72 COOH: 3,86
Log P	0,42	-1,47	-2,32	-4,56
Isoelektrisk punkt	8,61	5,85	8,61	5,79

BCM-7 og met-enkefalin-arg-phe er begge relativt store peptider hvor BCM-7 har massen på 789,41 g/mol og met-enkefalin-arg-phe på 876,40 g/mol. Peptidenes kjemiske- og fysikalske egenskaper er oppsummert i (tabell 23). I dette tilfellet er met-enkefalin ca. 100 g/mol større enn BCM-7, men molekylet kommer likevel raskere ut enn BCM-7. Her kan det tenkes at totalladning er en stor faktor i dette tilfellet. Ved pH 3 er 82,78 % av BCM-7 peptidene ladning +1, hvor NH₂-gruppen i tyrosin delen er ladet. 17,22 % av peptidene vil ha ladningen 0, hvor COOH-gruppen i isoleucin delen er ladet. Ladning av peptidenes funksjonelle grupper samt total ladning til peptidene er gitt i (tabell 24). Når det gjelder met-enkefalin-arg-phe ved pH 3 er peptidene 88,79% ladet +2, hvor NH₂-gruppen i tyrosin delen og arginin delen er ladet. 11, 21% vil peptidene ha ladning +1, hvor COOH-gruppe i fenylalanin delen er ladet. Polaritet til peptidene er koblet opp mot ladningen i molekylene og vil dermed ha en avgjørende effekt på molekylens retensjonstid. Dermed kan det konkluderes at met-enkefalin-arg-phe elueres før BCM-7 grunnet deres totale ladning.

Tabell 24: Andel av ladede former av peptidenes basiske og sure grupper, og deres totale ladning ved pH 3 [30]

Ved pH 3	R-COO ⁻ / %	R-NH ₃ ⁺ / %	Ph-O ⁻ / %	R- (NH) ₂ NH ³⁺ / %	Andel molekyler / %	Total ladning
BCM-4A	-	100	-	-	100	+1
BCM-7	17,22	100	-	-	17,22 82,78	0 +1
Met-enkefalin- arg-phe	11,21	100	-	89,79	11,21 88,79	+1 +2
GLIA-7	12,07	100	-	-	12,07 87,93	0 +1

GLIA-7 skiller seg litt ut av alle 4 peptidene og kan ikke forklares helt med utgangspunkt i molekylets kjemiske- og fysikalske egenskaper. GLIA-7 er det peptidet som har høyest karboninnhold av de 4 nevnte peptidene og den totale ladningen er sammenliknbare med BCM-7 sin totale ladning ved pH 3. Det skulle dermed forventes at gliadorfin peptidet skulle elueres sist av de peptidene. Men GLIA-7 blir likevel eluert før BCM-7 og met-enkefalin-arg-phe, og koelueres med BCM-4A. Siden GLIA-7 elueres tidligere enn forventet, kan det tenkes at den ved dette miljøet og dette pH adopterer en topologi gir den en mer polar overflate og dette påvirker dens interaksjon med både løsningsmidlet og C₈-kolonnen. Gliadorfin har et logP på -4,56 som er den lavest av alle de 4 peptidene. LogP verdien er et mål på molekylets polaritet og derfor evnen til å løse seg i et polart miljø (vann) i forhold til upolart miljø (oktanol).[34]

Det kan derfor tenkes at gliadorfin har en topologi hvor de polare gruppene i peptidet er i kontakt med løsningsmidlet og kolonnen mens de lipofile delene er "gjemt" i molekylets tredimensjonale struktur, og på denne måten elueres raskere ut av kolonnen i forhold til de andre peptidene.[11]

4.3 MS-metodeutvikling

Hensikten med metodeutviklingen var primært å optimalisere ionekildens sensitivitet for å kunne detektere lavest mulige konsentrasjoner av utvalgte peptider. Til dette ble blandinger av 11 peptider løst i Milli-Q vann med 0,1 % FA i konsentrasjoner på 125 ng/ml benyttet.

Oa-TOF-instrumentet ved OsloMet benytter Agilents jetstrøms teknologi (AJT) til å produsere ioner. Ulike parametere kan endres for å optimalisere sensitiveten i MS-metoden, se (tabell 25) for de 4 viktigste parameterne. Disse 4 parameterne ble forsøkt der én og én parameter ble testet ut, mens alle de andre parametere ble holdt konstante. Hvert forsøk ble testet på nivåer som er anbefalt ifølge Agilent, se (tabell 25, økning).[86]

Tabell 25: Viser en oversikt over de viktigste parameterne under optimalisering av ESI

Standard område i Masshunter	Økning, (Område)
Kappegass temperatur (325°C)	50°C, (250-400)
Kappegass hastighet (10 L/min)	2L/min, (8-12)
Nebulizer trykk (40psi)	5psi, (25-50)
Kapilærespenning (Vcap) (3500V)	500V, (2500-4500)

Ifølge Agilent har kappegass temperatur (SGT) og kappegass hastighet (SGF) sterkest innvirkning på sensitiviteten i MS-deteksjonen. Studier har vist at med økt temperaturer og hastighet gis det lavest dråpestørrelser under desolvatiseringsprosessen. Nebulizer trykk og kapilærespenning vil være de nest viktigste parameteren for MS-deteksjon.[86]

I denne oppgaven testet vi alle 11 peptidens sensitivitet og effektivitet over for de 4 parameteren under optimaliseringen. Peptidblandingen var løst i Milli-Q vann og 0,1 % FA der konsentrasjonen var 125 ng/ml. Vi har valgt å analysere videre 5 utvalgte peptider for å demonstrere de endringene som ble gjort ved optimaliseringen av ESI

Her var det viktig å få detektert mest mulig mengde av peptidene, men samtidig også ha en god repeterbarhet på hver injeksjon av de enkelte peptidene. Repeterbarheten til peptidene uttrykker presisjonen til analysen innenfor en måleserie. Repeterbarheten kan bestemmes fra en serie replikatmålinger hentet fra samme prosedyre og utført under mest mulig identiske forhold. Liten variasjon i resultatene mellom flere kjøringar av samme type måling tyder på god presisjon. Presisjon rapporteres vanligvis som prosent relativt standardavvik (RSD), under angitt formel. For å ha god presisjon skal det ikke overstige et relativt standardavvik på 15 %.[95]

$$RSD (\%) = \frac{SD}{Gjennomsnitt} \times 100\% \quad (13)$$

Der SD, er standardavviket til minst 3 injeksjonsreplikater av samme prøve og gjennomsnitt er gjennomsnittsverdi til minst 3 repetisjoner av samme prøve.

4.3.1 Kappegass temperatur (SGT)

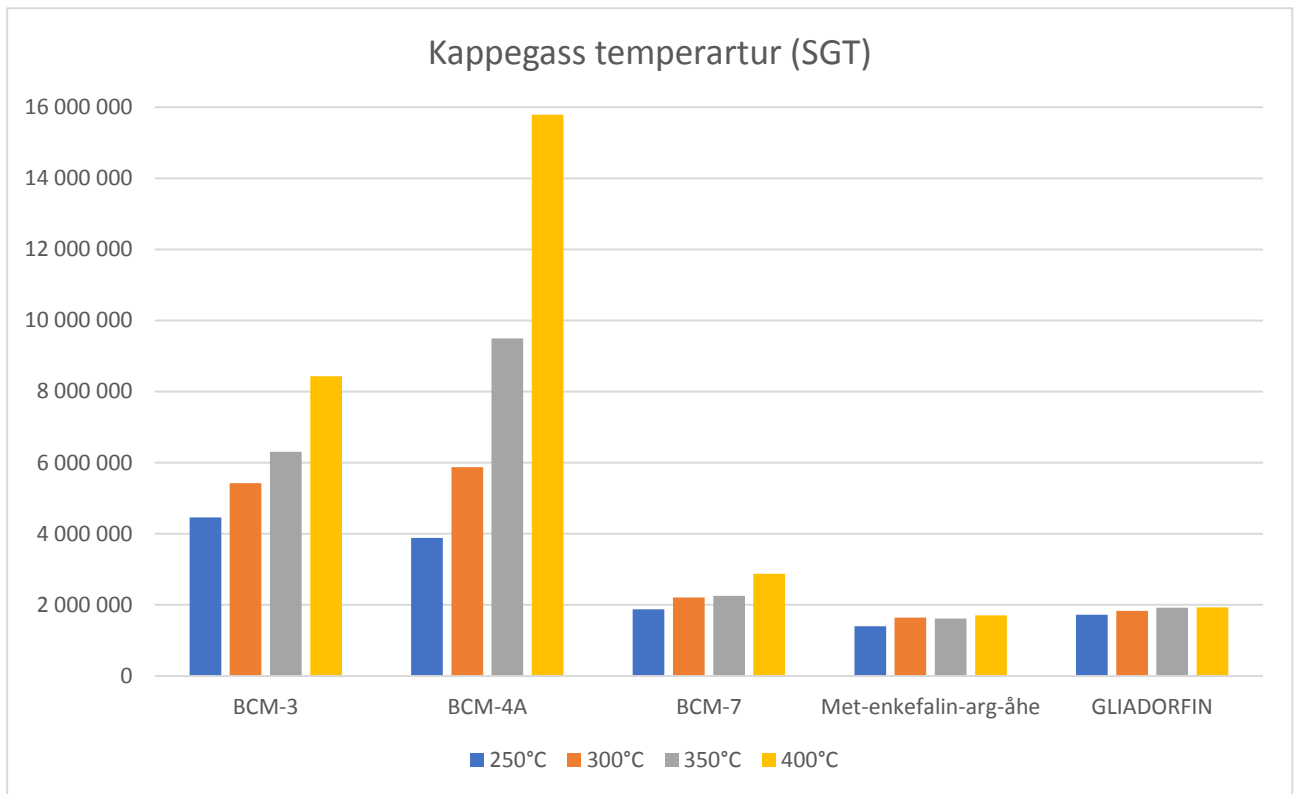
Ved testing av kappegass temperatur («Sheath gas temperature» - SGT) ble det funnet at høy temperatur ga høyest deteksjon av peptider slik som vist i (figur 20 og 21). Tidligere studier viser til at høy SGT forberede desolvatiseringsprosessen, som igjen fører til flere ioner som kan bli detektert ved MS.[96, 97] I vårt tilfelle ser det ut som den høyeste temperaturen på 400 °C gir den høyeste deteksjonen i MS som dermed stemmer med tidligere studier. N₂-gassen fra SGT blir en ekstra effekt i tillegg til spraygassen i spraynålen som er med og desolvatiserer prøvene. SGT fokuserer også ionene inn til kapilæren, slik at mest mulig ioner blir tatt opp. Resultatene er entydige for BCM-3, BCM-4A og GLIA-7 der 400 °C gir høyest deteksjon, vist på (figur 21). Når det gjelder BCM-7 og met-enkefalin-arg-phe, så ser det ikke ut som temperatur har veldig stor betydning, men man ser fortsatt at det gir litt høyere deteksjon ved 400 °C enn ved de lavere temperaturene. Det blir naturligvis en høyere deteksjon av de mindre peptidene, fordi peptidmengdene er angitt som antall ng/ml, og ikke som antall mol/l, se (figur 20). Det vil dermed si at

for de lav molekylære peptidene (BCM-3 og BCM-4A) vil det omtrent være dobbelt så mye av, i forhold til de store peptidene (BCM-7, met-enkefalin-arg-phe og GLIA-7)

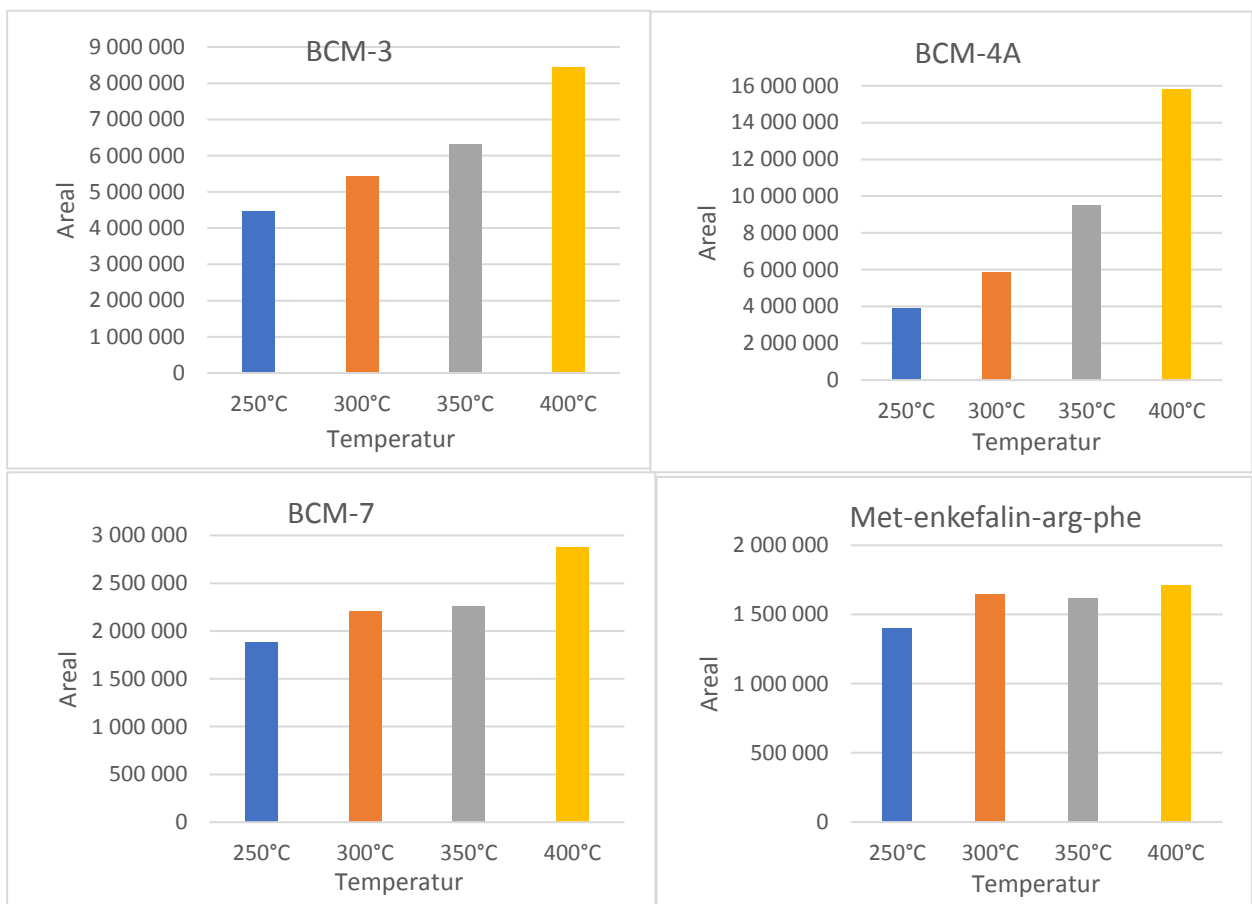
Det kan være flere grunner til at SGT har lite effekt på BCM-7 og met-enkefalin-arg-phe. Den ene grunnen kan være at BCM-7 og met-enkefalin-arg-phe elueres på et senere tidspunkt i forhold til BCM-3, BCM-4A og GLIA-7 slik det fremgår i (tabell 26). Det vil si at i det tidspunktet BCM-7 og met-enkefalin-arg-phe elueres er det et høyere konsentrasjon av ACN. ACN er det løsemidlet som er brukt i denne oppgaven og som er med i desolvatiseringsprossene av analyttene. Høyere mengde ACN rundt peptidene ser ut som å være nesten upåvirket av SGT. Mens BCM-3, BCM-4A og GLIA-7 vil ha en større mengde vann andel rundt molekylene, som kan gjøre at temperatur blir en faktor for de molekylene og at høy SGT gir bedre desolvatisering for disse peptidene. En annen årsak kan være molekyl størrelse og vekt. Vi ser at de lette molekylene som BCM-3 og BCM-4A også blir mer påvirket av temperaturendringer sammenlignet med BCM-7 og met-enkefalin-arg-phe som er større molekyler. Men dette er en svakere argument, når man ser på GLIA-7: GLIA-7 er det peptidet som er størst av de 5 peptidene som ble analysert, men likevel påvirket av SGT ved høy temperatur.

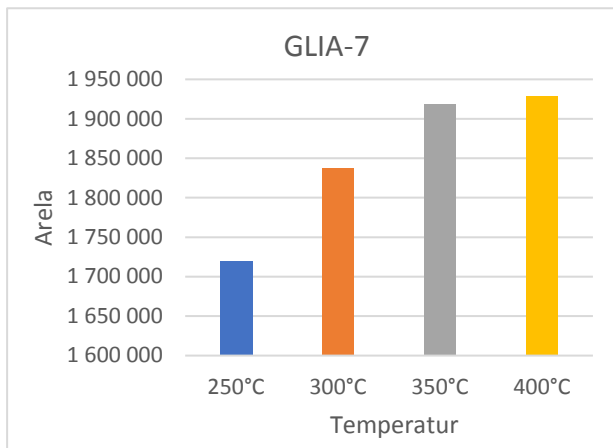
Tabell 26: Viser 5 peptiders molekylvekt, R_t og estimert innhold av ACN ved de tidspunktene

Peptider	Molekylvekt (g/mol)	Retensjonstid (min)	ACN innhold (%)
BCM-3	425,195	5,03	≈ 40
BCM-4A	521,264	4,25	≈ 36
BCM-7	789,406	8,65	≈90
Met-enkefalin-arg-phe	876,395	7,66	≈90
GLIA-7	875,418	4,46	≈38



Figur 20: igur 20: Viser forskjell i intensitet og mengde av 5 peptider ved temperaturintervallet (250-400) °C. Peptidene med lavest mokekyl masse (BCM-3 og BCM-4) vil være mer av fordi antall molekyler i analysen er basert på ng/ml og ikke antall mol





Figur 21: Viser 5 peptidens intensitet ved temperaturer fra 250-400°C. Y-aksen er justert for hver peptid slik at effekt av temperatur kan påvises.

Presisjonen viste seg til å være veldig høy ved 250°C der RSD for peptidene var omtrent 0 % for alle peptidene, med unntak av BCM-7 og GLIA-7 som begge ga 1%, se (tabell 27). Ved 300 og 350°C ble variasjonene litt større og presisjonen ble dårligere, spesielt ved 350°C, der den høyeste RSD var på 18% for BCM-4A. Ved 400°C viste replikatmålingene seg også til å være mer stabile hvor RSD for peptidene var mellom (0-7) %

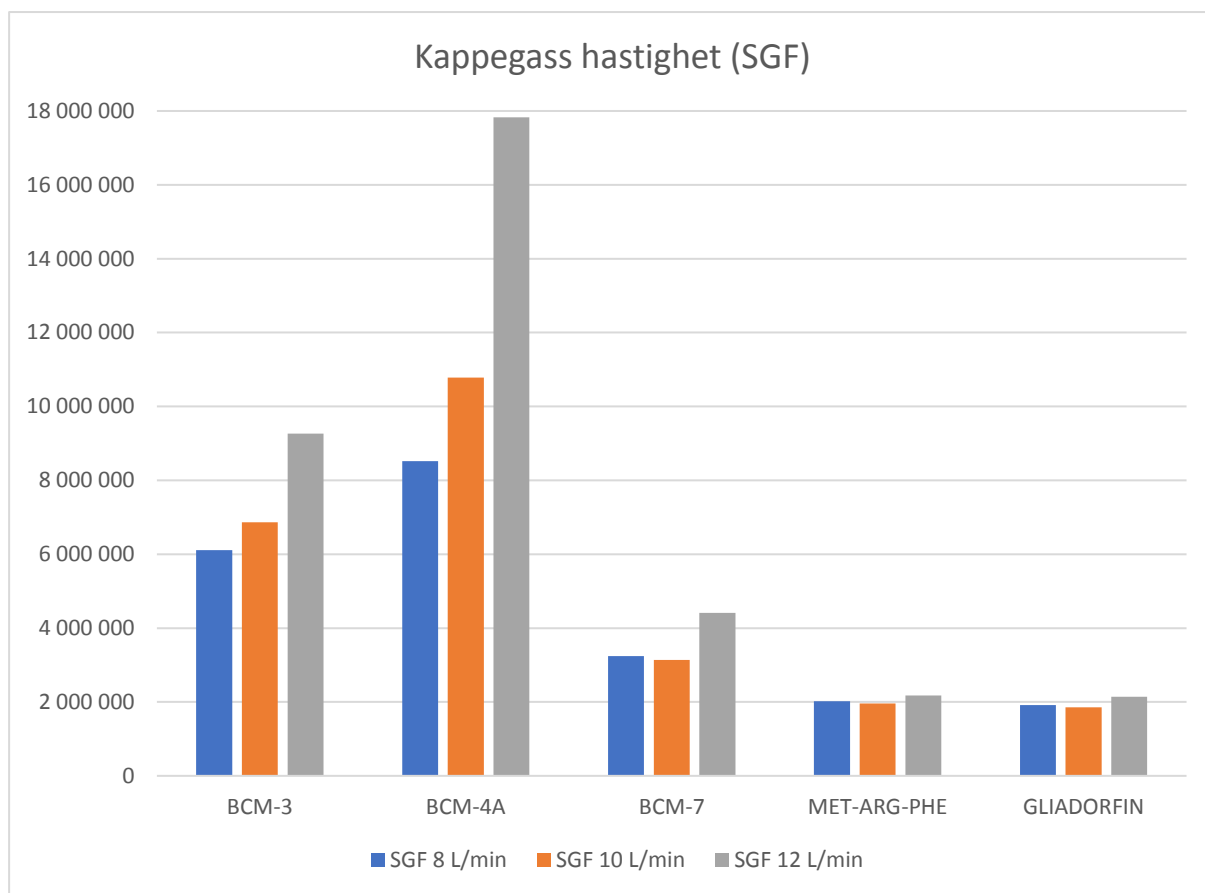
Tabell 27: Viser RSD beregning for 5 peptider ved temperaturene (250-400) °C. Hver peptid har blitt injisert i 4 replikater (n=4)

Peptid	250°C RSD (%)	300°C RSD (%)	350°C RSD (%)	400°C RSD (%)
BCM-3	0	5	10	1
BCM-4A	0	12	18	2
BCM-7	1	3	12	7
Met-enkefalin-arg-phe	0	2	5	2
GLIA-7	1	6	6	0

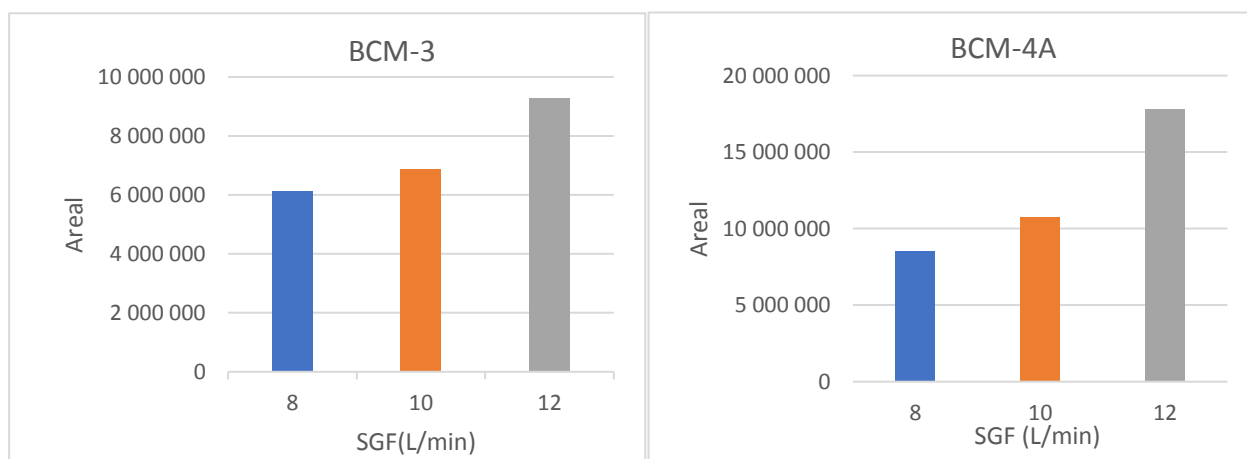
4.3.2 Kappegass hastighet (SGF)

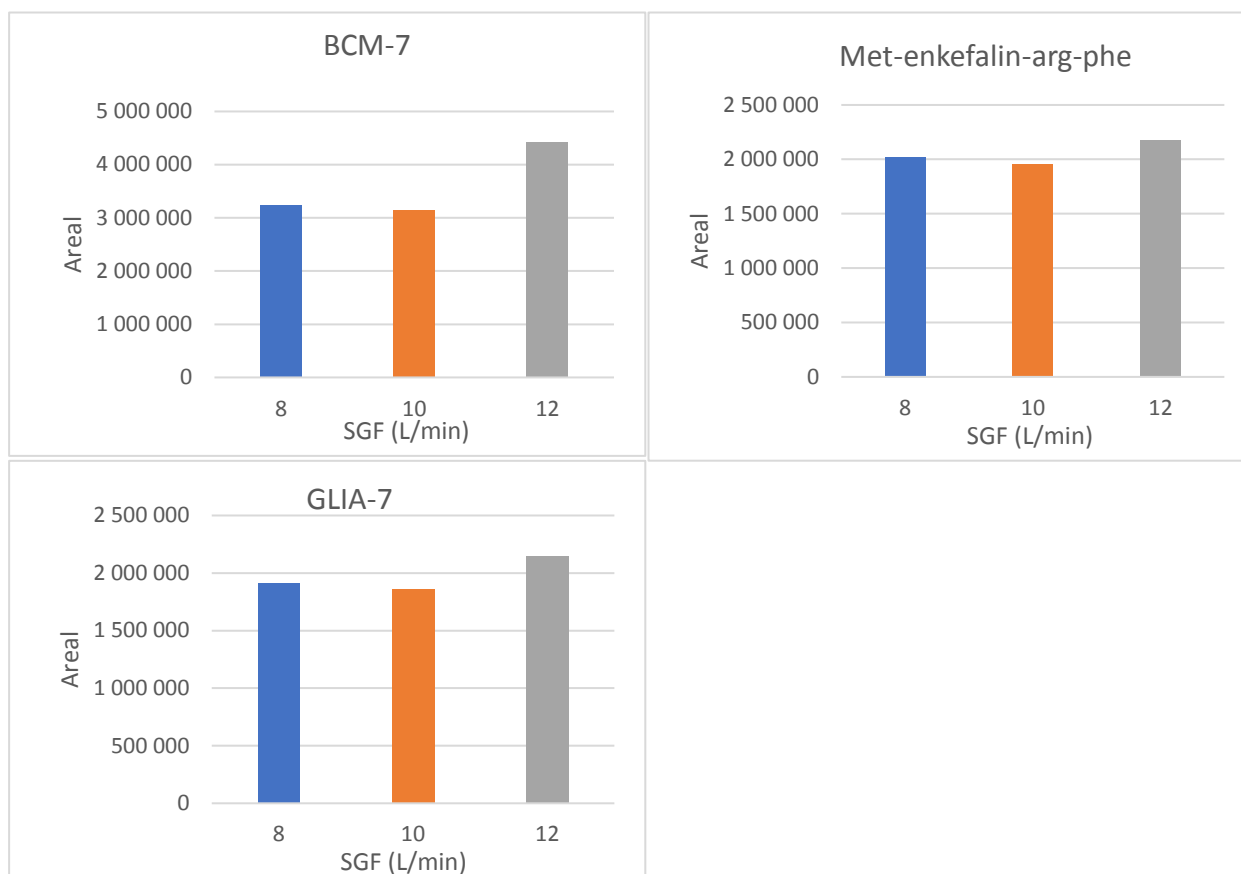
Kappegashastighet (SGF) er hastigheten N₂-gassen som kommer ut ved hver side av spraynålet, mens SGT er temperaturen av N₂-gassen. Mens SGT har en viktig rolle i å desolvatisere prøvene til ioneform slik at de kan formidles videre til kapillæren, har SGF en viktig rolle i å fokusere prøvene inntil kapillæren. Jo større flowen er, desto tynnere stråle av kappegassen og dette vil føre til et bedre fokus av ioner til kapillæren.[96, 97] Når hastigheten av kappegassen er høyere, vil det også øke desolvatiseringsprosessen fordi N₂-gassen vil treffe prøvene i et raskere tidspunkt. Man ser samme trend ved SGF som for SGT. De minste peptidene (BCM-3 og BCM-4A) påvirkes sterkest ved endring av flow, hvor høy flow gir best deteksjon, se (figur 23). Når det gjelder BCM-7, GLIA-7 og met-enkefalin, kan man se små trender hvor høy hastighet gir litt bedre deteksjon, men disse endringene er ikke store,

akkurat som for SGT. Man kan argumentere for hvorfor de lav molekylære peptidene påvirkes mest av SGF på samme måte som det er blitt gjort for SGT.



Figur 22: Viser forskjell i intensitet av 5 peptider ved kappegass hastighetene (8, 10, 12) L/min. Peptidene med lavest molekyl masse (BCM-3 og BCM-4) vil være mer av fordi antall molekyler i analysen er basert på ng/ml og ikke antall mol.





Figur 23: Viser 5 peptiders intensitet ved kappegasshastighetene (8, 10, 12) L/min. y-akse er justert for hver peptid slik at effekt av SGF kan påvises

Når man ser på persisjonen til hver peptid der det ble injisert 4 repetisjoner, så ser vi at SGF 8L/min gir god repeterbarhet, men deteksjonene av peptidene målt i areal blir lavere i forhold til SGF 12 L/min. SGF 10 L/min gir ikke like bra repeterbarhet som SGF 8 og 12, se (tabell 28). Men SGF 12 ga best resultat der både repeterbarheten innenfor hver peptid og deteksjon var høyest.

Tabell 28: Viser RSD beregning for 5 peptider ved kappegass hastighetene (8, 10, 12) L/min. Hver peptid har blitt injisert i 4 replikater (n=4)

Peptid	SGF 8 L/min RSD (%)	SGF 10 L/min RSD (%)	SGF 12 L/min RSD (%)
BCM-3	6	12	3
BCM-4A	9	19	4
BCM-7	8	14	12
Met-enkefalin-arg-phe	2	8	5
GLIA-7	5	10	2

4.3.3 Nebulizer trykk

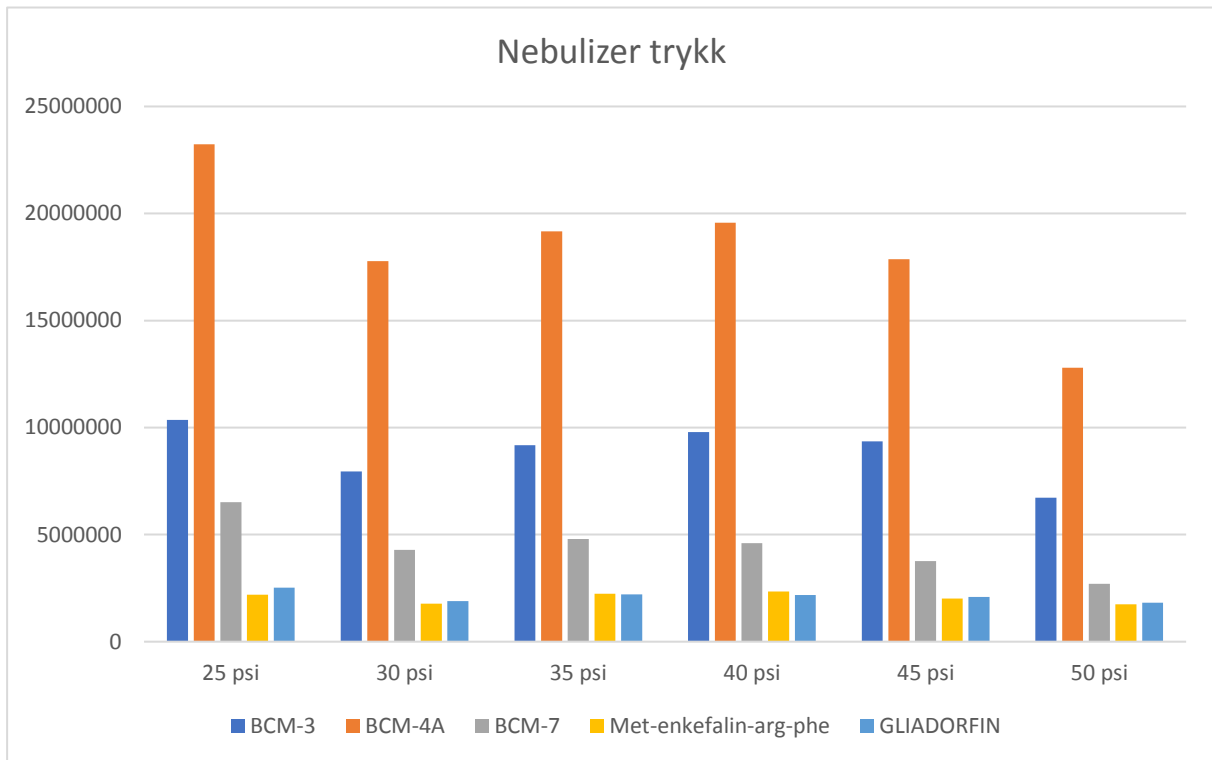
Nebulizer trykket styrer strømningshastigheten til spraygassen i spraynålen. Dette har igjen betydning for nedbrytning av væskedråpene fra mobilfasen, akselerasjon av dråpene i sprayen og fordampningshastighet til dråpene. Nebulizer trykket var ikke testet i tidligere oppgaver, dermed var det interessant å se hvordan dette påvirket peptidens deteksjon.[98] Effekten av nebulizer trykket kan oppsummeres slik:

1. Nedbrytning av væskedråpene fra mobilfasen til mindre dråper: Høy gasshastighet fra spraynålen medfører en større aerodynamisk kraftpåvirkning på dråpene, noe som fører til at de lettere brytes ned til mindre dråper. Nedbrytningshastigheten er blant annet avhengig av forskjellen mellom dråpenes hastighet og spraygassens hastighet samt dråpenes diameter. Det finnes derfor et viss minimum gasshastighet som må til for å få effektiv nedbrytning av dråpene ut fra deres størrelse. Den initielle dråpestørrelsen direkte ut fra spraykapillæret vil på sin side avhenge av diameteren på spraykapillæret, LC-pumpehastighet og ESI-spenning.

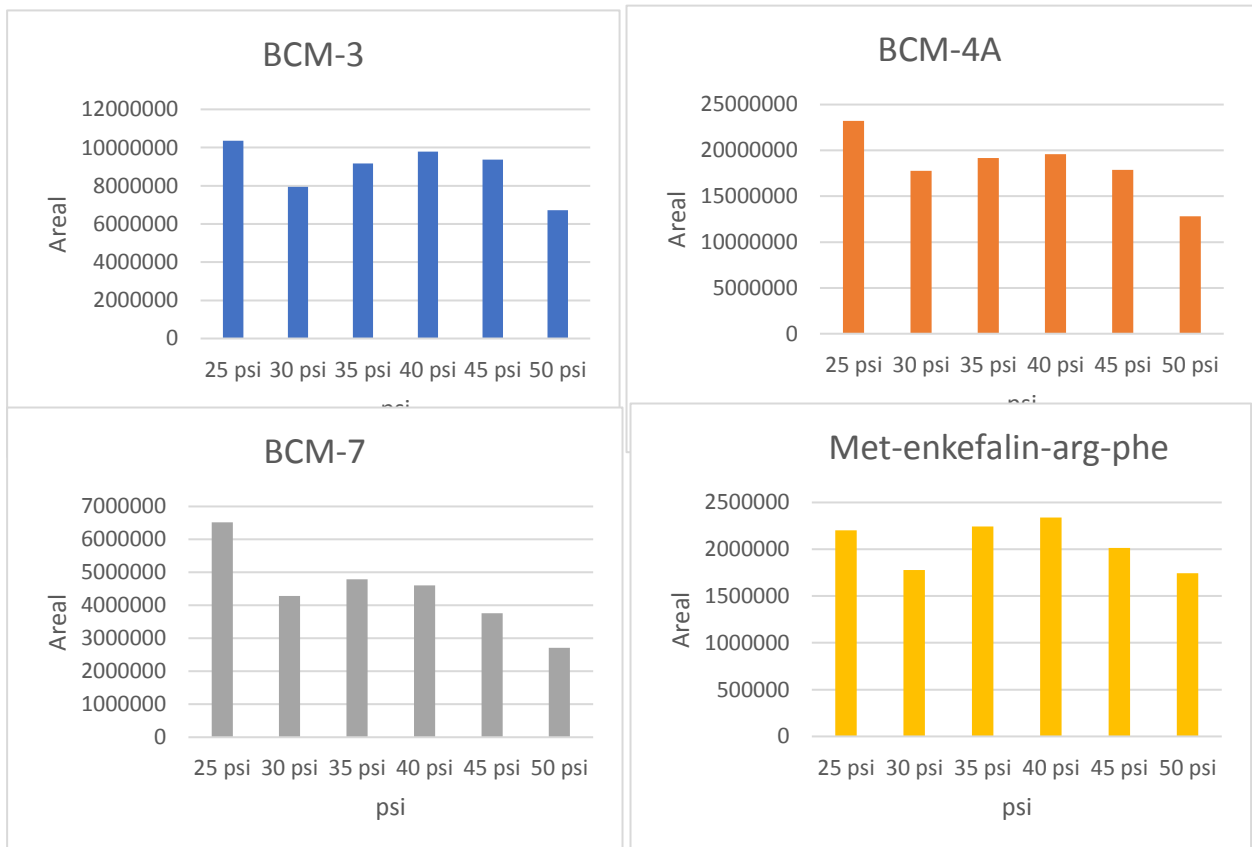
2. Akselerasjon av dråpene i sprayen: Dråpene i sprayen vil bli akselerert av trykket som spraygassen utøver. Avhengig av dråpestørrelsen vil de bruke ulike tider til å nå maksimal hastighet. Små partikler vil raskt nå høy hastighet, noe som også gjør at de heller ikke lenger så lett brytes ned til mindre dråper.

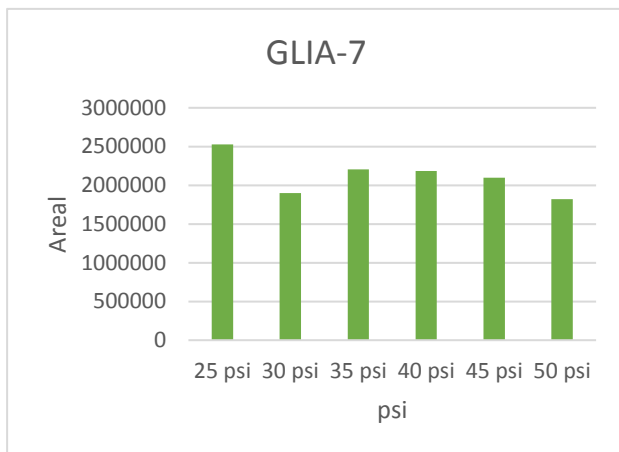
3. Fordampingshastigheten til dråpene: Høy spraygasshastighet gir økt fordampingshastighet av løsemiddelet i dråpene, men som beskrevet i punkt 2, gir dette også høy akselerasjon av partiklene. Det kan igjen føre til at dråpene ikke får tid til å fordampe, og at de føres ut av spraykammeret før de rekker å avgi ioner til MS-en. Her er det altså to motvirkende effekter. Det betyr at det må finnes en optimal gasshastighet som gir optimalt forhold mellom dråpenes hastighet og fordampingshastighet.[98]

Det viste seg at 25 psi var den optimale nebulizer trykket under ESI-optimaliseringen, se (figur 24 og 25). Det kan tenkes at ved dette trykket så får peptidene nok tid til å fordampes og avgi ioner til kapillæren som forkart i punkt 2 og 3. Det viste seg at BCM-3, BCM-4A og BCM-7 var mest påvirket ved det lave trykket, se (figur 25). Det kan være at disse 3 peptidene er omringet av små væskedråper fra mobilfasen og at ved høy psi så vil ikke de få nok tiden til å dampe inn og bli ionisert. Met-enkefalin-arg-phe og GLIA-7 har en tilnærmet lik deteksjon under alle trykkene (25-50) psi. Det kan være at disse peptidene har en dråpestørrelse som gjør at deteksjonen ikke blir stort påvirket under disse trykkene. Kort oppsummert betyr det at en økning i nebulizer trykket har best effekt på store dråper fra spraynålen, mens for små dråper er effekten mye mindre. Små dråper er mindre utsatt for aerodynamisk stress og brytes ikke så lett ned samtidig som de raskere akselereres gjennom spraykammeret uten at de får tid til å dampe inn og avgi ioner.



Figur 24: Viser forskjell i intensitet av 5 peptider ved nebulizer trykk (25, 30,35, 40, 45, 50) psi. Peptidene med lavest molekyl masse (BCM-3 og BCM-4) vil være mer av fordi antall molekyler i analysen er basert på ng/ml og ikke antall mol.





Figur 25: Viser 5 peptiders intensitet ved nebulizer trykk (25, 30,35, 40, 45, 50) psi. Y-akse er justert for å hver peptid slik at effekt av nebulizer trykk kan påvises

Presisjonen målt i RSD viste at ved 25 psi var repeterbarheten veldig godt hvor avik var mellom (2-11) %. Ved 35 og 40 var repeterbarheten også veldig bra hvor avikenen var mellom (1-4) % for 35 psi og (4-7) % for 40 psi. Det ble overrasket observert høye avik ved 50 psi, hvor dette trykket var standard brukt i MS-instrumentet og som også var brukt ved tidligere oppgaver. Her ble avikene i RSD målt mellom (12-30) %.

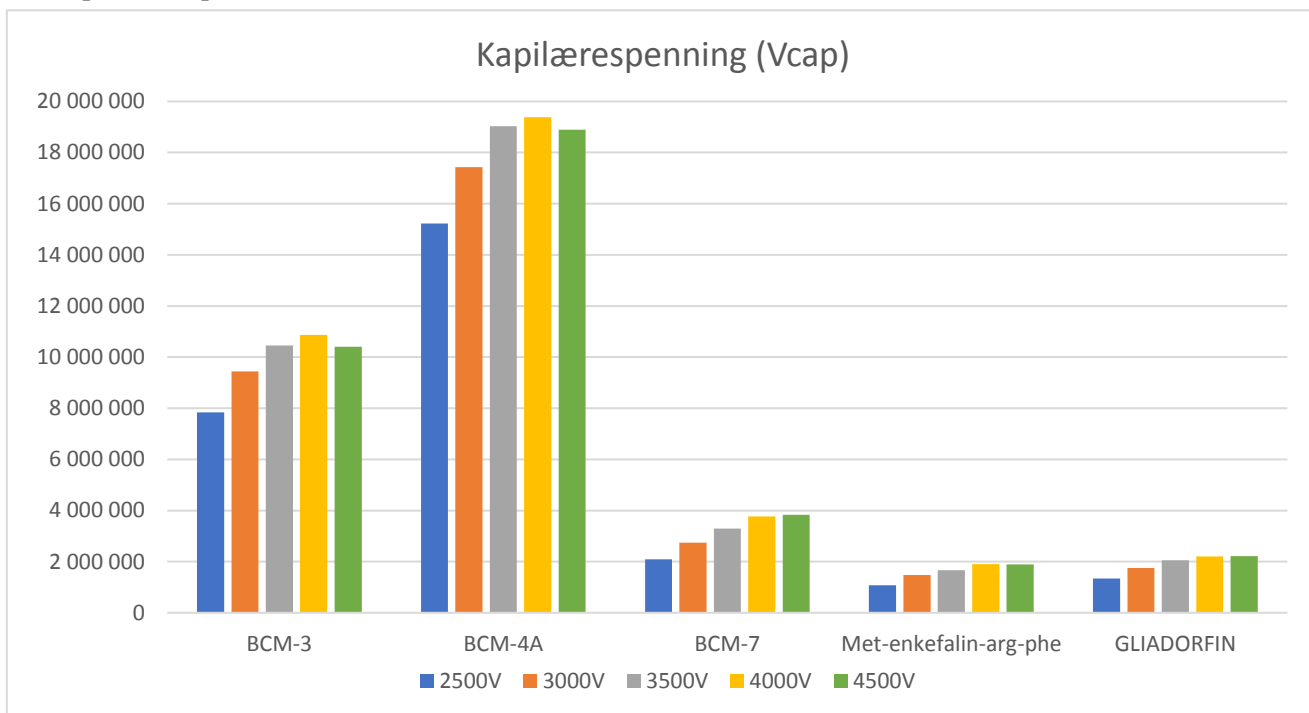
Tabell 29: Viser RSD beregning for 5 peptider ved nebulizer trykk (25, 30,35, 40, 45, 50) psi Hver peptid har blitt injisert i 4 replikater (n=4)

Peptid	25 psi RSD (%)	30 psi RSD (%)	35 psi RSD (%)	40 psi RSD (%)	45 psi RSD (%)	50 psi RSD (%)
BCM-3	4	19	3	4	6	19
BCM-4A	3	19	4	6	8	30
BCM-7	11	16	4	7	12	23
Met-enkefalin- arg-phe	2	20	3	5	7	12
GLIA-7	7	21	1	4	3	12

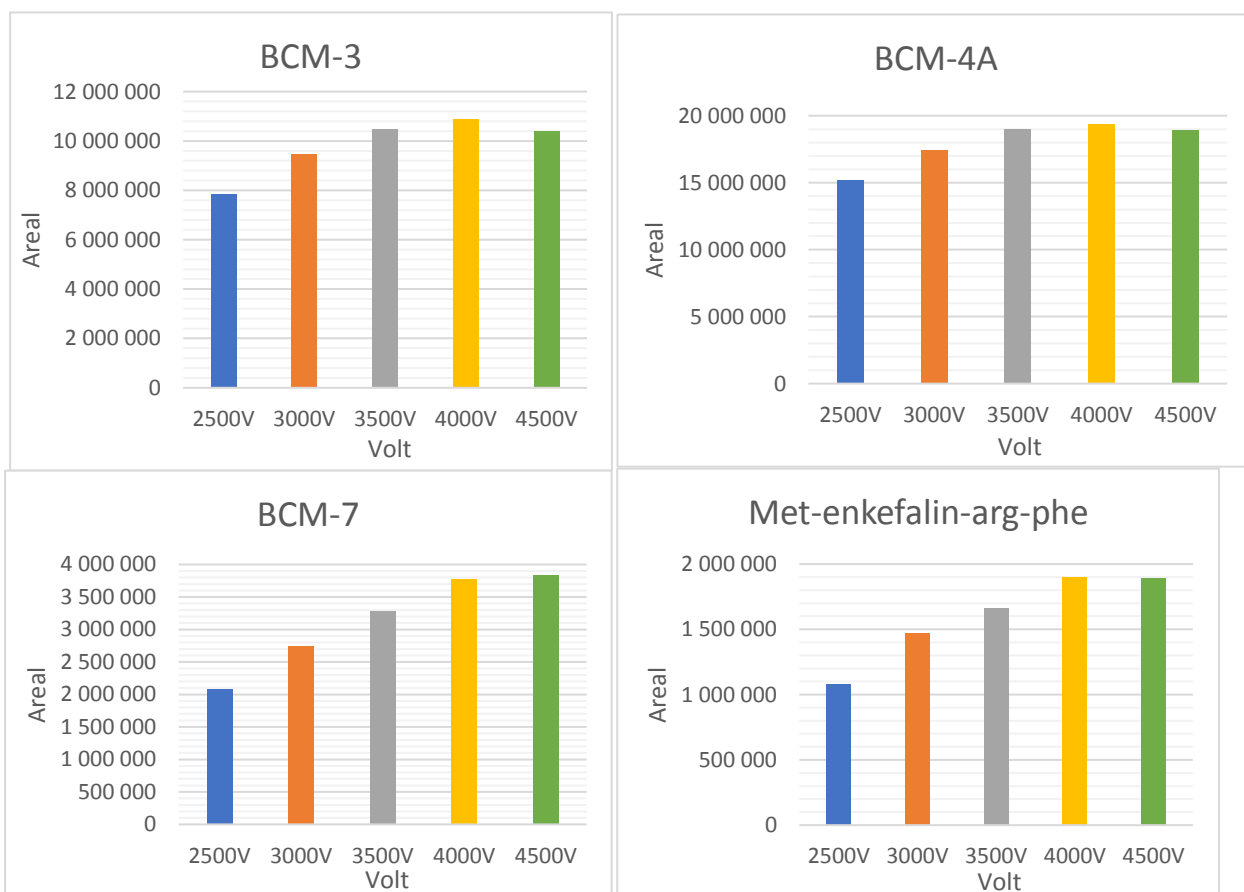
4.3.4 Kapillærespenning (VCap)

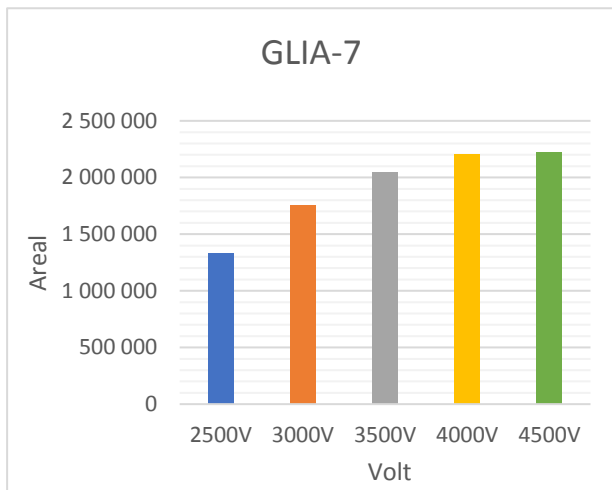
Kapillærespenningen (Vcap) er skal trekke ionene fra elektrosprøyen inn til overføringskapillæret og videre til MS. Kapillærespenningen blir negativt i forhold til ionene som er positive, slik at de blir trukket inn til kapillæren. Det ble sett at ved lav spenning (2500-3500V) var deteksjonen mindre i forhold til spenninger som var på 4000 og 4500V, se figur (26 og 27). I følge teorien så kan dette stemme fordi lav spenning kan føre til at ionene ikke blir tiltrukket like effektivt, enn hvis det er et optimalt spenning. I (figur 27) ser vi at grafene når en optimal deteksjon av peptider ved 4000 og 4500 V. Vi valgte å bruke 4000V videre pga. effekten mellom de to spenningen var omtrent like, og det er ikke noe hensikt til å bruke høyere spenning. Hvis man hadde gått over til høyere spenning vil man se at deteksjonene bli

lavere pga. for høy spenning. Dette foresakes av for stor speningsforskjell mellom kapilære og spraynålet, som vil gi gnist inni ESI instrumentet. Dette vil medføre til at ioner ikke blir trukket inn i kapillæren optimalt.



Figur: 26: Viser forskjell i intensitet av 5 peptider ved kapilærespenning (2500, 3000, 3500, 4000, 4500) volt. Peptidene med lavest molekyl masse (BCM-3 og BCM-4) vil være mer av fordi antall molekyler i analysen er basert på ng/ml og ikke antall mol.





Figur 27: Viser 5 peptiders deteksjonseffektivitet ved kapilærespenning (2500, 3000, 3500, 4000, 4500) volt. Y-aksen er justert for hver peptid slik at effekt av kapilærespenning kan påvises.

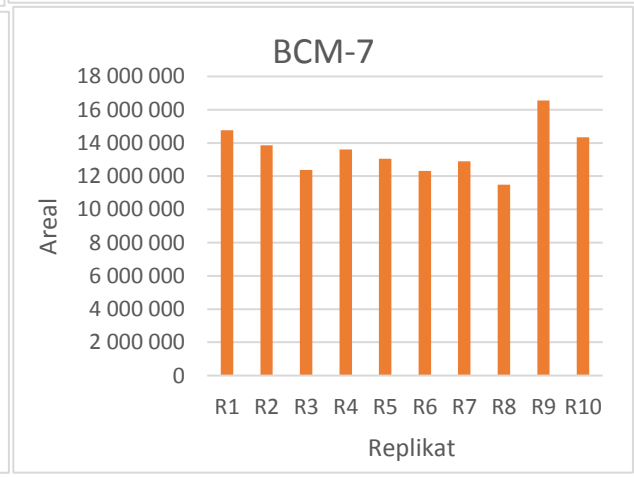
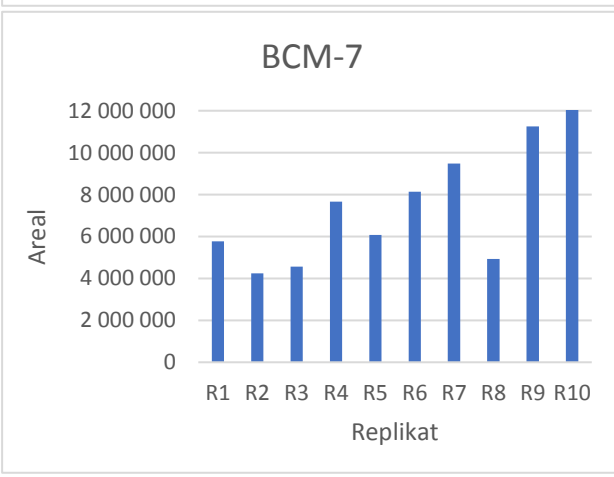
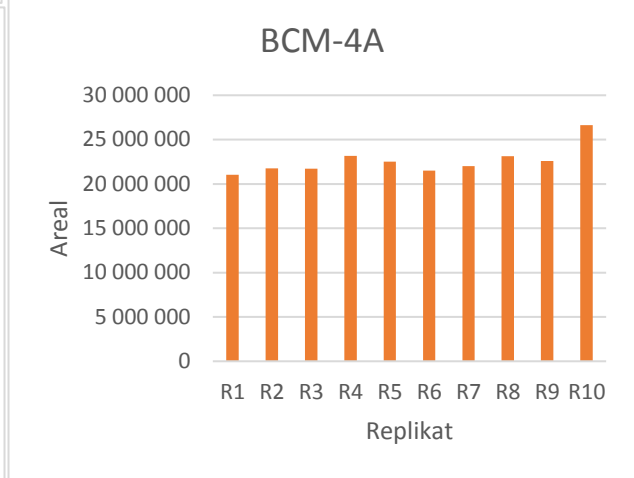
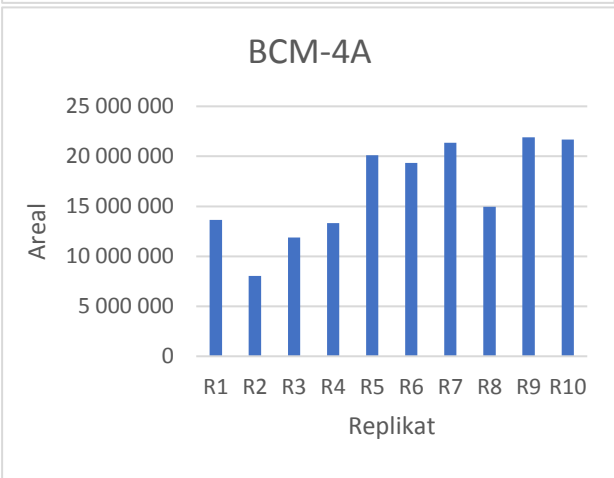
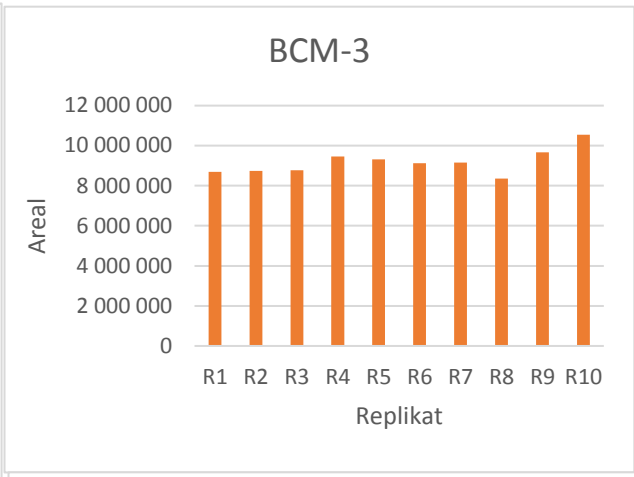
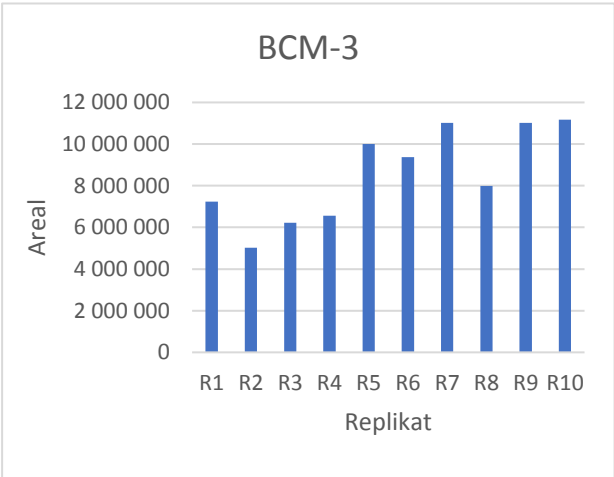
Repetierbarheten innen hver peptid ser til å være stabil med lite avik for alle spenningene som ble prøvd ut (tabell 30), men deteksjonen var absolutt større ved 4000 og 4500 V. kapilærespenning på 4000 V ble valgt videre i metodene fordi det ikke var noe hensikt i å bruke høyere spenning når gevinsten i deteksjon var omtrent den samme.

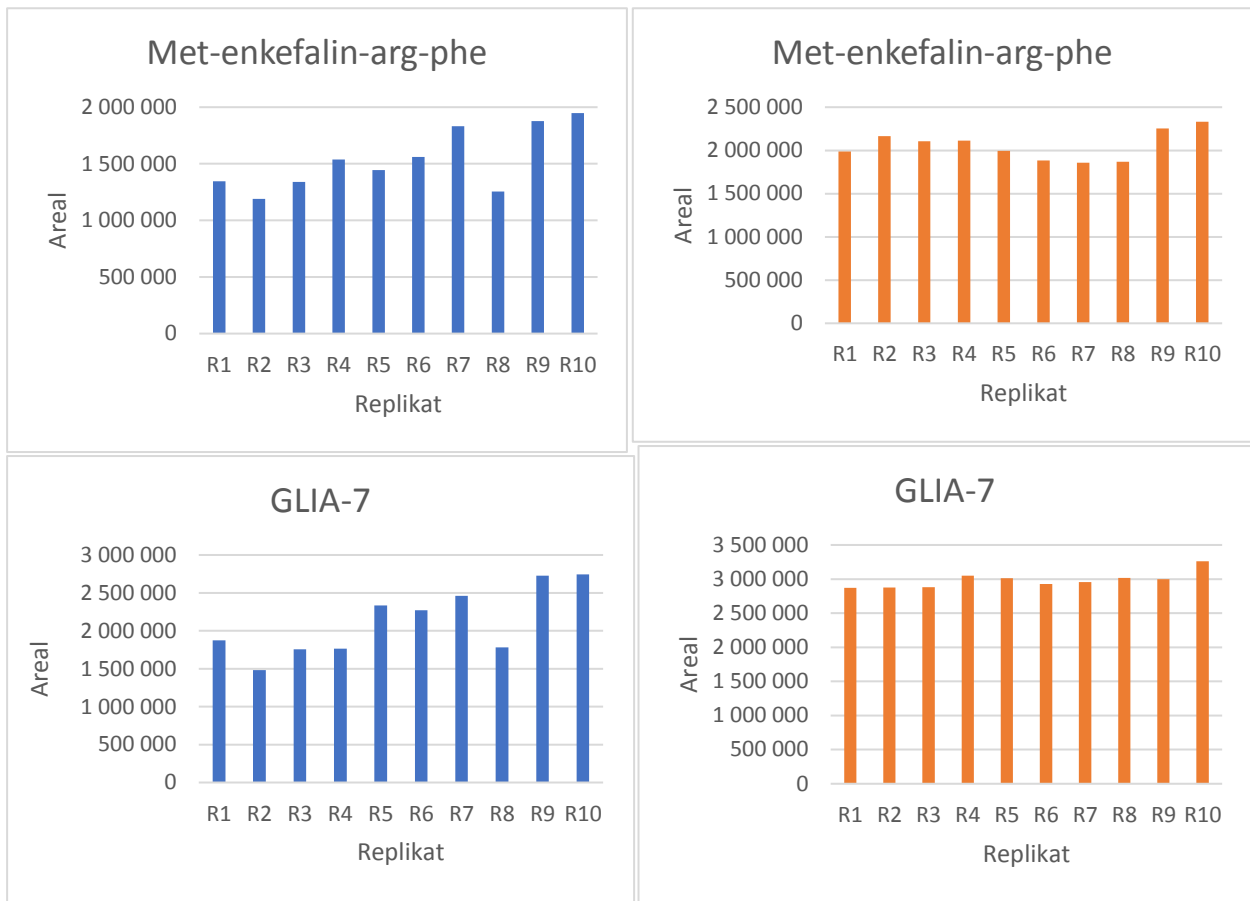
Tabell 30: Viser RSD beregning for 5 peptider ved kapilærespenning (2500, 3000, 3500, 4000, 4500) volt. Hver peptid har blitt injisert i 4 replikater (n=4)

Peptid	2500 V RSD (%)	3000 V RSD (%)	3500 V RSD (%)	4000 V RSD (%)	4500 V RSD (%)
BCM-3	6	2	3	2	1
BCM-4A	3	3	1	2	2
BCM-7	1	2	6	1	3
Met-enkefalin- arg-phe	5	4	5	1	1
GLIA-7	3	2	2	1	2

4.3.5 Sensitivitet før og etter optimalisering av MS-instrumentet

Etter optimalisering av ESI parameterne ble det tatt 10 injeksjonsreplikater for den nye optimaliserte metoden for å observere deteksjon av peptidene. Vi sammenlignet det med 10 injeksjonsreplikater med den gamle eksisterende metoden som tidligere studenter hadde brukt i denne oppgaven, og det ble sett endringer både i deteksjon og repetierbarhet i form av RSD. I figur 28 er det blitt vist 5 peptider før og etter optimalisering. Vi ser klart at etter optimalisering er det bedre deteksjon av peptider og bedre repetierbarhet. Repetierbarheten kan måles ved RSD og i tabell (31 og 32) kan man se at RSD for den optimaliserte metoden er mye lavere enn for den gamle metoden. Samtidig ble LOD beregnet for peptidene for den gamle og optimaliserte metoden, ved statistiske beregninger (95% konfidensnivå). LOD verdiene ble betydelig lavere ved den optimaliserte metoden. Peptidblanding konsentrasjonen som ble injisert i LC-MS for begge metodene var 125 ng/ml.





Figur 28: Viser forskjell i intensitet av 5 peptider før optimalisering (venstre) og etter optimalisering (høyre). Peptidene har en konsentrasjon på 125 ng/ml og det er blitt gjort 10 injeksjonsreplikater (n=10)

Tabell 31: Viser gjennomsnittsareal, standardavvik, RSD og LOD for 5 peptider ved MS-metode før optimalisering

Peptid	Mean (areal)	SD (areal)	RSD (%)	LOD (95 %) (ng/ml)
BCM-3	8560352	2252242	26	16,8
BCM-4A	16619725	4884131	29	17,7
BCM-7	7422550	2797138	38	21,5
Met-enkefalin-arg-phe	1533110	270232,2	18	11,1
GLIA-7	2119540	445561,5	21	12,2

Tabell 32: Viser gjennomsnittsareal, standardavvik, RSD og LOD for 5 peptider ved MS-metode før optimalisering

Peptid	Mean	SD	RSD (%)	LOD (95 %) (ng/ml)
BCM-3	9183348	620850,5	7	4,3
BCM-4A	22606755	1579460	7	4,2
BCM-7	13526591	1455922	11	6,1
Met-enkefalin-arg-phe	2056026	165625,5	8	5,1
GLIA-7	2985447	115307,3	4	2,2

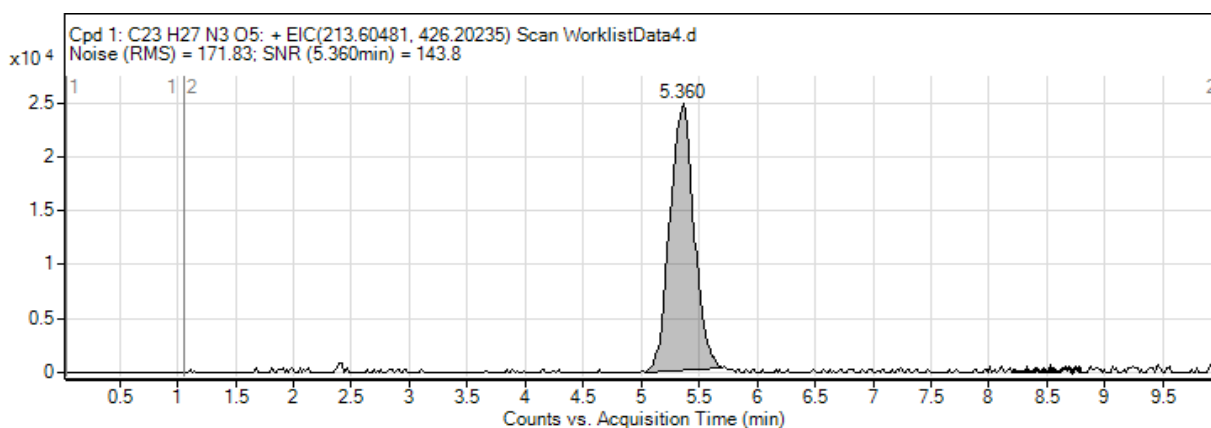
4.3.6 LOD av peptider ved bruk av statistisk bergning og SNR

LOD beregning i denne oppgaven har hittil basert seg på IDL metode med hypotestetesting, hvor rene standarder har blitt analysert. Peptidblanding på 125 ng/ml ble injisert i LC-MS for deretter å analysere deteksjonen av peptidene. Det ble valgt ut 5 peptider blant 11 peptidblanding. Det ble bestemt å velge ut peptider som ga LOD i lavt, middels og høy konsentrasjon, se (tabell 33), slik at vi kunne estimere både de peptidene som ga lavest, middels og høyest konsentrasjon og se om vi kunne gå lengre ned i deteksjonsgrense. LOD beregningen ble estimert gjennom statistiske beregninger ved å bruke ensidig t-test. Dette ville deretter gi oss en pekepinn hvor lavt i konsentrasjon vi kan gå hvor vi fortsatt kan detektere peptider, hvor det er en signifikant forskjell i areal mellom peptid og blindprøve

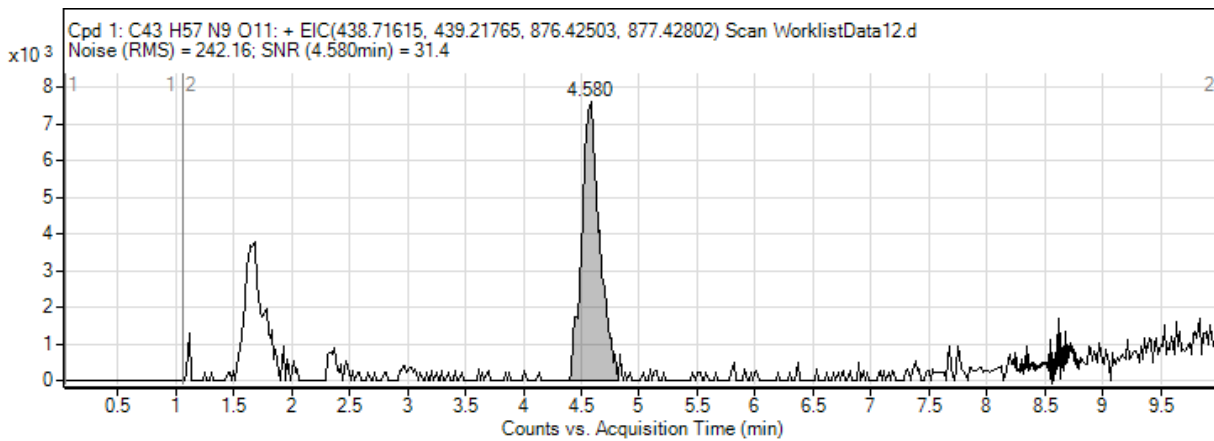
Deretter lagde vi rene standarder for hver og enkelt peptid av de valgte peptidene i LOD konsentrasjonen som ble estimert ved ensidig t-test. Hvert enkelt peptid ble kjørt i LC-MS for å se om vi fortsatt kunne detektere peptider. Det ble observert deteksjon av alle 5 peptider. Vi brukte deretter SNR metode for å se om LOD var enda lavere enn hva vi hadde oppnådd via statistiske beregninger. Vi beregnet de nye LOD konsentrasjonene til peptidene ved å ekstrahere peptidene EIC og deretter beregne SNR. Vi brukte deretter (formel 13) for å beregne de nye LOD basert på SNR.

Tabell 33: Viser LOD av 5 peptider ved å bruke SNR i dataprogrammet (Basert på SNR)

Peptid	BCM-3	GLU-C	GLIA-7	BCM-4	BCM-7
Konsentrasjon injisert (ng/ml)	4,3	3,5	2,2	6,3	6,1
LOD basert på SNR (pg/ml)	89,6	214,3	206,3	254,4	150,9



Figur 29: Viser EIC av BCM-3, der dataprogrammet har kalkulert SNR til 143,8



Figur 30: Viser EIC av gliadorfin, der dataprogrammet har kalkulert SNR til 31,4

Ved å bruke SNR som deteksjonskriterie ble det observert at vi kunne gå enda lavere ned i konsentrasjon av peptidene. (Tabell 33) viser at når vi går over til å bruke SNR som mål på LOD så er det mulig å gå ned fra ng/ml til pg/ml. Spørsmålet blir da hvilke deteksjonskriterie er påliteligst å bruke? I dette tilfellet ble det observert lavere LOD når vi brukte SNR metode sammenlignet med statistiske beregninger. Det neste spørsmålet blir da om toppene for de beregnede SNR-verdiene faktisk er synlige. Dette kunne gjøres ved å injisere standarder med LOD verdiene for SNR metoden for å se om de faktisk er detekterbare.

4.4 Prøveopparbeiding og gjenfinningsgrad

I denne oppgaven ble 3 prøveopparbeidingsteknikker anvendt for å se hvilket som ga mest gjenfinning av peptider. En utbredt teknikk som brukes er standard proteinfelling, såkalt "crash precipitation", hvor organisk løsemiddel tilsettes peptidene, for å utfelle de store proteinene. Samt en metode hvor proteielling ved hjelp av RPPT-brønnplater. Disse metodene ble brukt som referanseteknikk som ble målt opp mot prøveopparbeiding av peptider i DBS for å se hvilke metoder som ga best gjenfinningsgrad. Det ble også tatt negative kontroller for de 3 metodene for å sjekke matriksprofil.

4.4.1 Kartlegging av matrikseffekter – bruk av negative kontroller

Negativ kontroll, eller blindprøver, er prøver som ikke inneholder peptidene våre. I denne oppgaven er det blitt gjort bruk av flere typer negative kontroller:

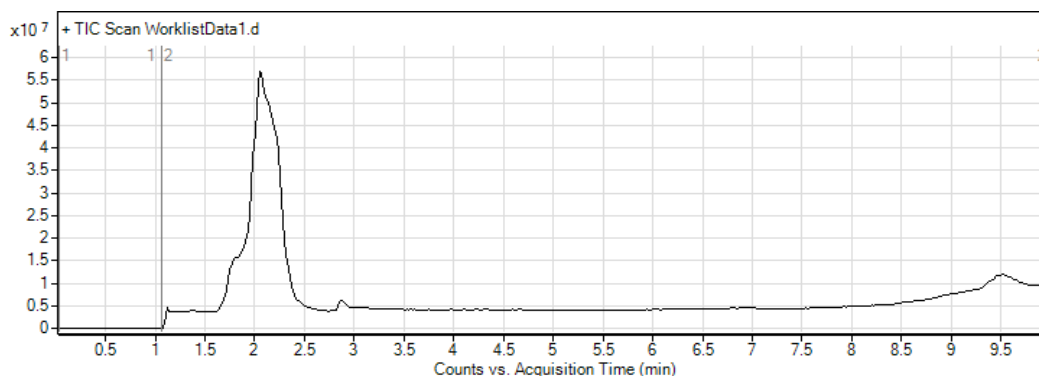
1. Kun Milli-Q vann og 0,1% FA,
2. Opparbeidet plasma med 0,075 M sitronsyre i RPPT-brønnplate,
3. Opparbeidet DBS med tilsatt Milli-Q vann og 0,1%,
4. Opparbeidet DBS med tilsatt plasma og 0,075M sitronsyre,
5. Opparbeidet DBS med fullblod med og uten 0,075M sitronsyre

Negative kontroller er viktige for å sikre sjekke bakgrunnsbidraget fra prøvematriks og eventuelle kontaminasjoner i det analytiske systemet. Her har vi sett etter forbindelser som eventuelt befinner seg i

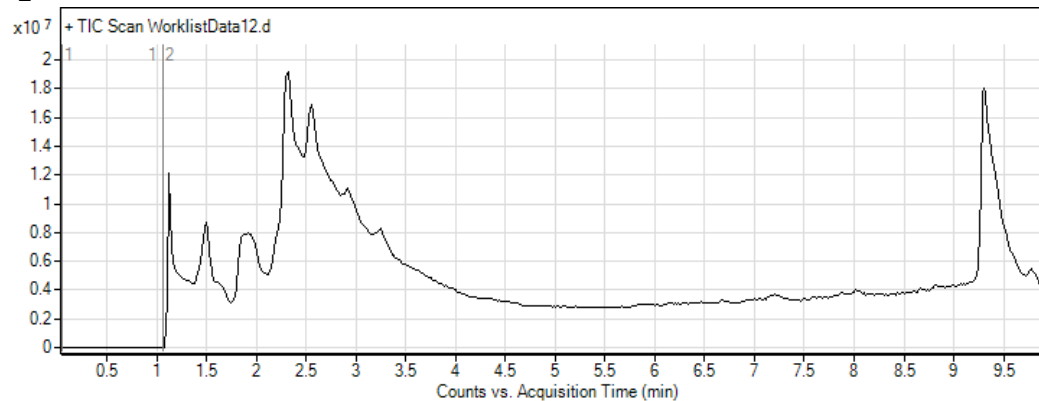
de 5 ulike testmatriksene over, noe som gir oss kjennskap til matriksbidraget i peptidanalysene. Det ble bnyttet negative kontroller alltid før positive prøver (peptidblanding med vann, plasma eller fullblod) i alle forsøkene, for å se på matrikseffekten og om matriksforbindelsene elueres i samme tidspunkt som våre peptider. Resultater fra negative kontroller er vist i (figur 31).

I blindprøven som inneholder Milli-Q vann med 0,1% FA (1) er det hydrofile forbindelser som elueres først. Disse forbindelsene kan komme både fra selve blindprøven, men også mest sannsynlig fra reservoar flaskene som kjører inn mobilfasene Milli-Q vann og ACN med 0,1% FA. Disse forbindelsene elueres veldig tidlig og vil ikke ha noe interferens med analyttene. Lipofile forbindelser elueres sist ut av kolonnen. Man kan fjerne de lipofile forbindelsene som sitter godt i kolonnen med rent ACN eller MeOH. I blindprøven med plasma (2) ser man hydrofile forbindelser som har kommet videre med analyttene etter prøveopparbeidelsen som elueres først. Disse forbindelsene elueres med en større bredde og kan interferere med noen av peptidene våre. Man ser også en stor topp på slutten av kromatogrammet som tyder på lipofile forbindelser som elueres. Toppen ser ut til å elueres fullstendig ved enden av kromatogrammet ned til grunnlinjen. Blindprøve med plasma i DBS (4) viser de samme hovedtrekkene som blindprøve i plasma ved ordinær prøve, men man ser en mye mindre lipofil fraksjon på slutten av kromatogrammet ved DBS. Dette tyder på noe av den lipofile fraksjonen også fjernes ved opparbeidning av DBS som gir en mer renere prøve. I blind prøve med fullblod i DBS dukket det opp flere topper midt i kromatogrammet. Fullblod har flere komponenter enn plasma, og dermed vil matrikseffekten være større. Det tyder på at det kan være lipofile fraksjoner, siden disse toppene elueres sent i kromatogrammet. Disse fraksjonene kan påvirke deteksjonen av peptidene som kommer i det tidspunktet.

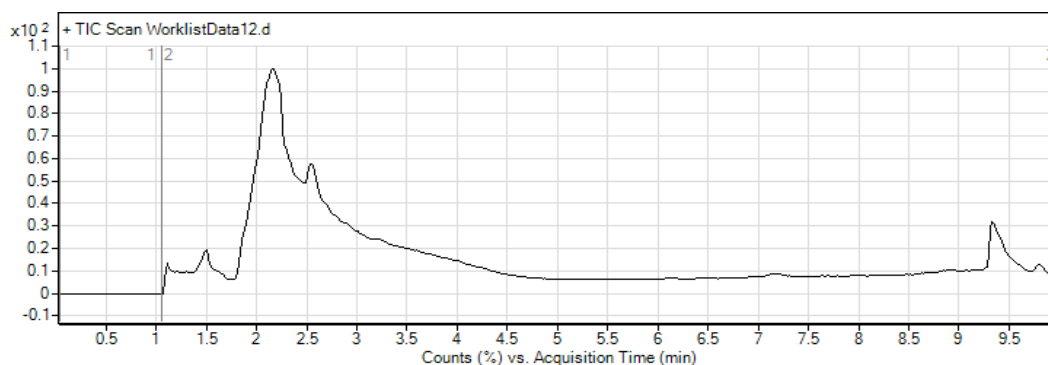
1



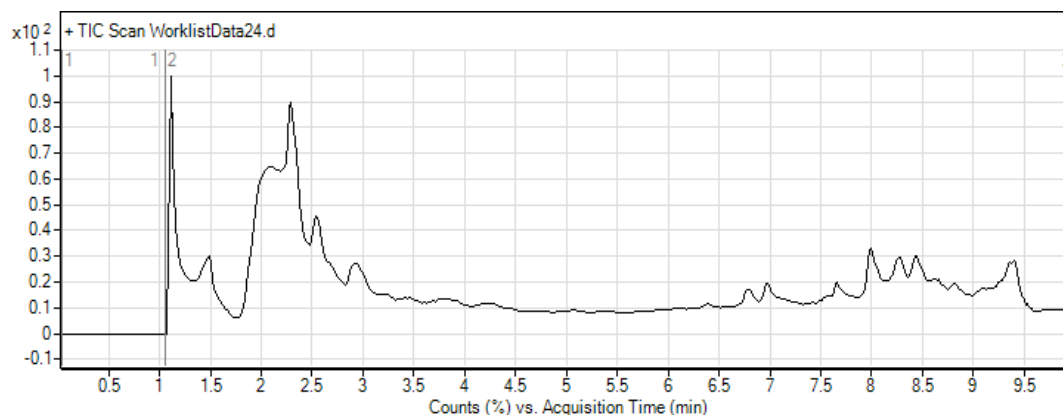
2



3



4



Figur 31: Viser negative kontroll prøver av Milli-Q vann med 0,1% FA (1), plasma med 0,075M sitronsyre RPPT (2), plasma med 0,075M sitronsyre (DBS) (3) og fullblod med 0,075M (DBS) (4)

4.4.2 Gjennfinningsgrad ved bruk av standard proteinfelling

I forsøket med en standard proteinfelling ble det observert varierende resultater av peptidenes gjennfinningsgrad. Ved konsentrasjoner på 50 ng/ml ble kun BCM-7 og met-enkefalin detektert ved 6 replikatprøver hvor hver ble injisert 4 ganger. Når det gjelder de andre peptidene så ga det veldig varierende resultater mellom replikatprøvene. Det ble detektert veldig lave nivåer av peptider i noen av prøvereplikatenes, mens i noen ble det ikke detektert noe. Men for de fleste prøvene ble det ikke detektert noen peptider.

Metoden med standard proteinfelling gjøres ved å tilsette plasma med peptidblanding i fellingsreagenset ACN i forholdet 1:3, (se eksperimentelt kapittel 3.7.4.1). Deretter sentrifugeres reagenset i 10 minutter. Deretter overføres supernatanten til en ny rør. Dette medfører til en ekstra trinn der supernatanten må pipetteres ut uten å få med seg de utfelte proteinene, men samtidig få med seg mest mulig av supernatantet, slik at vi taper minst mulig analytt. Dette trinnet kan være avgjørende for å få respons i MS, dermed skal man være så nøyaktig som mulig under pipetteringen av supernatanten. Men dette trinnet vil være den største faktoren som gir de store variasjonen i respons basert på hvor mye analytt som blir med videre til MS.

Tabell 34: Viser gjennfinningsgrad av opparbeidelsesteknikken standard proteinfelling ved peptidkonsentrasjonene 50, 500 og 5000 ng/ml.

Konsentrasjon (ng/ml)	Parameter	BCM-3	BCM-4A	BCM-7	met-enkefalin-arg-phe	GLIA-7
50	Gjennfinningsgrad (%)	ND*	ND*	42,6	51,3	ND*
	RSD (%)			31,2	26,4	
500	Gjennfinningsgrad (%)	29,2	32,2	25,3	38,4	ND*
	RSD (%)	21,6	25,4	36,7	31,9	
5000	Gjennfinningsgrad (%)	18,4	9,4	14,1	11,7	11,9
	(RSD %)	29,1	37,3	42,5	40,2	29,6

*ND = Not detected

4.4.3 Gjennfinningsgrad ve bruk av RPPT-brønnplater

I forsøkene vi utførte ved å benytte RPPT-brønnplater var gjennfinningsgrad for de de 5 peptidene ved 50 ng/ml omtrent over 70%, se (tabell 35). Resultatene for de 6 replikatene var stabile og reproducerbare for de fleste peptidene.

RPPT-brønnplaten inneholder et filter som filtrerer bort de store proteinene når det påføres vakuuum. I dette forøket ble vakuuumtrykket en viktig faktor for å få filtrert de store proteinene, slik at peptidene kom seg gjennom. Restek som er produsenten til RPPT- brønnplatene som vi brukt anbefaler et undertrykktrykk på 2-9 Hg. Trykket var ca. 5 Hg for de fleste forsøkene som ble utført. Ved de første forsøkene var trykket litt ustabil pga. manifoldet var ikke helt tett og det ble observert trykk over 10 Hg. Resultatet ble at de store proteinene ble også med videre gjennom filteret. Dette kunne man se tydelig i rørene at en gul/hvit stoffer ved bunnen av rørene. Dette måtte sentrifugeres ved 10 minutter og deretter måtte supernatant tas ut akkurat som for standard proteinfelling

Tabell 35: Viser gjennfinningsgrad av opparbeidelsesteknikken RPPT-brønnplater ved peptidkonsentrasjonene 50, 500 og 5000 ng/ml. Hver konsentrasjons nivå er kjørt i 6 prøver (n=6)

Konsentrasjon (ng/ml)	Parameter	BCM-3	BCM-4A	BCM-7	Met-enkefalin-arg-phe	GLIA-7
50	Gjenfinningsgrad (%)	73,4	70,6	82,3	87,1	68,9
	RSD (%)	5,5	7,1	8,8	4,1	5,6
500	Gjenfinningsgrad (%)	69,6	63,4	69,2	71,4	71,8
	RSD (%)	10,7	12,6	9,2	7,7	10,1
5000	Gjenfinningsgrad (%)	62,7	57,7	61,8	69,6	72,6
	RSD (%)	14,1	13,7	15,2	9,3	13,4

4.4.5 Gjenfinningsgrad av peptider i fullblod og plasma i DBS

Deteksjon av peptider på papirkort ble gjort for peptidblandinger løst i henholdsvis Milli-Q vann med 0,1% maursyre (standardprøve), plasma med 0,075 M sitronsyre og i fullblod med og uten sitronsyre. Det ble laget 6 spotter for hver gruppe (standardprøve, plasma og fullblod med og uten sitronsyre). Hver spot ble opparbeidet som forklart i kapittel 3.7.4.3 og deretter analysert i LC-MS. Det ble observert variasjoner mellom spottene som ble målt i RSD, se tabell 36

Tabell 36: Viser reativ standard avik (%) for 6 spotter med peptidblanding i vann, plasma og fullblod med og uten sitronsyre (n=6).

Peptidkonsentrasjon	Parameter	Vann og 0,1 % FA	Plasma m/sitronsyre	Fullblod m/sitronsyre	Fullblod u/sitronsyre
1000 ng/ml	Gjenfinningsgrad (%) RSD (%)				
BCM-3	Gjenfinningsgrad (%) RSD (%)	16	153 22	120 26	112 23
BCM-4A	Gjenfinningsgrad (%) RSD (%)	14	640 32	390 27	376 36
BCM-7	Gjenfinningsgrad (%) RSD (%)	37	66 41	60 40	76 37
Met-enkefalin-arg-phe	Gjenfinningsgrad (%) RSD (%)	ND*	** 21	** 26	** 24
GLIA-7	Gjenfinningsgrad (%) RSD (%)	17	299 15	150 22	138 19

* = Not detected

** Det ble observert topper av met-enkefalin-arg-phe i plasma og fullblod med og uten sitronsyre, men det var ikke en referanse vi kunne sammenlikne disse toppene med

Dette kommer mest sannsynlig av opparbeidelsesteknikk, pipettering og punchemetode. Måten man påsetter peptidene på DBS papirene kan påvirke hvordan peptidene diffunderer på papiret. Vi prøvde å pipettere i sentrum av DBS papiret slik at diffusjonen tok plass fra sentrum og radielt utover papiret. Men når man pipetterer manuelt, kan det påføre usikkerhet hvis man ikke er stødig i hendene når man pipetterer dråpene over til DBS. Det vil alltid ligge en usikkerhet når man puncher hvert spot manuelt på DBS papirene, og man skal være nøyaktig og prøve å punche alle prøvene på samme måte.

Injeksjonsreplikaten viste god repeterbarhet innen hver spot. Det viser at det er lite fluktiasjon i deteksjon i LC-MS-instrumentet

Peptidkonsentrasjon som ble pipetert over på DBS papiret var 1000 ng/ml i utgangspunktet. Det ble pipetert 20 ul for rene standarder, mens for plasma og fullblod med og uten sitronsyre ble det pipetert 50 ul. Denne volumforskjellen ble gjort av 2 grunner:

1 Viskositet: Vann har en mye lavere viskositet enn plasma og fullblod og dermed et volum over 20 ul viste å diffundere utenfor spotteområdet

2 Usikkerhet i deteksjon: Det var en usikkerhet om hvor mye som kunne detekteres ved plasma og fullblod, dermed ble en høyere volum tilsatt der, hvor det ikke gikk utover spotteområde.

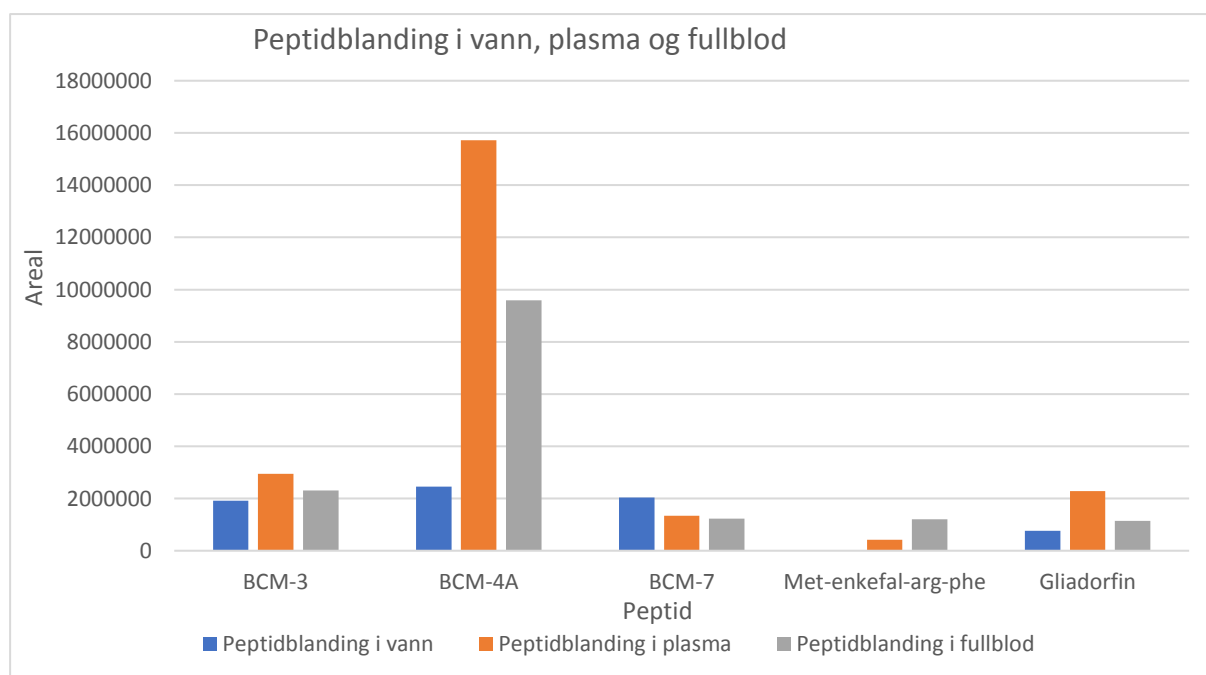
Denne volumforskjellen ble justert når vi skulle beregne gjenfinningsgrad av peptidene ved å multiplisere de rene standardene med faktor 2,5. Ved å beregne gjenfinningsgrad og deteksjon av peptidene ble det sett at peptidene hadde høyere deteksjon i plasma og fullblod enn renestandarder, se (figur 32). I teorien skal gjenfinningsgrad ligge under 100 % når man har vært gjennom en opparbeidelsesprosess i motsetning

til rene standarder. Her ble det foreslått at de rene standardene som vi har brukt ikke er et godt referanse system for å sammenligne med biologiske prøver som plasma og fullblod. Det kan muligens testes standardprøver bestående av fysiologisk saltvann 0,9%, hvor det kan antakelig være en mer sammenlignbar referanse. Ved tabell 36 vises gjenfinningsgrad av peptidene BCM-3, BCM-4A, BCM-7, met-enkefalin-arg-phe og gliadorfin, hvor de fleste peptider hadde en gjenfinningsgrad over 100%.

Mellom fullblod og plasma ble det også observert en forskjell i deteksjon, hvor plasma viste å gi en høyere deteksjon, se tabell 36. Fullblod skiller seg fra plasma ved at den inneholder røde blodceller og hvite blodceller. Det er de røde blodcellene som vil være den store faktoren i dette tilfellet siden de avgjør ca 41 % av hele blodet, mens de hvite blodcellene avgjort omtrent 4 %.[66] Viskositet kan endre resultatene av DBS fordi viskositeten bestemmer hvor langt blodet difunderer seg på DBS papiret. Spotteområdet av prøven har vanligvis et omvendt lineært forhold til hematokritene. Hvor blod med høyt hematokritnivå resulterer i en midre spot, mens en lavere hematokritverdi forårsaker en større spot.[67] Dette ble også sett ved å sammenligne plasmaprøvene i forhold til fullblod, hvor plasmaprøvene difunderte lengre ut i DBS-papirene i forhold til fullblod.

Hematokrit-effekten er kjent for å påvirke påliteligheten og kvaliteten av prøver i stor grad. Hvis blodet sprer seg ujevnt på DBS papirene, kan området som er punchet for analyse, variere til tross for den utbredte antagelsen om at punch av samme størrelse inneholder samme mengde analytt. Videre kan blodcellene selv forårsake variasjoner i mengden av analytt som er ekstraherbare fra overflaten av selve DBS-kortet.[67]

Ved å punche hele spotteområdet på DBS-papiret er en måte å unngå variasjonen som skyldes ikke-homogenitet og de forskjellige blodspredningstallene på grunn av hematokritnivå. Dette skjer vanligvis hvor hele spottet blir kuttet fra papiret. I denne oppgaven punchet vi ut 6 puncher som var omtrent 1/3 av spotteområdet. Denne teknikken har utviklet seg med tid hvor ferdig kuttet DBS-papirer er laget. På denne måten spotter man DBS papiret på ferdig kuttet papirene og dermed analyserer hele spottene. På denne måten eliminerer man hematokrit-effekten. [54, 67]



Figur 32: Viser intensitet av 5 peptider i rent vann, plasma og fullblod. Referanseprøvene viser lavere intensitet enn peptider i plasma og fullblod. Det tyder på at referanseprøvene ikke er egnet i DBS-prøver

4.4.6 Deteksjon av peptider i fullblod med og uten sitronsyre i DBS

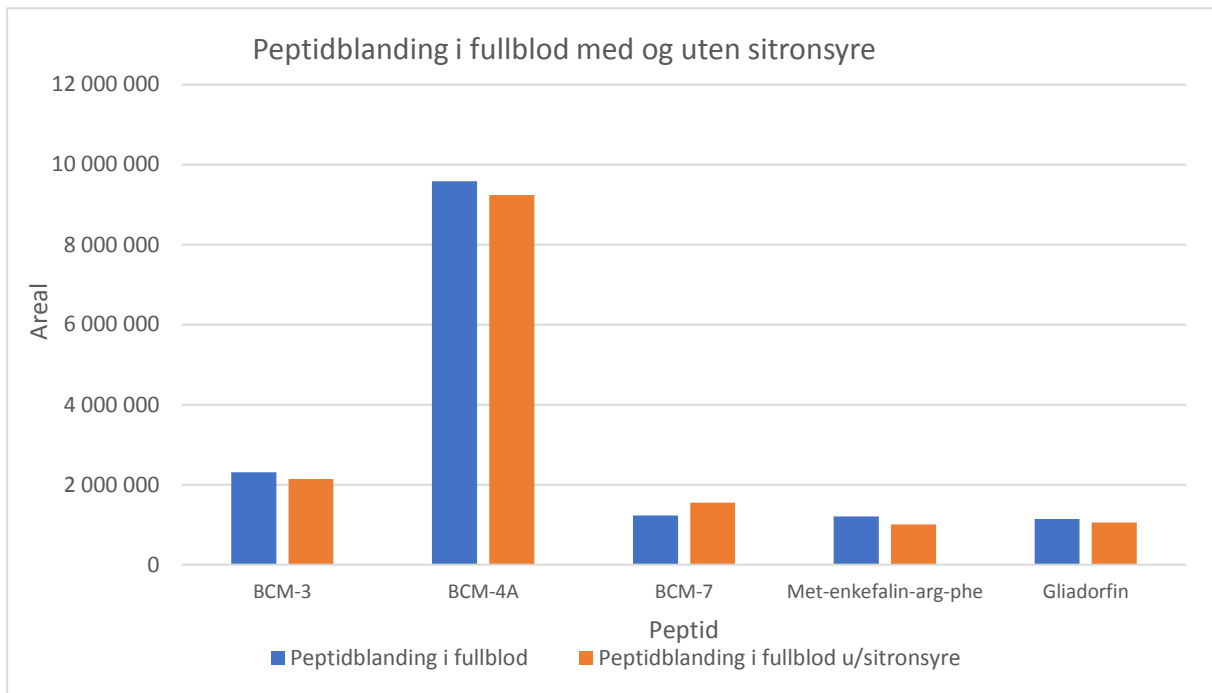
Når man jobber med biologiske prøver som fullblod og plasma vil disse prøvene bestå av mange komponenter som store proteiner, enzymer, lipider, salter m.m. DPPIV er et nedbrytningsenzym som finnes i store mengder i slike prøver. Disse enzymene spalter ned lange aminosyrekjeder til kortere kjeder og frie aminosyrer.[68] Sitronsyreløsning ved 0,075 M hemmer DPPIV-enzymet. Det er en del utfordringer å tilsette sitronsyre i biologiske prøver, spesielt fullblod. Sitronsyren har en tendens til å hemolysere de røde blodlegemene, noe som vi også opplevde under denne oppgaven. Dermed ble dråpevis av sitronsyren tilsatt om gangen til prøvene og deretter ristet forsiktig for å unngå hemolyse. Denne prosessen er krevende og må gjøres forsiktig og nøyaktig for å unngå hemolyse. Det ble dermed foreslått å forsøke en testprøve hvor prøveløsningen var uten sitronsyre. Vi hadde en hypotese hvor vi antok at DBS papiret ville kanskje hemme DPPIV-enzymet når vi spotter prøvene på DBS. Målet var å unngå å bruke sitronsyre slik at vi unngikk risikoen for hemolyse. Dette ville også være en fordel hvor man slipper en ekstra trinn i prøvetakingen, nemlig tilsetningen av sitronsyre i blodprøvetakingsglasset.

Resultatet for analysering av peptid i fullblod uten sitronsyre sammenlignet med prøver med sitronsyre ble samlet og observert. Det viste seg at DPPIV-enzymet ikke påvirket peptidene i stor grad, se figur 33. Man ser en trend hvor peptidene som var tilsatt sitronsyre har en litt høyere deteksjon. Det kan være to faktorer som fører til dette:

Nednrytning av peptider: Under prøveopparbeidelsesprosessen blir peptidene spiket i fullblod uten sitronsyre. det vil gå en tid hvor peptidene er i fullblodet med aktive DPPIV-enzymet før de blir spottet på papiret. Dette tidsrommet kan være en faktor på hvor mye peptider vi får på DBS-papirene. I denne oppgave ble peptidene spiket i fullblodet uten sitronsyre og spottet på DBS så fort som mulig. I denne prosessen vil det alltid gå litt tid pga. at man skal lukke lokket på rørene og dermed riste spike- løsningen slik at peptidene er godt blandet i fullblodet og deretter spotte.

Prøvetakingsteknikk: Denne forskjellen i deteksjon kan også være avhengig av spotteteknikk og puncheteknikk, og hvor nøyaktig dette gjøres. Når man bruker en manuellpuncher og skal punche 6 puncher i hver DBS spot kan det gi variasjoner. Forskjellene i deteksjon mellom peptider med og uten sitronsyre er ikke så store i dette tilfellet, og det kan dermed tenkes at opparbeidelse teknikk også kan være en faktor som gir de forskjellene i deteksjon

Gjenfinningsgraden i peptidene i fullblod med og uten sitronsyre er vist i tabell 38. Forskjell i gjenfinningsgrad mellom peptidene med og uten sitronsyre er ikke så store, noe så gjenspeiler deteksjonen mellom dem som allerede er forklart ovenfor. Men vi ser igjen at referanseprøvene ikke er optimale for disse prøvene som gir gjenfinningsgrad over 100 %.



Figur 33: Viser intensitet av peptider i fullblod med og uten 0,075 M sitronsyre i DBS

Metodens detekjsonsgrens MDL ble estimert for peptidblanding i fullblod med og uten tilsatt sitronsyre. 50 μ l av 1000 ng/ml peptidblanding med fullblod (med og uten sitronsyre) ble spottet på DBS papir. Det vil si at det vil være 50 ng av hvert peptid på DBS papiret. Seks puncher fra spotten ble tatt ut videre ved å bruke en manualpuncher på 3 mm. Disse 6 punchene blir deretter ekstrahert med 80% MeOH med 0,1% FA. Etter inndampning ble prøven rekonstituert med 200 μ l vann med 0,1 % FA, og vi vil anslagsvis gjenstå med konsentrasjoner rundt 70-80 ng/ml hvis man antar at alt av peptidene er blitt ekstrahert fra punchene, og at peptidene er uniformt fordelt i papiret. Dette er som sagt kun et estimat, men det gir oss en pekepinn om hvor store mengder av hvert peptid som må være i blod-spot'en for at vi skal kunne påvise dem med gjeldende analysemetode.

LOD av peptidblanding med fullblod med og uten sitronsyre ble estimert i ekstraherte peptider ved å bruke SNR som deteksjonskriterium, se tabell 37. LOD verdiene viste overraskende lave verdier både i peptidene med og uten sitronsyre. For de fleste peptider viste peptider med sitronsyre å gi en lavere LOD som korolerer med deres høye SNR-verdier som igjen kommer av hvor mye peptider som blir detektert. Det er en liten trend hvor peptidene med sitronsyre gir en lavere LOD, men denne forskjellen er ikke stor, se tabell 38. Når man sammenligner gjenfinningsgrad av peptider i fullblod med og uten sitronsyre, ser det ut som at peptidasene ikke har så stor påvirkning på peptidene i DBS, se (tabell 36). Dermed kan man eliminere sitronsyren i opparbeidelsesprosessen. Dette vil også være til fordel under opparbeidelsesprosessen hvor man unngår å riskere at de rødeblodcellene går i hemolyse når man tilsetter sitronsyre.

MDL beregninger basert på LOD verdiene i ekstraherte peptider av 6 puncher (tabell 38) ga oss muligheten til å beregne MDL-verdier, se (tabell 39). Dette vil gi oss en pekepinn på hvor mye peptider vi må tilsette i utgangspunktet, før prøveoppbeidelse, for å ende opp med LOD-verdiene som er vist i (tabell 38). MDL metode som ble benyttet for deteksjon av peptider i fullblod med og uten sitronsyre har har påvist peptidene i LC-MS. Det skal videre sies at denne metoden ikke er optimalisert, men var en test som gikk ut på å se om peptider på DBS kunne detekteres ved LC-MS. Vi har også klart å vise at det ikke

er er behov for å tilsette sitronsyre til peptidene i fullblod, muligens fordi peptidasene hemmes på DBS papiret. Vi har også estimert LOD -verdier for peptidene hvor man kan forvente hvor lavt man kan måle disse peptidene ved å bruke DBS.

Tabell 37: Viser ekstraherte verdier av SNR for 5 peptider i EIC programmet. Peptidkonsentrasjon som er brukt er blitt korigert for renhet og assay

Peptidkonsentrasjon (80,0 ng/ml)	SNR for DBS i fullblod m/sitronsyre	SNR for DBS i fullblod u/sitronsyre
BCM-3	801,2	765,6
BCM-4A	531,5	511,8
BCM-7	227,4	236,2
Met-enkefalin-arg-phe	91,0	79,6
GLIA-7	56,2	54,1

Tabell 38: Viser LOD-verdier for ekstraherte peptider i fullblod med og uten sitronsyre etter prøveopparbeidelse. Konsentrasjon av peptider er korigert for renhet og assay.

Peptidkonsentrasjon (80,0 ng/ml)	LOD fullblod med sitronsyre (ng/ml)	LOD fullblod u/sitronsyre (ng/ml)
BCM-3	0,31	0,32
BCM-4A	0,43	0,45
BCM-7	0,96	0,92
Met-enkefalin-arg-phe	2,65	3,04
GLIA-7	3,95	4,10

Tabell 39: Viser MDL verdier estimert for 5 peptider. Dette forteller antall ng/ml som skal være tilstedet ved utgangspunktet i spotten før opparbeidelse for å kunne detektere peptider i konsentrasjonen vist i (tabell 38)

Peptid	MDL fullblod m/sitronsyre (ng/ml)	MDL fullblod u/sitronsyre (ng/ml)
BCM-3	3,32	3,42
BCM-4A	4,66	4,84
BCM-7	10,32	9,89
Met-enkefalin-arg-phe	28,57	32,69
GLIA-7	42,51	44,15

4.4.7 Sammenlikning av prøveopparbeidelsesmetoder og gjenfinningsgrad

Prøveopparbeidelse teknikken mellom standard proteinfelling og proteinfelling med RPPT-brønnplate viste at bruk av brønnplater var den metoden som var raskest, effektivt og enklest å bruke i forhold til standard proteinfelling metoden. Her kunne man opparbeide flere prøver samtidig og det var raskt å gjennomføre. Prøveopparbeidelses teknikk var enkelt fordi ekstraksjon og proteinfellingen skjedde i et steg, dette gjorde at prøveopparbeidelsen ble gjort raskere med tanke på tidsbruk. Samtidig var det

effektivt at både ekstraksjon og proteinfelling skjedde i et steg, slik at man unngikk å overføre analytten over til et nytt rør og resultere i massetap. Det var mindre arbeidstrinn, som dermed resulterte i mindre feiltrinn og dermed flere analytter som ble med til LC-MS. Dette er også blitt vis ved tidligere oppgave. [62]

Resteks RPPT-brønnplater klarer ikke å fjerne fosfolipidene fra plasma. Brønnplatene består av et dobbelt filter som filtrerer bort utfelte proteiner. Ulempen med fosfolipider er at dem har en tendens til å gi ionesuppresjonseffekter, slik at det blir mindre deteksjon av analytter. Det er vanskelig å si om fosfolipidene i disse prøvene har gitt ionesuppresjon og eller hvor mye i så fall. For de fleste peptidene har RPPT- brønnplatene gitt god gjenfinningsgrad og repeterbarhet ved lave prøvekonsentrasjoner som 50 ng/ml.

Prøvetaking og opparbeing av peptider i DBS ble gjort i vann, plasma og fullblod med og uten sitronsyre. Denne metoden er mer krvende enn proteinfelling med RPPT-brønnplater. Prøvetakingmetoden består av mange trinn som f.eks. spotting, punching, ekstraksjon og overføring av analytt. Mellom disse trinnene øker man sannsynligheten for feil og massetap. Spotte-teknikk må gjøre forsiktig slik at hver dråpe treffer samme område, for å unngå variasjon i spredning. Punche-teknikken i denne oppgaven har vært bestående av en manuellpuncher. For å unngå feil skal hver punch tas omtrent på samme område i hvert DBS spot for å minnere variasjon. Realtivstandardavik er målt for peptidene i DBS vist i (tabell 36). det er tydelig en stor forskjell i presisjonen mellom opparbeiding ved DBS sammenliknet med RPPT-brønnplater, som kan tydes på ikke-optimal prøvetakingsteknikk. Ekstraksjonsmetoden i denne oppgaven var basert på en metode som brukes i sykehuset i Ullevol for å ekstrahere metabolitter i fullblod. Denne metoden er helle ikke optimalisert for å kunne gi klart overblikk over hvor effektivt DBS er som metode. Negative kontroller for plasma i DBS sammenliknet med RPPT-brønnplate tyder på at matriks er renere i DBS prøver, se (figur 31). Den lipofile fraksjonen er betydelig lavere for DBS som kan være en fordel, siden lipofile forbindelser kan gi ionesuppresjon. Det var ikke mulig å sammenlikne gjenfinningsgrad av peptidene i DBS med RPPT-brønnplater, på grunn av ugunstig referanseprøver ved DBS som ga gjenfinningsgrad over 100 %. Det ble ikke funnet noe god grunn til hvorfor peptidene i DBS med fullblod og plasma hadde gjenfinnings grad over 100% sammenliknet med referanseprøver i Milli-Q vann og 0,1 % FA. Det ble foreslått at fysiologisk saltvann (0,9 %) som referanse muligens kunne være mer egnet, siden plasma og fullblod er i et slikt miljø naturligt.

Realtivutbytte ble beregnet for peptid i plasma for RPPT-brønnplate sammenliknet med peptid i plasma med DBS. Det viste seg at amid analogene BCM-4A og BCM-5A ga en større realtivutbytte i DBS sammenliknet med prøver i RPPT-brønnplater. Ved DBS prøver viste realtivutbytte for BCM-4A å bli 35% og BCM-5A 30%, mens for peptider opparbeidet med RPPT-brønnplate ble verdiene i realtiv utbytte for BCM-4A 25% og BCM-5 18%. Resterende peptidene hadde sammenlikbare relativutbytte for begge metodene. Det kan tyde på at amidanalogene er stabile ved bruk av DBS og gir dermed en høyere utbytte i forhold til opparbeiding med brønnplater.

Prøvetaking og opparbeidelse med DBS viser til stor potensial for anvendelse til å detektere endogene og eksogene opioide peptider. Det skal også sies at en fullstедning optimalisering av både prøvetakingsteknikk (spotteteknikk og puncheteknikk) og opparbeidelsemetoden (ekstrajsonløsninger) er nødvendig for å kunne anvende DBS som metode.

5. Konklusjon og videre arbeid

I denne oppgaven har vi utviklet og utprøvd ulike HPLC-MS-metoder for å optimalisere separasjon og deteksjon av peptider. En peptidblanding bestående av 11 peptider hvor noen bestemte peptider ble videre analysert basert på deres fysikalsk og kjemiske egenskaper og deres opphav. Eksogene peptider som kasomorfiner (BCM-3, BCM-4A og BCM-7), gluteneksorfiner (gliadorfin-7) og en endogen peptid (met-enkefalin-arg-phe) ble dermed valgt for å studere videre. Under LC-metode utvikling ble det utprøvd to typer separasjonskolonne C₁₈ og C₈. Det ble utprøvd 3 ulike opparbeidelsesteknikker under denne oppgaven for å ekstrahere analytt fra biologisk væske som fullblod og plasma.

Under LC-metodeutviklingen viste det seg at C₈-separasjonskolonnen ga best separasjon og deteksjon av peptidene i forhold til C₁₈-når 25 ng/ml renestanderder ble injisert. C₈-kolonnen har en smalere id som er 2,1 mm i forhold til C₁₈-kolonnen som er 3.0 mm, som kan være grunnen til at vi får lavere deteksjonsgrense og separasjon av peptidene. Peptidene ble separert ved hjelp av en gradienteluering hvor mobilfasesammensetningen besto av en blanding av Milli-Q vann og ACN hvor begge faser var tilsatt 0,1% FA.

Elueringsrekkefølgen av 11 peptider ble bestemt med den optimaliserte HPLC-metoden. 4 peptider følgende følgende peptider (BCM-4A, BCM-7, GLIA-7 og met-enkefalin-arg-phe) ble valgt å se nærmere på for å forklare elueringsmønstret basert på deres fysikalsk og kjemisk struktur. Disse peptidene ble valgt for å dekke peptider som var stammet fra kasein, gluten og ikke minst en naturlig peptid. Rekkefølgen av eluering av de valgte peptidene ble som følgende: GLIA-7, BCM-4A, met-enkefalin-arg-phe og til sist BCM-7. Basert på molekylmassene til de ulike analyttene, var det forventet at gliadorfin skulle elueres ut sist da den har høyest karboninnhold. Det at gliadorfin elueres ut først, tyder på at den har en topologi som separasjonskolonnen opplever som ganske hydrofil. Det ville ha vært interessant med en konformasjonsstudie av peptidet for å se om molekylet har en konformasjon som gjør det polart på sin ytre overflate. Elueringsrekkefølgen til de tre andre analyttene kan forklares ut fra molekylene totale ladning og karboninnhold.

Under MS-metodeutvikling ble 4 parametere i ESI forsøkt for å optimalisere ionekilden. Disse er kappegass temperatur, kappegass hastighet, nebulizer trykk og kapilærespenning. Det viste seg at en kombinasjon av høy kappegass temperatur, kappegass hastighet og kapilærespenning sammen med lavt nebulizer trykk ga lavest deteksjonsgrense og samtidig reproducerbare prøver med lav RSD. Deteksjonsgrensen av disse peptidene er blitt estimert ved hjelp av to ulike deteksjonskriterier hvor den ene er basert på SNR og den andre en ved hjelp av statistisk beregning.

Instrumentets deteksjonsgresne (IDL) ble beregnet for rene standarder hvor det ble injisert 125 ng/ml av peptidblanding. Både statistiske beregninger og SNR-målinger ble brukt som deteksjonskriterier for å estimere deteksjonsgrensen til 5 bestemte peptider. Ved å bruke statistiske bergeninger basert på ensidig-t-test, ble 10 repikatinjeksjoner benyttet og LOD ble estimert. Deteksjonsgrensen for BCM-3 ble 4,3 ng/ml, BCM-4 6,3 ng/ml, BCM-7 6,1 ng/ml, GLU-C 3,5 ng/ml og GLIA-7 2,2 ng/ml. Det ble deretter laget rene standarder for hvert enkelt peptid i LOD konsentrasjonene for å se om vi kunne detektere peptidene fortsatt. Alle 5 peptider ble detekter ved LOD konsentrasjoner. Nye LOD ble beregnet ved å bruke SNR som deteksjonskriterie. Dette viste seg at vi fikk enda lavere LOD når vi bruke SNR for å måle LOD. Deteksjonsgrensen for BCM-3 ble 89,6 pg/ml, BCM-4 254,4 pg/ml, BCM-7 150,9 pg/ml, GLU-C 214,3 pg/ml og GLIA-7 206,3 pg/ml.

Under prøveopparbeidelse ble effektivitet, reproduserbarhet og gjenfinningsgrad av ulike prøveopparbeidelsesteknikker undersøkt, hvor det ble observert at RPPT-brønnplater var den enkleste metoden å bruke. Den var effektiv ga høyest gjenfinningsgrad sammenliknet med standard proteinfelling. Fellingensreagenset som ble brukt var ACN med 0,1% maursyre. Peptidblanding i konsentrasjon på 50 ng/ml i plasma ga en gjenfinningsgrad på over 70 % for de fleste peptidene med proteinfelling i brønnplater.

Den siste metode var basert på DBS noe som var nytt i denne oppgaven. I denne oppgaven ble det brukt DBS filter papir Whatman 903. Her ble peptidblandinger løst i Milli-Q vann og 0,1% FA (rene standarder), plasma og fullblod. Deretter spottet på DBS papir og ekstrahert med MeOH og 0,1% FA. Det viste seg at peptidblanding i plasma og fullblod med og uten sitronsyre ved DBS ga gjenfinningsgrad over 100 % for de fleste peptider. Det tydet på at Milli-Q vann og 0,1 % FA ikke var en gunstig referanse ved DBS. Videre viste det seg at gjenfinningsgraden var høyere for peptidblanding i plasma enn for fullblod. Det ble også observert at sitronsyren ikke hadde stor betydning som peptidasehemmer ved bruk av DBS. Det antas at peptidasene hemmes på DBS-papirene når prøven adsorberes. Å ikke behøve sitronsyre kan forenkle prøveopparbeidningen og det fører til mindre fare av hemolyse av blodprøvene

Metodens deteksjonsgrense MDL ble grovt estimert for peptider i fullblod med og uten sitronsyre for å gi et pekpinn på hvor mye peptider som må være til stedet i prøven før opparbeidelse for at LC-MS instrumentet skal kunne detektere det. MDL ble beregnet ved å bruke SNR som deteksjonskriterie. For peptidblanding i fullblod med sitronsyre ble det anslått: BCM-3 ble 3,32 ng/ml, BCM-4A 4,66 ng/ml, BCM-7 10,32 ng/ml, Met-enkefalin-arg-phe 28,57 ng/ml og for GLIA-7 42,51 ng/ml. For peptidblanding i fullblod uten sitronsyre ble verdiene for BCM-3 3,42 ng/ml, BCM-4A 4,84 ng/ml, BCM-7 9,89 ng/ml, Met-enkefalin-arg-phe 32,69 ng/ml og GLIA-7 44,15 ng/ml.

Relativutbytte ble beregnet for peptider i plasma ved DBS sammenliknet med peptid i plasma ved RPPT-brønnplate. Det viste seg at amidanalogene BCM-4A og BCM-5A hadde høyere reaktivutbytte ved DBS sammenliknet med RPPT. Ved DBS prøver viste reaktivutbytte for BCM-4A å bli 35% og BCM-5A 30%, mens for peptider opparbeidet med RPPT-brønnplate ble verdiene i reaktiv utbytte for BCM-4A 25% og BCM-5 18%. Det kan tyde på at amidanalogene er stabile ved bruk av DBS og gir dermed en høyere utbytte i forhold til opparbeidning med brønnplater.

For å kunne si om metoden er egnet til klinisk bruk er det viktig å ta hensyn til hva som er både normalverdier hos friske mennesker og konsentrasjoner i patologiske prøver. Det ble derfor gjort et litteratursøk, der resultatet viste at det er gjort mye på urin, men lite på blod. Det ble funnet verdier for patologiske konsentrasjoner i plasma for BCM-5 ca. 15000 ng/ml og BCM-7 ca. 4,7 ng/ml. Patologiske konsentrasjoner i urin er blitt sett i BCM-7 hvor konsentrasjonen er ca. 75 pg/ml. Det ble ikke funnet noe litteratur på patologiske prøver av den andre peptidene.

I denne oppgaven har vi oppnådd å gå i enda laver IDL ved den optimale LC-MS metoden enn tidligere, hvor vi har gått fra ng/ml til pg/ml. Under analyse av DBS var målet i utgangspunkt å teste ut filterpapirene for å se om vi fikk deteksjon av peptider. Dette har vi klart å vise gjennom denne oppgave. Det ble også påvist at peptidaseeffekt på peptider i fullblod ikke har stor betydning ved DBS, og dermed blir det ikke behov å bruke sitronsyre i viderearbeid. Dette vil være til stor fordel hvor man slipper å risikere at blodprøvene går i hemolyse.

Til videre arbeid har ikke denne oppgaven tatt hensyn til lipidfraksjonene i plasma eller fullblod under prøveopparbeidelsen grunnet av begrenset tid. Lipider har en tendens til å gi ionesuppresjon i LC-MS.

Det hadde vært interessant å utvikle en metode med fastfase ekstraksjon hvor disse også kan bli opprenset. Og deretter observere om det gir høyere deteksjon for peptidene med den optimale LC-MS metoden. DBS forsøket i denne oppgaven har vist at det er mulig å bruke disse filterpapirene for å detektere opioide peptider. Det er fortsatt stor potensial for forbedring av DBS metoden, hvor prøvetakingteknikk og opparbeidelsesteknikk kan optimaliseres. Det er nødvendig med en optimal spotte og punche teknikk for å unngå store variasjoner mellom hver prøve. En optimal ekstraksjonsløsning er viktig for å overføre mest mulig peptider til LC-MS. I denne oppgaven ble det brukt ekstraksjonsløsning egnet for metabolitter. Det er ikke sikkert denne ekstraksjonsmetoden er optimal for våre peptider. Refferansesystemet hvor peptider var tilsatt i Milli-Q-vann og 0,1% FA var ikke egnet i DBS forsøkene, hvor gjenfinnsgrad ga over 100 % for de fleste peptider i plasma og fullblod. En annen type refferanseprøve kan prøves, eksempelvis fysiologisk saltvann (0,9%). Til slutt må peptidprøvene i DBS gjøre kvantitativ sammen med internstandard og deretter valideres for hvor egnet denne metoden er. Dette er viktige momenter som bør jobbes videre med dersom metoden skal fullvalideres til rutinekjøringer ved klinisk validering.

Referanseliste

1. Lemke TL, et al. 2013. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer [Hentet 01. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2M7DFIk>.
2. Sokolov O, Kost N, Andreeva O, Korneeva E, Meshavkin V, Tarakanova Y, et al. 2014. Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides*. [s. 68-71]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2EuDlXy>.
3. Pruimboom L, de Punder K. 2015. The opioid effects of gluten exorphins: asymptomatic celiac disease. *Journal of Health, Population, and Nutrition*. [Hentet 14. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2WogiIa>.
4. Cade R, Privette M, Fregly M, Rowland N, Sun Z, Zele V, et al. 2000. Autism and Schizophrenia: Intestinal Disorders. *Nutr Neurosci*. [s. 57-72]. [Hentet 03. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2YOkTn>.
5. Reichelt KL, Tveiten Bioengineer D, Knivsberg A-M, Brønstad G. 2012. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microbial Ecology in Health and Disease*. [Hentet 09. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2K1VMqd>.
6. Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, Fregly M. 2003. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides*. [s. 937-43]. [Hentet 15. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2EuEhew>.
7. Svedberg J, de Haas J, Leimenstoll G, Paul F, Teschemacher H. 1985. Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides*. [s. 825-30]. [Hentet 17. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2Qwet6x>.
8. Wasilewska J, Sienkiewicz-Szlapka E, Kuźbida E, Jarmołowska B, Kaczmarek M, Kostyra E. The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). *Neuropeptides*. 2011;45(3):189-95.
9. Wasilewska J, Kaczmarek M, Kostyra E, Iwan M. 2011. Cow's-milk-induced Infant Apnoea With Increased Serum Content of Bovine β -Casomorphin-5. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. [s. 772-5]. [Hentet 26. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VRahIS>.
10. Tidsskriftet for legeförening (Karl Bjørnar Alstadhaug ea. 2012 Hodepine etter spinalpunksjon. [Oppdatert 17. april 2012] [Hentet 19. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/30HNbz0>.
11. Suissa MR, Rønning, P.O. Veiledningstimer. OsloMet. Fakultet for helsevitenskap 2018/2019
12. Dale J. 1978. Stereochemistry and conformational analysis. Oslo, New York. 1 ed
13. Ballantyne CJ, Sullivan DM. 2017. Discovery of endogenous opioid systems: what it has meant for the clinician's understanding of pain and its treatment. *PAIN*. [s. 2290-300]. [Hentet 15. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HA5oHi>.
14. Kapitzke D, Vetter I, Cabot PJ. 2005. Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Therapeutics and clinical risk management*. [s. 279]. [Hentet 17. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2JCnCdl>.
15. Koneru A, et al. 2009. Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors. [Hentet 26. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HChhMW>.
16. Udenfriend S, Meienhoffer, J. 1984. Opioid peptides: Biology, Chemistry, and Genetics. Vol. 6.: Academic Press, Inc Orlando, Florida;
17. Holck P. basalgangliene: Store medisinske leksikon. [Oppdatert 22. november 2018] [Hentet 27. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HF9Xjj>.
18. Jansen J, Glover, J. hjernen: Store medisinske leksikon. [Oppdatert 15. april 2019] [Hentet 05. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/30YMgue>.
19. Jianqin S, Leiming X, Lu X, Yelland GW, Ni J, Clarke AJ. 2016. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition Journal*. [Hentet 04. januar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2W4JkT>.

20. Yoshikawa M. 2015. Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides*. [s. 208-25]. [Hentet 30. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VL1GhS>.
21. Wermuth CG, et al. 1998. *Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry* London: IUPAC [Hentet 02. februar 2018]. Tilgjengelig fra: <http://tiny.cc/9sjh7y>.
22. Yoshikawa M. Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides*. 2015;72:208-25.
23. McGregor R, Poppitt S. 2013. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutrition & Metabolism*. [Hentet 05. januar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2M6yodW>.
24. Kamiński S, Cieślińska A, Kostyra E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*. 2007;48(3):189-98.
25. Ballantyne JC, Sullivan MD. Discovery of endogenous opioid systems: what it has meant for the clinician's understanding of pain and its treatment. *Pain*. 2017;158(12):2290.
26. Kamiński S, Cieślińska A, Kostyra E. 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*. [s. 189-98]. [Hentet 11. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VJV1EA>.
27. Pruijboom L, Punder Kd. The opioid effects of gluten exorphins: asymptomatic celiac disease. *The Journal of Health, Population and Nutrition*. 2017;33(2).
28. Sun Z, Cade JR. 1999. A Peptide Found in Schizophrenia and Autism Causes Behavioral Changes in Rats. *Autism*. [s. 85-95]. [Hentet 03. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2YKSk07>.
29. de Magistris L, et al. . 2014. *Comprehensive guide to autism. Intestinal Barrier in Autism*. London, UK: Department of Clinical Biochemistry;
30. Chemicalize. Kalkulering av endogene og eksogene opioide peptider ved bruk av calculation-modus . . [Hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VVQuUq>.
31. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. 2006. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scandinavian journal of gastroenterology*. [s. 408-19]. [Hentet 08. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2XID1SI>.
32. Isaksen H. 2012. Proteininntak og atferd. Mulig sammenheng mellom opptak av peptider til sirkulasjonen og deres påvirkning på sentralnervesystemet: Universitet i Oslo.
33. Sienkiewicz-Szłapka E, Jarmołowska B, Krawczuk S, Kostyra E, Kostyra H, Bielikowicz K. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal*. 2009;19(4):252-7.
34. Pedersen BS, Rasmussen, K.E. 2010. *Legemiddelanalyse*. Oslo: Fagforlaget. 2 ed
35. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. 2015. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*. [s. 1064-78]. [Hentet 25. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2QmYTu0>.
36. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*. [s. 13-25]. [Hentet 11. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2K3THKj>.
37. Diamond B, Huerta PT, Mina-Osorio P, Kowal C, Volpe BT. 2009. Losing your nerves? . *Nature Reviews Immunology*. [s. 449]. [Hentet 04. april 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HM54W2>.
38. Golden PL, Pollack GM. 2003. Blood-brain barrier efflux transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. [s. 1739-53]. [Hentet 19. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2wiSOpf>.
39. Jarmołowska B, Teodorowicz M, Fiedorowicz E, Sienkiewicz-Szłapka E, Matysiewicz M, Kostyra E. 2013. Glucose and calcium ions may modulate the efficiency of bovine β -casomorphin-7 permeability through a monolayer of Caco-2 cells. *Peptides*. [s. 59-67]. [Hentet 26. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2EwHD0L>.
40. Van Dorpe S, Adriaens A, Polis I, Peremans K, Van Bocxlaer J, De Spiegeleer B. 2010. Analytical characterization and comparison of the blood-brain barrier permeability of eight opioid peptides. *Peptides*. [s. 1390-9]. [Hentet 05. april 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2YIW2OU>.

- 41.Sienkiewicz-Szłapka E, Jarmołowska B, Krawczuk S, Kostyra E, Kostyra H, Bielikowicz K. 2009. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal*. [s. 252-7]. [Hentet 06. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2JF1mzm>.
- 42.Detel D, Peršić M, Varljen J. 2007. Serum and Intestinal Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Activity in Children With Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. [s. 65-70]. [Hentet 07. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2M96myz>.
- 43.Helsenorge. Schizofreni. [Hentet 12.10.18 17.03.2015]. Tilgjengelig fra: <https://helsenorge.no/sykdom/psykiske-lidelser/schizofreni>.
- 44.Johannessen J. 2011. Schizofreni – omfang og betydning. [Hentet 15. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2Z35LA1>.
- 45.NEL. Schizofreni - omfang og betydning: Norsk elektronisk legehåndbok. [Oppdatert 04. april 2018] [Hentet 14. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HMsmuL>.
- 46.FHI. Fakta om autisme: FHI. [Oppdatert 03. november 2011] [Hentet 07. april 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2Kqyv38>.
- 47.Panksepp J. 1979. A neurochemical theory of autism. *Trends in Neurosciences*. [s. 174-7]. [Hentet 13. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2X64gAf>.
- 48.Manninen S, Tuominen L, Dunbar RI, Karjalainen T, Hirvonen J, Arponen E, et al. 2017. Social Laughter Triggers Endogenous Opioid Release in Humans. *The Journal of Neuroscience*. [s. 6125-31]. [Hentet 04. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2JFpHF5>.
- 49.Knivsberg A-M, Reichelt K-L, Høien T, Nødland M. 2003. Effect of a Dietary Intervention on Autistic Behavior. Focus on Autism and Other Developmental Disabilities. [s. 248-57]. [Hentet 17. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2M9fu69>.
- 50.Helsebibloteket. 2013 Apparent Life-Threatening Event –ALTE- in infants: Norsk barneforening. [Hentet 23. januar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2M8pz39>.
- 51.Wasilewska J, Sienkiewicz-Szłapka E, Kuźbida E, Jarmołowska B, Kaczmarek M, Kostyra E. 2011. The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). *Neuropeptides*. [s. 189-95]. [Hentet 28. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2JCZrvf>.
- 52.Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, Fregly M. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides*. 2003;24(6):937-43.
- 53.NCF. 2017 Hva er cøliaki? : Norsk cøliakiforening. [Hentet 05. april 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2EKtPzK>.
- 54.Zakaria R, Allen KJ, Koplin JJ, Roche P, Greaves RF. 2016. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *EJIFCC*. [s. 288]. [Hentet 04. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2K4Q8Uu>.
- 55.Helsenorge. Undersøkelser av nyfødte og nyfødtscreening: Helsedirektortet. [Oppdatert 29. juni 2016] [Hentet 15. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2X6g1H1>.
- 56.universitetssykehus O. Nyfødtscreening Oslo. Oslo Universitetssykehus. [Oppdatert 27. februar 2019] [Hentet 18. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2wk8CZ6>.
- 57.Bassaganyas L, Freedman G, Vaka D, Wan E, Lao R, Chen F, et al. 2018. Whole exome and whole genome sequencing with dried blood spot DNA without whole genome amplification. *Human Mutation*. [s. 167-71]. [Hentet 03. januar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VMRzsP>.
- 58.de Sain-van Der Velden MGM, van Der Ham M, Jans JJ, Visser G, van Hasselt PM, Prinsen HCMT, et al. 2015. Suitability of methylmalonic acid and total homocysteine analysis in dried bloodspots. *Analytica Chimica Acta*. [s. 435-41]. [Hentet 05. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2YJRRt3>.
- 59.Wilson I. 2011. Global metabolic profiling (metabonomics/metabolomics) using dried blood spots: advantages and pitfalls. *Bioanalysis*. [s. 2255-7]. [Hentet 17. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HRcDJG>.
- 60.Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. 2014. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. [s. 195]. [Hentet 09. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VPvr0W>.

61. Lawson A, Bernstone L, Hall S. 2016. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. *Journal of Medical Screening*. [s. 7-16]. [Hentet 03. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/30JB7gE>.
62. Vu J. 2018. Separasjon og kvantifisering av opioide peptider i blod ved hjelp av LC-MS Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, Fakultet for medisin og helsevitenskap, og OsloMet, Farmasiutdanning (HF/TKD).
63. Tran T. 2017. Analyse av opioide peptider i blodprøver ved hjelp av HPLC-MS Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, Fakultet for medisin og helsevitenskap, og OsloMet, Farmasiutdanning (HF / TKD).
64. Bylda C, Thiele R, Kobold U, Volmer DA. 2014. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst*. [s. 2265-76]. [Hentet 03. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://rsc.li/2WngkQG>.
65. IUPAC. 2014. Compendium of Chemical Terminology: IUPAC [Hentet 05. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2MaXCrD>.
66. Husøy A-M. 2012. Blodprøvetaking i praksis 2. utg. Oslo: Cappelen Damm Akademisk;
67. Velghe S, Delahaye L, Stove CP. 2019. Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. [s. 188-96]. [Hentet 27. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2Wjff2N>.
68. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. 2012. *Handbook of Proteolytic Enzymes*: Elsevier Science [Hentet 24. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2Wofinx>.
69. Hagelia EB, Stanikzai, M. . 2015. Development and validation of method for analyzing opioid peptides in blood. Institute for Industrial development, Høgskolen in Oslo and Akershus.
70. Rønning PO. 2016. Prøvetaking og prøveopparbeidelse. Institutt for maskin elektronikk og kjemi Høgskolen i Oslo og Akershus.
71. Bueno JS, Silva BJB, Queiroz MEC. 2011. Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples by protein precipitation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. [s. 1221-8]. [Hentet 05. januar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VQH0tu>.
72. RESTEK. Resprep PPT3 96-Well Plates. [Hentet 22. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2VLoFsV>.
73. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;90(2):195.
74. Watson DG. 2010. The potential of mass spectrometry for global profiling of parasit metabolomes. *Parasitology*. [s. 1409-23]. [Hentet 18. januar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2QjNqva>.
75. Wong P, James, C. 2014. *Dried Blood Spots: Applications and Techniques*: Wiley [Hentet 15. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2MntJV4>.
76. Sandås EM. 2018. Liquid chromatography – Orbitrap mass spectrometry is a useful tool in untargeted metabolomics analysis of dried blood spots in clinical chemistry [Master]. Universitet i Oslo.
77. Harris DC. 2007. *Quantitative chemical analysis* 7.ed. New York, USA: W. H. Freeman and Company
78. Ismail B, Nielsen, S. 2014. *Basic Principles of Chromatography*. [Hentet 05. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2YOy4lv>.
79. Taylor ToKS. *Mobile Phase Optimization Strategies for Reversed Phase HPLC*: Chromacademy. [Hentet 12. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2wrmuAM>.
80. Taylor ToKS. *The Theory of HPLC. Chromatographic Parameters*: Chromacademy. [Hentet 06. november 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2JO2i4F>.
81. Rønning PO. 2015. *Væskrokromatografi; instrumentering, mobilfaser og stasjonærfaser*. Institutt for maskin elektronikk og kjemi Høgskolen i Oslo og Akershus.

82. Neue UD. 2005. Theory of peak capacity in gradient elution. *Journal of chromatography A*. [s. 153-61]. [Hentet 05. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2XkXCq3>.
83. Rønning PO. 2015. Innføring i massespektrometri. Institutt for maskin elektronikk og kjemi Høgskolen i Oslo og Akershus.
84. Taylor ToKS. *Fundamental LC-MS, Electrospray Ionisation* Crawford Scientific: Chromacademy. [Hentet 12. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2X51KKP>.
85. Li K-Y, Tu H, Ray AK. 2005. Charge limits on droplets during evaporation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. [s. 3786]. [Hentet 12. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2Wj5wDd>.
86. Hughes J, editor. *Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS/MS Users Workshop*. USA: Agilent; 2012.
87. Fjelstad J. 2003 *Time-of-Flight Mass Spectrometry USA*. Agilent Technologies. [Hentet 14. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2Ex3Qvx>.
88. Tremsin AS, McPhate JB, Steuwer A, Kockelmann W, M Paradowska A, Kelleher JF, et al. 2012. High-Resolution Strain Mapping Through Time-of-Flight Neutron Transmission Diffraction with a Microchannel Plate Neutron Counting Detector. *Strain*. [s. 296-305]. [Hentet 04. april 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HTg7eG>.
89. Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR. 2011. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry*. [s. 38-46]. [Hentet 23. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2JIYodx>.
90. Welling SH, Hubálek F, Jacobsen J, Brayden DJ, Rahbek UL, Buckley ST. 2014. The role of citric acid in oral peptide and protein formulations: Relationship between calcium chelation and proteolysis inhibition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. [s. 544-51]. [Hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2YKkyiJ>.
91. Björkesten J, Enroth S, Shen Q, Wik L, Hougaard D, Cohen A, et al. 2017. Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. [s. 1286-96]. [Hentet 02. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2EvrR69>.
92. Sheehan T. 2015. What's the most meaningful standard for mass spectrometry: instrument detection limit or Signal to noise ratio? [Hentet 06. april 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2EwTr2Y>.
93. EPA USEPA. 2018 Code of Federal Regulations, Title 40: protection of environment, part 136, Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutant USA. [Hentet 21. april 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2wha52b>.
94. Shimadzu. Differences Between Using Acetonitrile and Methanol for Reverse Phase Chromatography: Shimadzu. [Hentet 09. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2I64LUC>.
95. Biopharmaceutics. mai 2018. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM)*. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2QDA5yh>.
96. Zhou S, Prebyl BS, Cook KD. 2002. Profiling pH Changes in the Electrospray Plume. *Analytical Chemistry*. [s. 4885-8]. [Hentet 07. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2WgU8IF>.
97. Girod M, Dagany X, Boutou V, Broyer M, Antoine R, Dugourd P, et al. 2012. Profiling an electrospray plume by laser-induced fluorescence and Fraunhofer diffraction combined to mass spectrometry: influence of size and composition of droplets on charge-state distributions of electrosprayed proteins. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. [s. 9389-96]. [Hentet 07. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2XlazA2>.
98. Wang R, Allmendinger P, Zhu L, Grohn AJ, Wegner K, Frankevich V, et al. 2011. The role of nebulizer gas flow in electrosonic spray ionization (ESSI). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. [s. 1234-41]. [Hentet 15. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://bit.ly/2HP25La>.

Vedlegg

1.1: Viser areal, RSD og LOD for 9 peptider før optimalisering av ESI for 10 injeksjonsreplikater (n=10)

Peptid	Areal (mean)	SD	RSD (%)	(RSD)mean)	MSA	LOD (95 %) (ng/ml)
BCM-3	8560352	2252242	26	712221	1305502	16,8
BCM-4	9817159	3492519	36	1104432	2024423	20,8
BCM-4A	16619725	4884131	29	1544498	2831065	17,7
BCM-5	6232455	2225473	36	703756	1289986	21,3
BCM-5A	13652047	4491496	33	1420336	2603475	18,3
BCM-7	7422550	2797138	38	884532	1621348	21,5
GLU C	6185754	1328437	21	420088	770022	12,2
Met-enkefali-arg-phe	1533110	270232	18	85454	156639	11,1
GLIA-7	2119540	445561	21	140898	258268	12,2

1.2: Viser areal, RSD og LOD for 9 peptider etter optimalisering av ESI for 10 injeksjonsreplikater (n=10)

Peptid	Areal (mean)	SD	RSD (%)	(RSD)mean)	MSA	LOD (95 %) (ng/ml)
BCM-3	9183348	620850	7	196330,2	359873	4,3
BCM-4	12470335	1343425	11	424828,2	778710	6,3
BCM-4A	22606755	1579460	7	499469,1	915527	4,2
BCM-5	7895891	685827	9	216877,7	397537	5,2
BCM-5A	16737439	1547833	9	489467,7	897194	5,1
BCM-7	13526591	1455922	11	460402,8	843918	6,1
GLU C	9877421	603063	6	190705,3	349563	3,5
Met-enkefalin-arg-phe	2056026	165625	8	52375,4	96004	5,1
GLIA-7	2985447	115307	4	36463,4	66837	2,2

1.3: Viser realtivutbytte av peptider i plasma ved bruk av DBS og RPPT- brønnplater

Peptid	Areal (DBS)	peptid i plasma (DBS) (%)	Areal (ordinær)	peptid i plasma (RPPT) (%)
BCM-3	2947873,8	7	2661930,5	16
BCM-4	2102312,8	5	2605794,2	15
BCM-4A	15717075,5	35	4265299,3	25
BCM-5	5320236,5	12	1638368,8	10
BCM-5A	13349883,3	30	3123820,0	18
BCM-7	1343791,5	3	517016,4	3
GLU-C	1563739,0	3	1406647,0	8
Met-enkefalin-arg-phe	416507,8	1	349500,4	2
GLIA-7	2279622,3	5	426335,0	3
SUM	45041042,3		16994711,6	

1.4: Viser gjennomsnittsareal av peptider i vann, plasma og fullblod i 2 konsentrasjonsnivåer. 6 prøver for hvert konsentrasjonsnivå ble laget (n=6). Rene standarder multipliseres med 2,5 fordi det ble tilsatt 20 ul i de prøvene, mens 50 ul i plasma og fullblod

Peptid	2000 ng/ml (vann og FA)	1000 ng/ml (vann og FA)	2000 ng/ml (plasma)	1000 ng/ml (plasma)	2000 ng/ml (fullblod)	1000 ng/ml (fullblod)
Replikater	Areal (mean) *2,5	Areal (mean) * 2,5	Areal (mean)	Areal (mean)	Areal (mean)	Areal (mean)
BCM-3	4354986,8	1920796,8	7809688,0	2947873,7	5798899,0	2312650,0
BCM-4	5291123,7	2272218,7	6033761,5	2102312,7	8341671,0	3853600,2
BCM-4A	6059474,3	2456730,6	30429672,2	15717075,5	17511727,5	9587046,2
BCM-5	3223990,0	1291419,3	12465035,2	5320236,5	3498485,5	1673072,7
BCM-5A	4163256,2	1783525,0	27213577,2	13349883,2	18566251,2	9574540,5
BCM-7	3838528,7	2041840,0	2504995,0	1343791,5	2545590,2	1226237,7
GLU-C	6128025,6	2591495,0	3250197,5	1563739,0	5506964,7	3091575,0
Met- enkefalin- arg-phe	352690,0	ND*	897235,0	416507,7	2139562,5	1207769,2
GLIA-7	1595388,7	763155,0	4620041,0	2279622,2	2075806,7	1145438,2

ND*=not detected

1.5: Viser gjenfinningsgrad av peptider i fullblod, hvor peptider i vann er referanseprøvene.

Peptid	2000 ng/ml (vann og FA)	1000 ng/ml (vann og FA)	2000 ng/ml (fullblod)	1000 ng/ml (fullblod)	1000 ng/ml (fullblod) u/sitronsyre
Replikater	Gjefinningsgrad (%)	Gjefinningsgrad (%)	Gjefinningsgrad (%)	Gjefinningsgrad (%)	Gjefinningsgrad (%)
BCM-3	179	153	133	120	112
BCM-4	114	93	158	170	163
BCM-4A	502	640	289	390	376
BCM-5	387	412	109	130	99
BCM-5A	654	749	446	537	490
BCM-7	65	66	66	60	76
GLU C	53	60	90	119	104
Met- enkefalin-arg- phe	254	ND*	607	**	**
GLIA-7	290	299	130	150	138

ND*=not detected

**=Kan ikke sammenlikne dataene med referanse. Ved vedleg (1.4) kan areal av peptider for met-enkefalin-arg-phe ses.

