Bacheloroppgave

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Rebekka Wiik Eckhoff
Bettina Eikefet Knudsen

Holdbarhetsundersøkelse av aldosteron i serum oppbevart ved romtemperatur

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Anne Lise Hjertø, Runa Merete Rosmæl
Mai 2021

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM

Rebekka Wiik Eckhoff
Bettina Eikefet Knudsen

Holdbarhetsundersøkelse av aldosteron i serum oppbevart ved romtemperatur

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Anne Lise Hjertø, Runa Merete Rosmæl
Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Holdbarhetsundersøkelse av aldosteron i serum oppbevart ved romtemperatur

Stability study of serum aldosterone stored at room temperature

Av / by

Rebekka Wiik Eckhoff Bettina Eikefet Knudsen

Trondheim, 2021

Forord

Denne oppgaven ble utført som bachelorprosjekt ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), Fakultetet for naturvitenskap, Institutt for bioingeniørfag våren 2021. Prosjektet er utarbeidet av St. Olavs hospital, Avdeling for medisinsk biokjemi, Seksjon spesiell biokjemi, og veileder for prosjektet var bioingeniør Runa Rosmæl ved universitetssykehuset St. Olavs hospital, Trondheim. Arbeidet ble utført i løpet av ti uker ved denne seksjonen, og det har vært lærerikt og spennende å se hvordan det er på seksjonen. Oppgaven er rettet mot bioingeniører og annet helsepersonell som arbeider med prøvetaking og håndtering av prøvemateriale.

Vi vil gjerne takke Runa Rosmæl og de andre ansatte ved seksjonen for god oppfølging og veiledning, samt for å ha gjort planlegging og prøveinnsamling i forkant av prosjektet. Vi vil også takke personalet ved Avdeling for medisinsk biokjemi som frivillig har gitt oss de nødvendige prøvene for å kunne utføre bacheloroppgaven.

Vi vil også rette en spesiell takk til prosessveilederen vår Anne Lise Hjertø. Hun har tatt seg tid til å lese og evaluere flere utkast, og har gitt oss gode råd under arbeidet med bacheloroppgaven.

18.05.21, Trondheim — Rebekka W. Eckhoff

Dato, sted — Rebekka Wiik Eckhoff

18.05.21, Trondheim — Bettina E. Knudsen

Dato, sted — Bettina Eikefet Knudsen

Sammendrag

Bacheloroppgaven er utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Seksjon spesiell biokjemi ved St. Olavs Hospital. I denne holdbarhetsundersøkelsen ble det undersøkt hvor lenge hormonet aldosteron er holdbart i serum når det er oppbevart i romtemperatur og analyseres på UHPLC-MS/MS. Holdbarheten ble undersøkt i tre forskjellige oppbevaringsmetoder; serum avpipettert fra serumrør uten gel, serum oppbevart på gelrør og serum avpipettert fra gelrør. For å se om oppbevaring over tid i romtemperatur ga signifikant utslag på resultatene ble prøvematerialet oppbevart i romtemperatur inntil fire døgn. Hver 12. time ble tre alikvoter per deltaker fryst ned for lagring frem til analysering, én for hver oppbevaringsmetode.

I en tidligere holdbarhetsundersøkelse av aldosteron fra 2017, utført ved Seksjon spesiell biokjemi, St. Olavs hospital, fant seksjonen ut at aldosteron ikke er holdbart i serum på gelrør i romtemperatur i tre døgn. Prøver sendes rutinemessig til laboratoriet med post fra helsetjenestene i distriktet. Disse sendes romtemperert på serumrør med gel. Ved helg og høytid kan postgangen strekke seg over 3-4 dager. Det er derfor ønskelig å nærmere undersøke holdbarheten av prøvematerialet som skal benyttes til analysering av aldosteron, og se om det eventuelt må settes andre krav for preanalytisk behandling av materialet.

I studien deltok 20 friske, frivillige ansatte ved Avdeling for medisinsk biokjemi. Det ble tatt venøst blod i åtte rør per deltaker; tre serumrør uten gel og fem serumrør med gel. Alle prøvene ble nummerert for å sikre anonymitet. Etter sentrifugering ble serum alikvotert i eppendorfrør som ble oppbevart i romtemperatur frem til det ble fryst i -80 °C for å stanse alle biologiske prosesser. Alikvotene ble fryst ned 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 og 96 timer etter sentrifugering. Den første prøven som ble fryst like etter sentrifugering ble benyttet som nullprøve i beregningene.

Analyseresultatene viste at alle enkeltprøver holdt seg innenfor tillatt totalfeil, og gjennomsnittsverdiene med tilhørende 90 % konfidensintervall var innenfor tillatt bias for alle analysetidspunkt. Holdbarhetsundersøkelsen antyder at aldosteron er holdbart i serum oppbevart i romtemperatur til og med fire døgn (96 timer), for alle de tre oppbevaringsmetodene.

Abstract

The bachelor thesis was performed at Department of Medical Biochemistry, Section Special Biochemistry at St. Olavs Hospital in Trondheim. This stability study examined how long the hormone aldosterone lasts in serum when stored at room temperature and analyzed on UHPLC-MS/MS. The stability was examined on three different pre-analytical storage methods; serum taken on serum tubes without gel, serum in serum tubes with gel and serum taken on serum tubes with gel but moved to eppendorf tubes after centrifugation. To see if storage over time at room temperature had a significant effect on the results, the sample material was left at room temperature for up to four days. Every 12 hours, three aliquots per participant was frozen so that they could be stored until analysis, one per storage method.

A previous stability study from 2017 examining the specimen stability of aldosterone in serum performed by the Section special biochemistry, showed the stability of aldosteron in serum was less than three days. Samples are routinely sent to the laboratory from the health service in the district by mail in serum tubes with gel. The delivery by mail can take up to 3-4 days, when including holidays and weekends. It is therefore desirable to closer examine the specimen stability of aldosterone in serum, and investigate if new criteria for preanalytical processing of the specimen is needed.

This study involved 20 healthy, volunteers from the Department of Medical Biochemistry. Eight tubes of venous blood were taken per participant: three serum tubes without gel and five serum tubes with gel. All samples were numbered to ensure anonymity. After centrifugation, serum was aliquoted into eppendorf tubes to be stored at room temperature until frozen to -80 ° C to stop all biological processes. The aliquots were frozen at 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 hours after centrifugation. The first sample frozen immediately after centrifugation was used as a reference sample in the calculations.

The analysis results showed that all individual samples remained within the permitted total error, and all the average values and 90 % confidence interval remained within the permitted bias for all time periods. The study indicates that aldosterone is stable in serum stored at room temperature for four days (96 hours), for all three storage methods.

Innhold

Forord **i**

Sammendrag **ii**

Abstract **iii**

Forkortelser **vi**

1 Innledning **1**
1.1 Bakgrunn for bachelorprosjektet 1
1.2 Holdbarhetsundersøkelser 3
1.2.1 Planlegging av holdbarhetsundersøkelser 3
1.2.2 Metoder for holdbarhetsundersøkelser 4
1.3 Aldosteron 5
1.4 Analyse av aldosteron 5
1.5 Analyseprinsipp 6
1.5.1 Prøveopparbeidelse 6
1.5.2 Standarder og kontroller 8
1.5.3 Analyseinstrumentet 10
1.5.4 Kromatografi og massespektrometri 11
1.5.5 Prøvens gang gjennom instrumentet 11
1.5.6 Verifisering av resultater på analysen 13
1.6 Biologisk og analytisk variasjon 13
1.7 Problemstilling 14

2 Materiale og Metode **15**
2.1 Prøvemateriale 15
2.2 Standarder brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS 16
2.3 Kontroller brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS 17
2.4 Reagenser brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS 17
2.5 Utstyr brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS 18
2.5.1 Analyseinstrument 18
2.6 Fremgangsmåte 18
2.7 Statistiske analyser 19

3 Resultater **21**
3.1 Holdbarhet av aldosteron i avpipettert serum tatt på serumrør uten gel . . 21
3.2 Holdbarhet av aldosteron i serum tatt på serumrør med gel 25
3.3 Holdbarhet av aldosteron i avpipettert serum tatt på serumrør med gel . . 29
3.4 Sammenligning av de tre oppbevaringsmetodene 33

4 Diskusjon **35**

5 Konklusjon **37**

Referanser **41**

Vedlegg **42**

Forkortelser

AGR : Avpipettert serum fra gelrør oppbevart i romtemperatur

AR : Avpipettert serum fra rør uten gel oppbevart i romtemperatur

GR : Gelrør med serum oppbevart i romtemperatur

MS : Massespektrometer

NOKLUS : Norsk kvalitetsforbedring av laboratorieundersøkelser

pmol/L : piko-mol per liter. SI-prefikset piko representerer 10^{-12}

RT : Romtemperatur

SD : Standardavvik

SEM : Standard error of mean

t : Timer

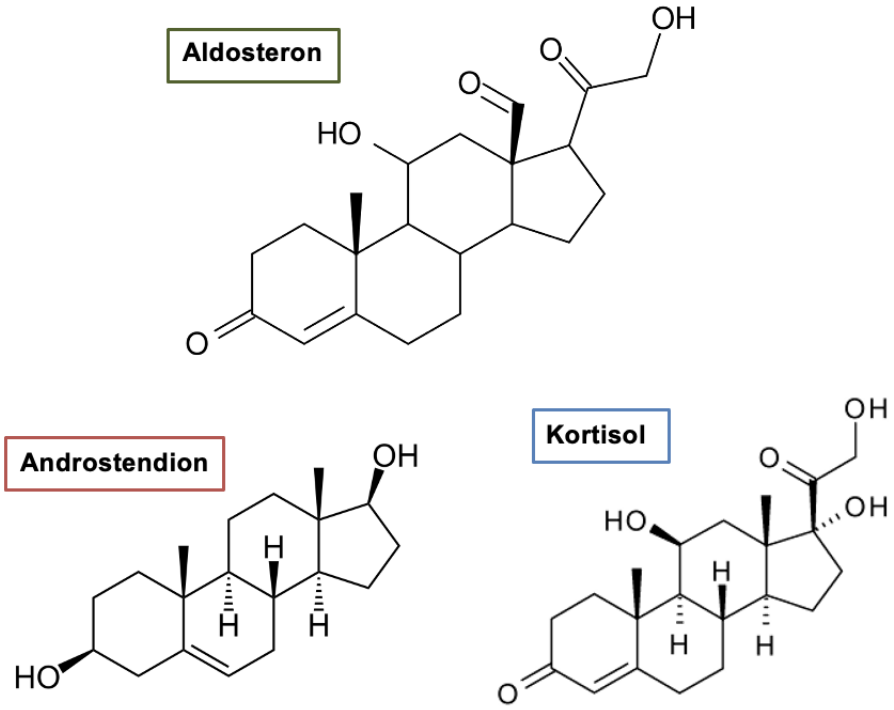
UHPLC-MS/MS : Ultra high performance liquid chromotagraphy with tandem mass spectrometry (Væskekromatografi med tandem massespektrometri)

1 Innledning

1.1 Bakgrunn for bachelorprosjektet

Holdbarhetsundersøkelsen ble utført ved St. Olavs Hospital, Avdeling for medisinsk biokjemi, Seksjon spesiell biokjemi. Her utføres analyser av ulike steroider og andre hormoner ved bruk av kromatografi. Til analyseringen av aldosteron i serum brukes væskekromatografi (UHPLC) med tandem massespektrometri (MSMS). Daglig sendes prøver til Seksjon spesiell biokjemi, som skal undersøkes for konsentrasjonen av aldosteron. En del prøver kommer fra primærhelsetjenesten i Trondheimsområdet, og noe kommer fra St. Olavs hospital. Det sendes prøver som skal analyseres for aldosteron via posten til seksjonen fra hele regionen. Ved helg og helligdager kan det ta flere dager før prøvene ankommer seksjonen.

I 2017 ble det gjennomført en studie ved seksjon for spesiell biokjemi, hvor holdbarheten av serum for analysering av aldosteron ble undersøkt (1). Studien ligger som vedlegg F. Binyrebarken produserer aldosteron og andre steroidhormoner (2). Disse ligner strukturelt på hverandre, se figur 1.1. Det ble opplyst av Seksjon spesiell biokjemi at andre steroidhormoner analysert med kromatografiske analyser, som for eksempel androstendion og kortisol hadde en holdbarhet på henholdsvis 6 og 7 døgn ved oppbevaring i romtemperatur. Det var da forventet at aldosteron ville ha tilsvarende holdbarhet. Prøvene til holdbarhetsundersøkelsen i 2017 ble tatt på serumrør med gel, og serumet ble oppbevart i serumrørene på gel i romtemperatur, i kjøleskap, og som avpipettert serum i fryser. Fordi prøvematerialet ble antatt holdbart, ble alikvoter frosset ned med 3-4 dagers mellomrom. Resultatene for prøver oppbevart i kjøleskap og fryser oppfylte kravene for holdbarhet gitt av NOKLUS, mer om dette i kapittel 1.2. Prøvene oppbevart i romtemperatur oppfylte ikke holdbarhetskravene etter tre dager. Prøvene hadde en gjennomsnittslig prosentendring innenfor bias, men 90 % konfidensintervallet var utenfor tillatt bias. Da de første prøveresultatene er fra dag 3, vet man ikke hvordan forløpet av aldosteronkonsentrasjonen er fram mot dag 3, og når på den tiden resultatene kommer utenfor tillatt bias. Det ble derfor anbefalt å gjennomføre en ny undersøkelse hvor man analyserer med 12 timers intervaller, i 3 - 7 døgn etter prøvetaking. Det ble foreslått å utvide undersøkelsen til å analysere serum oppbevart på gel, serum tatt på serumrør med gel og avpipettert, og serum tatt på serumrør uten gel og avpipettert (1).



Figur 1.1: Strukturformel for aldosteron (3), androstendion (4) og kortisol (5).

I dette bachelorprosjektet ble det besluttet å undersøke holdbarheten av aldosteron i serum oppbevart i romtemperatur og analysere prøvene med 12 timers intervaller til og med fire døgn. Prosjektet omfatter tre ulike preanalytiske oppbevaringsmetoder. Den ene (AR) er venøst blod tatt på serumrør uten gel. De to andre er begge tatt på serumrør med gel, men den ene er pipettert over i eppendorfrør like etter sentrifugering (AGR) mens den siste har stått på gel (GR). Figur 1.2 viser de to ulike rørene som er brukt i undersøkelsen. I dag brukes serumrør med gel i Helse Midt-Norge (6). Blodprøven blir tatt på serumrør med gel, og prøven sentrifugeres og sendes. Ved Oslo Universitetssykehus blir prøvene tatt på EDTA-rør, og avpipettert plasma fryses før sending (7). Helse Bergen utfører analysen på samme måte som Seksjon for spesiell biokjemi ved St. Olavs hospital (8).

Figur 1.2: Serumrør uten og med gel fra Vacuette. Henholdsvis 6 mL og 5 mL (9).

1.2 Holdbarhetsundersøkelser

Holdbarhet er definert av NOKLUS som *"prøvematerialets evne til å beholde opprinnelig måleverdi innenfor definerte grenser når det lagres under definerte forhold i et definert tidsrom"* (10). En holdbarhetsundersøkelse brukes for å se om analyseresultatet for en komponent endres under oppbevaring. Hensikten med å utføre en holdbarhetsundersøkelse er for å se når komponenten ikke lenger er holdbar, og for å se hvilke eventuelle tiltak som må gjøres (10). Ved å analysere flere alikvoter av samme prøvemateriale fra samme person kan lagringsforholdene endres for å se hvordan analytten har lengst holdbarhet. Det kan for eksempel være å lagre analyttene i kjøleskap sammenlignet med romtemperatur frem til analysering. Holdbarhetsforsøk utføres ifølge Seksjon spesiell biokjemi ved innføring av en ny metode på laboratoriet, dersom holdbarheten av en analytt er ukjent, eller dersom holdbarhetsbetingelsene for tidligere holdbarhetsstudie er ulikt egne betingelser.

I NOKLUS' protokoll for holdbarhetsforsøk, er det to kriterier som må overholdes, for å at prøvematerialet skal vurderes som holdbart (10):

> *1. Gjennomsnittskonsentrasjonen skal endre seg mindre enn utgangsgjennomsnittet ± tillatt systematisk avvik (tillatt bias).*
>
> *2. Konsentrasjonen i den enkelte prøve skal endre seg mindre enn utgangsverdi ± tillatt totalfeil.*

1.2.1 Planlegging av holdbarhetsundersøkelser

I planleggingen av holdbarhetsforsøk er det nyttig å tenke på hvilke faktorer som er relevante å teste. Det kan for eksempel være å benytte ulikt prøvemateriale, oppbevaring ved ulike temperaturer, hvordan prøvene transporteres til laboratoriet, hvordan prøvene sentrifugeres eller tiden prøven oppbevares i romtemperatur. Det er hensiktsmessig å teste de faktorene som kan virke inn ved normal drift ved laboratoriet. Prøvematerialet bør inneholde ulike konsentrasjoner av analytten som undersøkes (10). Det er spesielt viktig å teste i det øvre og nedre sjiktet av referanseområdet samt like utenfor. Det er fordi kliniske beslutninger tas i dette området.

Det er anbefalt å ikke ha mindre enn 20 deltakere i et holdbarhetsforsøk. Flere prøver gir et smalere 90 % konfidensintervall, og det er mindre sannsynlighet for feil konklusjon (10).

Dersom målt gjennomsnitt er innenfor tillatt bias, men konfidensintervallet havner utenfor tillatt grense bør forsøket utvides med flere deltakere for å komme innenfor grensene. Dersom det er flere enkeltprøver som havner utenfor tillatt totalfeil bør det også vurderes å utvide forsøket (10).

1.2.2 Metoder for holdbarhetsundersøkelser

NOKLUS bruker to ulike metoder for å teste holdbarheten av en analytt; "buksemetoden" og "batchmetoden" (11). Dette er standardiserte metoder for holdbarhetsundersøkelser. Buksemetoden er anbefalt når det ikke er sikkert at prøvematerialet kan lagres stabilt frem til analysering (10). Det er da nødvendig å analysere prøvene fortløpende. Metoden egner seg best til å teste få ulike betingelser, for eksempel ulike tidsintervall. Prøvene bør ellers behandles likt utenom betingelsene for å kunne tyde resultatene for holdbarhetsforsøket (10).

Bruk av batchmetoden er nyttig når det er flere prøver per deltaker, og disse kan lagres stabilt. Navnet kommer av at alle prøver for hver deltaker analyseres sammen som en "batch". Det samles inn like mye prøvemateriale fra alle deltakerne. Det fordeles i så mange alikvoter at hver av oppbevaringsbetingelsene og/eller oppbevaringstidene blir ivaretatt. Når betingelsene er oppfylt for den aktuelle alikvoten blir den fryst i -70°C eller kaldere for at ikke skal skje endringer (10).

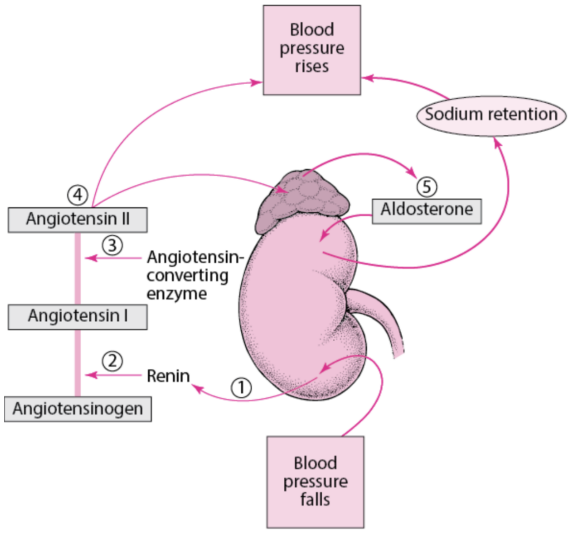
Den første prøven (nullverdien) settes til 100%. Analyseverdiene fra batchmetoden blir omregnet til prosent av nullverdien. Gjennomsnittet av prosentene av nullverdien per tid, og gjennomsnittets 90 % konfidensintervall beregnes. Konfidensintervallets akseptgrenser er 100 ± bias (10). Dersom hele konfidensintervallet er innenfor akseptgrensene anses prøvematerialet holdbart for testet tid. Dersom hele konfidensintervallet ligger utenfor akseptgrensene er endringen så stor at prøvematerialet ikke lenger kan vurderes som holdbart. Dersom konfidensintervallet krysser én grense, bør det tas flere prøver for å snevre inn konfidensintervallet (10).

Når batchmetoden brukes må 95 % av alle enkeltverdier ligge innenfor tillatt totalfeil, og kravet om at gjennomsnittsverdien er innenfor tillatt bias må være oppfylt for at prøvematerialet skal regnes som holdbart (10).

1.3 Aldosteron

Aldosteron er et steroidhormon som blir produsert i binyrebarken. Hormonet har som oppgave å regulere elektrolyttbalansen i kroppen. I tubuli stimulerer aldosteron nyrene til økt reabsorpsjon av natrium, og økt utskillelse av kalium, magnesium og hydrogen (12). Den økte konsentrasjonen av natrium i blodet vil øke det osmotiske trykket i tubuli, og vann reabsorberes via osmose (13).

Produksjonen av aldosteron styres av hypothalamus og hypofysen via hormonet adrenokortikotropt hormon (ACTH). Ved økt behov for aldosteron vil hjernen øke produksjonen av ACTH som stimulerer binyrene til å produsere mer aldosteron (15). Aldosteron spiller en viktig rolle i renin-angiotensin-aldosteron-systemet (RAAS), som er skissert i figur 1.3. Lavt blodtrykk eller lavt væskevolum i kroppen vil aktivere dette systemet. RAAS starter ved at nyrene produserer renin, og igangsetter en kjedereaksjon som blant annet øker sekresjonen av aldosteron ved hjelp av angiotensin II (16). Aldosterons evne til å minske utskillelsen av vann ved å holde igjen natrium i nyrenes samlerør gjør at væskevolumet øker, og med dette øker også blodtrykket. Utskillelsen av aldosteron kan påvirkes av nivåene av kalium, atrialt natriuretisk peptid (ANP), adrenokortikotropt hormon (ACHT) og serotonin i kroppen (13).



Figur 1.3: Renin-angiotensin-aldosteron-systemet (14)

1.4 Analyse av aldosteron

Analysering av aldosteron i serum gjøres ved mistanke om primær eller sekundær hyperaldosteronisme. Det kan også gjøres ved mistanke om binyrebarksvikt og enzymdefekt i binyrene. Andre indikasjoner for å gjøre analyse av aldosteron kan være behandlingsresistent hypertensjon og utredning av ukjent tumormasse i binyrene. Ved mistanke om hyperaldosteronisme beregnes aldosteron/renin-ratio. Økende verdier av aldosteron/renin-ratio kan tyde på hyperaldosteronisme (17). Det finnes ulike medikamenter som stimu-

lerer til økt aldosteronproduksjon. Blant annet diuretika, østrogener, spironolakton og klonidin (13). Høye verdier kan også forekomme ved graviditet (7). Lave verdier kan for eksempel komme av heparin, ACE-hemmere, beta-blokkere eller inntak av lakris (13).

Konsentrasjonen av aldosteron i serum øker når pasienten er oppe og går. I stående stilling vil blodet omfordeles fra sentrale til perifere vener, slik at blodstrømmen tilbake til hjertet synker. RAAS vil aktiveres av trykkreseptorer på grunn av det senkede minuttvolumet (18). Ved analyse av aldosteron skal prøvene enten tas før pasienten har stått opp (liggende) eller etter at pasienten har vært oppe (oppegående) i minimum 2 timer. Det er viktig å notere om prøven har blitt tatt liggende eller oppegående, og at eventuelle kontroller blir tatt på samme måte.

Referanseområdet for aldosteron for voksne med analysemetoden brukt på St. Olavs Hospital er vist i tabell 1.1 (6).

Tabell 1.1: Referanseområde for aldosteron

Liggende	19 - 303 pmol/L
Oppegående	76 - 588 pmol/L

1.5 Analyseprinsipp

1.5.1 Prøveopparbeidelse

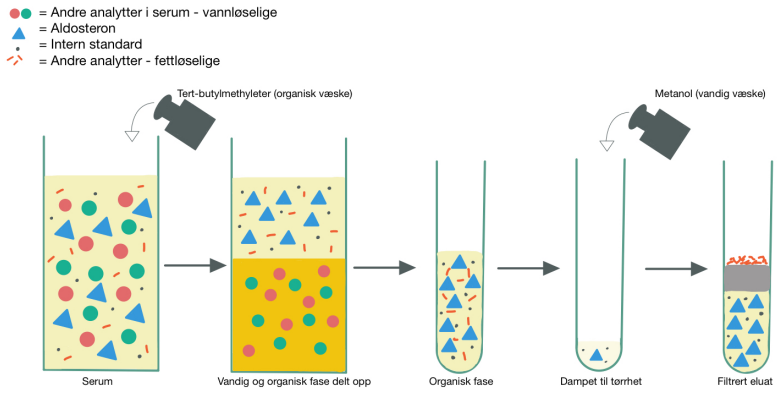
Ved Seksjon spesiell biokjemi analyseres aldosteron ved UHPLC-MS/MS. Før analysering er det nødvendig å bearbeide prøvematerialet. Hensikten med prøveopparbeidelsen er å få renset opp prøvematerialet, oppkonsentrere analytten og forhindre forurensing av analyseinstrumentet. Det er ulike faktorer i prøvematerialet som kan interferere med analytten under analysering som gjør at prøvematerialet må renses, som for eksempel matrikseffekten. Matrikseffekt er støy som kan oppstå på grunn av miljøet analytten befinner seg i (19). Andre komponenter enn analytten i prøvematerialet kan gi matrikseffekt. Proteiner, medikamentbruk og lipemi er eksempler som kan virke inn på resultatene (19). Effekten kan inntreffe når komponenter fra prøvematerialet forstyrrer ioniseringsprosessen av analytten i MS-delen. Matrikseffekten kan gjøre at målt verdi avviker fra sann verdi. Det kan føre til dårligere presisjon og selektivitet for analysen (20).

Det finnes flere måter å utføre prøveopparbeidelse. De vanligste er fast-fase ekstraksjon, væske-væske ekstraksjon og felling kombinert med filtrering (21). Ved bruk av nevnte

metoder er det forventet at noe av analytten går tapt under prøveopparbeidelsen. Det tilsettes derfor intern standard slik at et eventuelt tap blir oppdaget. Detektert konsentrasjon av intern standard brukes for å finne den riktige konsentrasjonen av analytten. Dette er videre beskrevet i avsnitt 1.5.2.

Til analysering av aldosteron og lignende steoridehormoner utføres en væske-væske-ekstraksjon. Da blandes to ikke-blandbare væsker. Det er for å få analytten som er løst i den ene væsken, over i den andre væsken der analytten er mer løselig (22). Vanligvis er prøvematerialet løst i serum eller plasma som er vandig. Da tilsettes en organisk væske som får ønskede analytter, for eksempel steoridehormoner over i den organiske væsken der de er mer løselig.

Det er mulig å bruke to eller tre faser i en væske-væske ekstraksjon. Ved bruk av tre faser diffunderer analytten først over i organisk fase fra vandig fase, vist i figur 1.4. Deretter går analyttene over i et vandig løsemiddel igjen. Det er ønskelig å bruke tre faser hvis mobilfasene er løst i en vandig væske. Den organiske væsken som tilsettes gir et høyere volum. For å oppkonsentrere prøven blir væsken dampet vekk, og prøven reoppløst i en vandig væske. Prøvematerialet filtreres ved bruk av eppendorfrør med filter, og sentrifugeres slik at for eksempel lipemiske komponenter elimineres fra den ferdige prøven. Fosfolipider er naturlig ionisk, og kan forstyrre ioniseringen av analytten i massespektrometeret. Denne metoden fjerner mange matrikskomponenter i prøven, og den ferdige prøven kan injiseres direkte inn på analyseinstrumentet UHPLC-MS/MS (23).

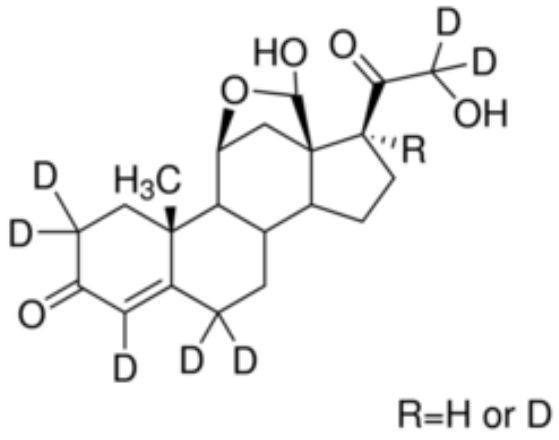


Figur 1.4: Hovedtrinnene i væske-væske ekstraksjon av aldosteron.

1.5.2 Standarder og kontroller

Intern standard

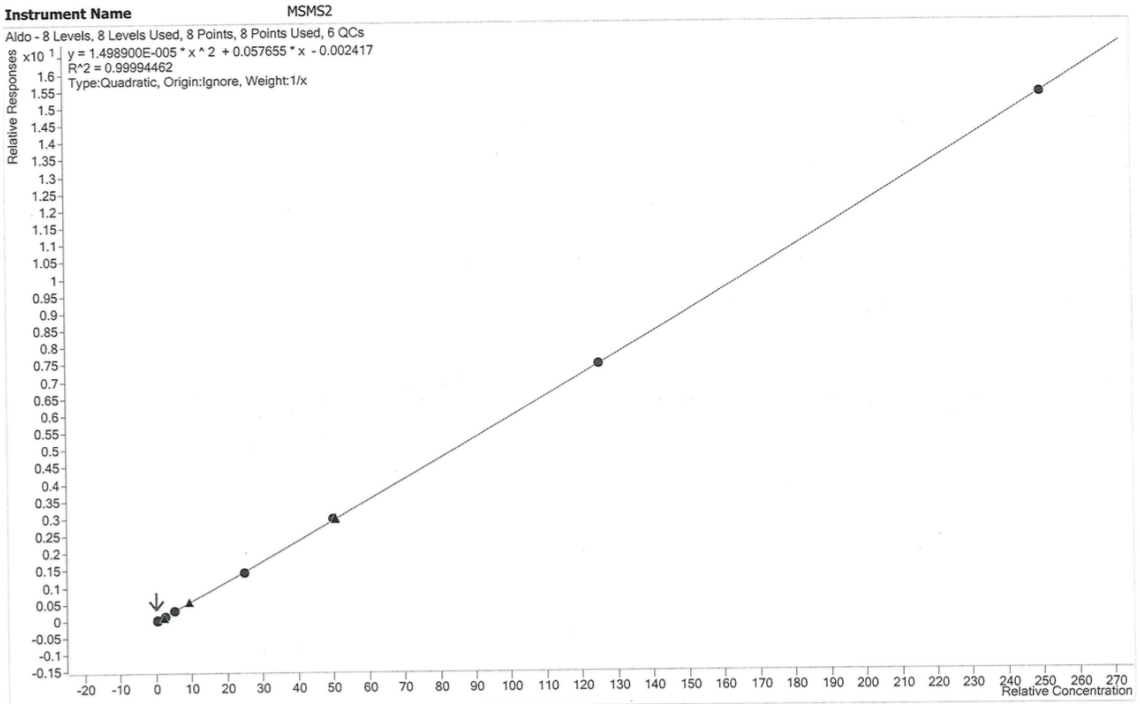
Før prøveopparbeidelsen tilsettes intern standard i samme mengde til alle prøvene. Dette er for å kompensere for eventuelt tap av analytt under prøveopparbeidelsen. Det tilsettes også intern standard i standarder og kontroller. Det er viktig at intern standarden er separert fra andre stoffer i prøven, og at den har en retensjonstid nær målestoffet. Intern standarden kan ikke være en komponent som er til stede i prøven fra før, og den må oppføre seg likt som målestoffet. Det er for at intern standard og analytten skal oppføre seg likt i prøveopparbeidelsen og da ha et like stort tap av begge deler. Det er fordelaktig at intern standarden og analytten har samme ladning og egenskaper, men ulik masse. Hovedionene detekteres masseselektivt, og de to ionene vil kunne skilles fra hverandre. Intern standarden som benyttes til analysering av aldosteron er deuterert aldosteron (D_7-aldosteron), vist i figur 1.5. D_7-aldosteron vil ha samme ladning og egenskaper som aldosteron, men høyere masse. (24) Aldosteronmolekylet er påført ekstra nøytroner som bare påvirker masse, ikke ladningen. Det er viktig at det ikke påvirker ladningen da instrumentet baserer seg på ionisering for å skille mellom komponenter i prøven, mer om dette i avsnitt 1.5.3 (25). Navnet D_7-aldosteron kommer av at det er påført syv nøytroner til aldosteronmolekylet. Aldosterons hovedion har et massetall på 361,2 u, mens D_7-aldosterons hovedion har et massetall på 368,5 u. (26) Det er en forskjell på ca. 7 u, som stemmer overens med at ett nøytron veier ca. 1 u (25).



Figur 1.5: Strukturformel for D_7-Aldosteron som brukes som intern standard ved analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS. Bokstaven D står for deuterert, og viser i figuren hvor det er påført ekstra nøytroner (27).

Standarder

Ved hver analyse som analyseres på UHPLC-MS/MS settes det opp en standardrekke. Standardrekken består av standarder med kjente, forskjellige konsentrasjonsnivå laget ved seksjonen, se mer informasjon kapittel 2.2. Standardene har konsentrasjoner fra 5,0 pmol/L til 5000 pmol/L. Instrumentets måleområde er 10,0 pmol/L til 5000 pmol/L så standardene gir linearitet i hele måleområdet (28). Standardene blir alle tilsatt intern standard før analysering. Når standardrekken analyseres, vil det dannes en 8-punkts standardkurve. Y-aksen er relativ respons, som er ratioen mellom analyttens topphøyde og intern standardens topphøyde. Dette blir plottet mot standardenes kjente konsentrasjon på x-aksen. Kvantitering av analytten utføres ved hjelp av standardkurven med respons som funksjon av konsentrasjon, vist i figur 1.6.



Figur 1.6: Standardkurve dannet ved analysering av standarder. Hvert rundt punkt representerer en standard, og kurven tilpasses punktene. Trekantene som ligger nær standardkurven er kvalitetskontroller analysert i samme batch.

Kvalitetskontroller

Det er viktig å ha med kvalitetskontroller for hver analysering for å vurdere om analyseresultatene i hver batch kan godkjennes. Kontrollene brukes for å sjekke om kalibreringen er riktig, og vises i diagrammet for standardkurven (figur 1.6). Kontrollene som benyttes i analysen har kjente konsentrasjoner. Ifølge Seksjon spesiell biokjemi må beregnet verdi være innenfor ± 3 standardavvik for å godkjennes. Dersom kontrollene ikke blir godkjent forkastes hele analyserekken. Kontrollene som brukes i analysering av aldosteron er ytterligere beskrevet i kapittel 2.3. Kontrollene er laget ved Seksjon spesiell biokjemi ved å "poole" mange prøver med kjent konsentrasjon, men kan også kjøpes. På den måten sikres det at kontrollene har samme matriks som prøvematerialet som brukes til analysen. Det bør brukes minst to kontroller i forskjellig nivå, normalt og patogent (29). Ved analysering av aldosteron brukes det tre kontroller som ligger i tre forskjellige nivå. Det er fordelaktig å bruke tre kontroller. Her brukes det én som er under referanseområde, én som er i referanseområdet og én som er over referanseområdet. På den måten blir kalibreringskurven kontrollert i alle betydelige nivå. Kontroller er et hjelpemiddel for å kontrollere at analyttene måles i riktig nivå, og avdekke eventuelle tilfeldige og systematiske feil.

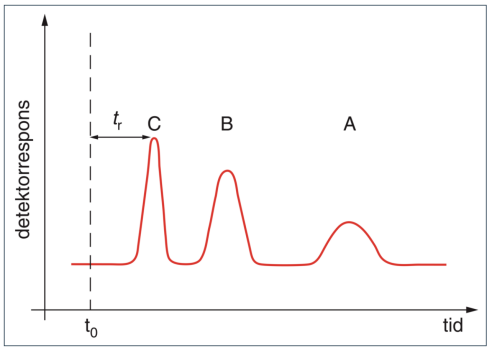
1.5.3 Analyseinstrumentet

Analyseinstrumentet som ble brukt i dette bachelorprosjektet var en kombinasjon av en UHPLC; Agilent 1290, og en tandem MS-del; Agilent 6490A Triple Quad med tilhørende programvare. Instrumentet leveres av Matriks AS. Det kalles en UHPLC-MS/MS eller triple quad. UHPLC står for ultra-high-performance liquid chromatography, og MS for massespektrometer. Figur 1.7 viser hvordan sammensetningen av en UHPLC og en MS kan se ut. Instrumentet UHPLC separerer ulike komponenter i en prøve ved bruk av høyt trykk. Forskjellen på en UHPLC og en HPLC er at UHPLC tåler høyere trykk slik at man kan korte ned analysetiden, og detektere mindre komponenter (31). Massespektrometri er analysering av ioner som beveger seg i vakuum (32).

Figur 1.7: Analyseinstrument benyttet til analysering av aldosteron. Agilent UHPLC og Agilent 6490A Triple Quadrupole LC/MS (30)

1.5.4 Kromatografi og massespektrometri

Kromatografi er en separasjonsmetode som er basert på prinsippet om at stoffene i prøven fordeler seg mellom to faser, hvor den ene fasen er mobil (MF) og den andre fasen er stasjonær (SF). Poenget er å skille komponenter i prøven basert på komponentenes fysiske og kjemiske egenskaper (33). Mobilfasen er et medium som transporterer komponentene gjennom instrumentet. Den stasjonære fasen vil redusere hastigheten på komponenter som føres gjennom instrumentet basert på deres masse og ladning slik at de får ulik retensjonstid. Det fører til at ulike komponenter blir separert og instrumentet kan detektere ønsket analytt med massespektrometri. Separeringen gjør at komponentene ankommer detektoren ved ulike tider, og hver topp i kromatogrammet i figur 1.8 representerer én komponent. I massespektrometeret får komponentene elektrisk ladning og blir fragmentert. De fragmenterte ionene blir separert basert på forholdet mellom masse og ladning, og registreres i en detektor (34).

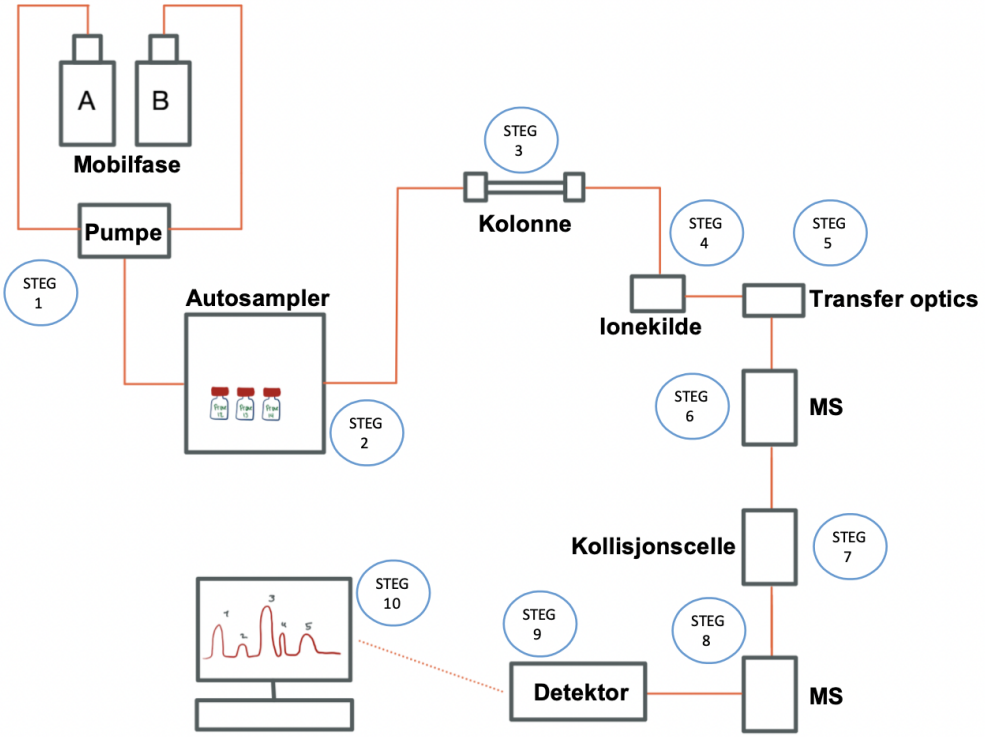


Figur 1.8: Prinsippskisse for et kromatogram. t_0 er starttiden. t_r er retensjonstiden, altså tiden fra prøven ble injisert på instrumentet til toppen ble detektert. A, B og C er topper på kromatogrammet, og representerer tidspunkt hvor responsen detektert av instrumentet var høy (33).

1.5.5 Prøvens gang gjennom instrumentet

UHPLC-metoden er en gradientmetode hvor mobilfase A og mobilfase B (steg 1), blandes, filtreres og pumpes inn i instrumentet. Dette skaper et trykk som gjør at væskestrømmen kun går en vei. I autosampleren (steg 2) hentes prøvematerialet, hvor det blir oppbevart under stabile temperaturforhold. Instrumentet analyserer en og en prøve om gangen. Den mobile fasen transporterer prøvekomponentene til kolonnen (steg 3), gjennom den stasjonære fasen som er materialet inne i kolonnen. Det benyttes en C18 revers fase kolonne. Kolonnen separerer de ulike komponentene i prøven, basert på deres løselighet i mobilfasen og affinitet til stasjonærfasen, slik at de kommer ut til forskjellige tider. De ulike komponentene vil da få forskjellig retensjonstid. Videre ledes prøven inn i ionekilden. Her blir prøven ionisert ved hjelp av elektronspray ionisering (ESI) (steg 4). Det benyttes nitrogengass. Ionene vil få ulik masse-ionestyrke-ratio i forhold til hverand-

re. Like analytter vil få samme masse-ionestyre-ration. På den måten kan man skille ulike komponenter i prøvematerialet fra hverandre. De ioniserte analyttene går så til Transfer optics (steg 5) som fører ionene til den første kvadropolen der moderionet blir valgt ut (steg 6). Kun ioner av ønsket masse slipper gjennom, og moderionet er det ionet vi ønsker å finne. Dette blir så sendt gjennom kollisjonscellen, der nitrogen spalter moderionet opp i flere deler, ionefragmenter (steg 7). Kollisjonscellen i Agilent 6490 har en buet form slik at man enda bedre får valgt ut de ønskede ionene (32). I neste kvadropol vil datterionet kunne filtreres av moderionet (steg 8), samt en qualifier for å kvalitetssikre at riktig analytt blir målt. Datterionet og qualifieren er en del av analytten. Forholdet mellom datterionet og qualifier benyttes som en forsikring om at det er valgt ut rett analytt. Andre molekyler kan ha lignende masse, men fragmenteringsmønstre vil være forskjellig. Etter å ha passert massefiltrene, vil ionene nå detektoren som konverterer et elektrisk signal som blir forsterket og detektert. Signalet er proporsjonalt med analyttenes konsentrasjon. I kromatografiske seperasjonsmetoder hvor UHPLC og MS/MS benyttes, vil en analytt kunne identifiseres basert på retensjonstid og respons (29).



Figur 1.9: Prinsippskisse for gangen i analyseinstrumentet UHPLC-MS/MS

1.5.6 Verifisering av resultater på analysen

Før man kan gi ut svar på analysen må ulike faktorer vurderes; respons, ratio, retensjonstid, standardkurver, kromatogrammer og verdiene på standarder og kontroller. Responsen er antall elektroner som kommer inn på detektoren og responsen til internstandarden skal være omtrentlig lik for alle prøvene i samme analyseoppsett. Responsen sier noe om hvor ren prøven er, altså hvor mye mer enn analytten som er til stede i prøven. Dersom man har for høy respons, tyder det på at man ikke har klart å fjerne nok matriks, slik at den danner støy (32). Dette har betydning for om det er mulig å skille komponentene fra hverandre. Ratioen angir forholdet mellom analytten og qualifieren. Dersom ratioen er for lav eller for høy, vil det si at det ikke er sikkert at det er riktig analytt som måles. Hvis ratioen kommer utenfor fastsatte grenser, blir ikke resultatet godkjent. Retensjonstiden er tiden det tar før analytten blir detektert fra injiseringstidspunkt. Den blir vurdert for hver prøve for å forsikre oss om at vi har riktig analytt. Retensjonstiden skal være omtrentlig lik for alle prøvene i samme batch. Responsen på intern standarden skal ligge i samme område i hele batchen (29). Standardkurven og kontroller vurderes etter satte kriterier som er beskrevet i kapittel 1.5.2. Hvis standardene og kontrollene er godkjent, vurderes kromatogrammet til standardene og kontrollene. Toppene for analytten skal være godt avgrenset fra eventuelle nabotopper.

1.6 Biologisk og analytisk variasjon

En analyses presisjon er evnen til å gi samme resultat dersom analysen gjøres flere ganger med samme betingelser (35). Presisjonen avhenger av biologisk variasjon og den analytiske variasjonen. Intraindividuell biologisk variasjon er forandringer av komponenter innad hos en person, mens interindividuell biologisk variasjon er variasjoner mellom personer. Når man vurderer presisjon er det intraindividuell biologisk variasjon som er av interesse. Den analytiske variasjonen ses hvis samme prøve analyseres flere ganger, og resultatene avviker fra hverandre. Dette skyldes tilfeldige variasjoner som forekommer under analysering. Ved gjentatte analyseringer av samme prøve vil resultatene danne en normalfordeling rundt gjennomsnittsverdien. Dette kan benyttes til å beregne standardavvik (SD) og variasjonskoeffisient (CV). Gjennomsnittet ± 2 standardavvik vil romme 95 % av alle måleverdiene. Variasjonskoeffisienten er standardavviket i prosent av gjennomsnittet. En lav variasjonskoeffisient tyder på god presisjon (36).

Tillatt totalfeil for analysen bestemmes ut ifra biologisk og analytisk variasjon. For denne analysen av aldosteron målt med UHPLC-MS/MS er tillatt totalfeil 42 %, og er hentet fra EFLMs database om biologisk variasjon (37). Tillatt totalfeil er høy fordi det er så mange faktorer som kan spille inn på analyseresultatene, som for eksempel hvor lenge personen har stått de siste timene eller hvor salt kosthold pasienten har hatt de siste ukene (24).

Bias er differansen mellom gjennomsnittlig verdi og sann verdi. Dette benyttes til å vurdere en analyses riktighet (29). For analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS benyttes bias på 13 % (37).

1.7 Problemstilling

På bakgrunn av holdbarhetsundersøkelsen fra 2017, og usikkerhet knyttet til holdbarheten av aldosteron analysert ved UHPLC-MS/MS var det ønskelig å utføre en ny holdbarhetsundersøkelse av aldosteron, denne gang med oppbevaring i romtemperatur inntil fire døgn. I denne bacheloroppgaven er derfor følgende problemstillinger undersøkt:

- **Hvor lenge er aldosteron holdbart i serum oppbevart i romtemperatur?**
    1. Er aldosteron holdbart i romtemperatur til og med fire døgn når prøvematerialet er tatt på serumrør uten gel, og så avpipettert like etter sentrifugering?
    2. Er aldosteron holdbart i romtemperatur til og med fire døgn når prøvematerialet er tatt på serumrør med gel, og har stått på gel frem til analysering? Dette er metoden som brukes ved Seksjon spesiell biokjemi i dag.
    3. Er aldosteron holdbart i romtemperatur til og med fire døgn når prøvematerialet er tatt på serumrør med gel, og så avpipettert like etter sentrifugering?

2 Materiale og Metode

2.1 Prøvemateriale

Deltakere i prosjektet var friske, frivillige ansatte ved Avdeling for medisinsk biokjemi. Prøvetakingen ble gjennomført 22.02.21 og 01.03.21, fra kl. 08.00. Ved prøvetakingstidspunktet hadde deltakerne vært oppe en stund, og de klassifiseres derfor som oppegående. Prøvene ble anonymisert, og Seksjon prøvetaking og pasientnæranalyse sto for prøvetaking og nummerering.

Prøvematerialet som ble benyttet var serum. For hver av de 20 deltakerne ble det tatt venøst blod på fem Vacuette serumrør med gel og tre Vacuette serumrør uten gel. Prøvene ble sentrifugert ved 2200 G i 10 min og 20 °C. Det ble tatt serum til tre oppbevaringsmetoder; serum avpipettert fra rør uten gel (AR), serum på gelrør (GR) og serum avpipettert fra gelrør (AGR). Serumet fra rørene uten gel ble avpipettert etter sentrifugering. Halvparten av prøvematerialet på serumrør med gel ble pipettert av etter sentrifugering, mens den andre halvparten ble stående på gel, for å se om det hadde påvirkning på resultatet. Etter å ha stått i romtemperatur i gitt antall timer ble de fryst ned til -80 °C, der de ble lagret frem til prøveopparbeidelse og analysering. 0 timer betyr at alikvotene ble fryst ned rett etter sentrifugering. Prøvematerialet ble så fordelt og fryst etter gitt tid som vist i tabell 2.1.

Kolonnen *Avpipettert serum (AR)* i tabell 2.1 er prøvematerialet som kommer fra serumrørene uten gel, og ble pipettert i eppendorfrør etter sentrifugering. Prøvene i kolonnen *serum på gelrør (GR)* ble sentrifugert og alikvoter ble pipettert ut etter de gitte tidsintervallene og fryst. *Serum avpipettert fra gelrør* ble avpipettert og fordelt like etter sentrifugering. Det resulterte i 26 alikvoter per person. Det ble ikke tatt en nullprøve fra serum som skulle stå på gelrør (GR) etter 0 timer da dette vil være det samme som nullprøve for serum avpipettert fra gelrør (AGR). Prøvene som er fryst ned like etter sentrifugering er nullprøvene som brukes i utregningene. Da det ble benyttet ulike prøverør, ble det tatt en nullprøve fra begge de to rørene. Den første prøven fra serumrør uten gel (AR0) ble benyttet som nullprøve for oppbevaringsmetoden AR, mens den første prøven fra serumrøret med gel (AGR0), ble benyttet som nullprøve for oppbevaringsmetodene GR og AGR. Protokoll for innsamling av prøvematerialet finnes i vedlegg E.

Tabell 2.1: Oversikt over hvordan prøvematerialet ble alikvotert og merket. Fra hver deltaker ble det laget alikvoter fra de ulike oppbevaringsmetodene ved hvert tidspunkt. Én fra serum som var avpipettert fra rør uten gel (AR), én fra serum som hadde stått på gel (GR), og én som var avpipettert fra prøverør med gel (AGR).

Tidspunkt Timer i 18-25 °C	Avpipettert serum AR	Serum på gelrør GR	Serum avpipettert fra gelrør AGR
0	AR0		AGR0
12	AR12	GR12	AGR12
24	AR24	GR24	AGR24
36	AR36	GR36	AGR36
48	AR48	GR48	AGR48
60	AR60	GR60	AGR60
72	AR72	GR72	AGR72
84	AR84	GR84	AGR84
96	AR96	GR96	AGR96

2.2 Standarder brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS

Standardene som brukes til analysering av aldosteron er fremstilt fra stamløsning på 50 umol/L aldosteron som har blitt fortynnet med metanol. Stamløsningen er levert av Sigma-Aldrich Norway AS og har lotnummer 060919. Konsentrasjonene benyttet i standardrekken ved analysering av aldosteron er 5,0 pmol/L, 10,0 pmol/L, 50,0 pmol/L, 100,0 pmol/L, 500,0 pmol/L, 1000,0 pmol/L, 2500,0 pmol/L og 5000,0 pmol/L aldosteron.

Intern standarden som brukes i denne analysen er deuterert aldosteron (D_7-Aldosteron). Intern standard har en aldosteronkonsentrasjonen på 20,0 nmol/L og er fortynnet med metanol. Lot nummer er 170320, og stamløsningen til intern standarden er levert av Sigma-Aldrich Norway AS. Intern standarden har samme ladning og egenskaper som aldosteron, men høyere masse.

For flere spesifikasjoner om standardene, se vedlegg B

2.3 Kontroller brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS

Tabell 2.2: Kontroller som brukes til analyse av aldosteron ved Seksjon spesiell biokjemi. Fasitverdiene er konsentrasjonen av aldosteron i pmol/L.

Kontroll	Spesifikasjoner
Kontroll A	LOT: 140107 A2 Fasitverdi: 184 pmol/L
Kontroll E	LOT: 140107 E2 Fasitverdi: 31,1 pmol/L
Kontroll F	LOT: 200226 F2 Fasitverdi: 1010 pmol/L

Se flere spesifikasjoner om kontrollene i vedlegg C. Alle de tre kontrollene ble analysert i hvert analyseoppsett. Kontrollene ble tint samtidig med prøvene.

2.4 Reagenser brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS

Tabell 2.3: Reagenser benyttet i analysering av aldosteron på UHPLC-MS/MS ved Seksjon spesiell biokjemi

Reagens	Leverandør	Annet
Renset vann		Type 1
Metanol CH_3OH	VWR International AS	LiChrosolv. Hypergrade for UHPLC-MS
Tert-Butylmethyleter $(CH_3)_3COCH_3$	VWR International AS	LiChrosolv
Ammoniumfluorid NH_4F	Sigma-Aldrich Norway AS	
Metanol		30% v/v. Metanol som tilsettes 7/10 renset vann type 1
Mobilfase A		Vann med 5mmol/L Ammoniumfluorid NH_4F
Mobilfase B		Metanol CH_3OHmed 5mmol/L Ammoniumfluorid NH4F

2.5 Utstyr brukt til analyse av aldosteron på UHPLC-MS/MS

Tabell 2.4: Utstyr benyttet til prøvetaking, prøveopparbeidelse og analyse av aldosteron.

Utstyr	Leverandør	Annet
Serumrør uten gel	Vacuette	6 mL
Serumrør med gel	Vacuette	5 mL
N_2-gass til inndamping	Fra sentralanlegg	
N_2-gass til MS/MS	Atlas Copco	PSA Nitrogen Generator NGP10, drives med trykkluft fra sentralanlegg. Output pressure (fra buffertank) 80 - 100 psi
N_2-gass til QQQ kollisjonscelle	AGA	Arbeidstrykk 1-2 bar. 2098 HiQ Nitrogen 6.0 (10L)
Dispenser	VWR International AS	Brand Dispensette organic, analog. Volum 1-5 mL
Eppendorfrør med filter	Millipore	Ultrafree 0,22 um filter unit
Kolonne	Sigma-Aldrich Norway AS	Ascentis Express C18, 5cm x 2,1mm, 2,7 um.
Tuning løsning	Matriks AS	ESI-L Low consentration tuning mix
Varmeblokk		

2.5.1 Analyseinstrument

Alle prøver, standarder og kontroller ble analysert på Agilent 6490 Triple Quadrupole MS/MS, som er koblet til en UHPLC 1290 infinity. Hele instrumentet er fra Agilent Technologies og leveres av Matriks AS.

2.6 Fremgangsmåte

Alle alikvotene fra hver deltaker ble analysert som én batch. Prøveopparbeidelsen av prøvene i holdbarhetsundersøkelsen ble utført på samme måte som seksjonen vanligvis behandler aldosteronprøver. Prøver, standarder og kontroller ble romtemperert og blandet.

Deretter ble prøver og kontroller overført til glassrør og tilsatt intern standard. Ekstraksjonsløsning; tert-butylmethyleter ble tilsatt for å ekstrahere aldosteron over i organisk fase. Glassene ble sentrifugert ved 3000 x g i 5 minutt, og den organiske fasen ble overført til inndampingsglass. Nitrogengass ble tilført hvert inndampingsglass ved 37 °C for å dampe prøvene til tørrhet, og prøvene ble deretter reoppløst med 30 % metanol. Prøvene og kontrollene ble mikset og pipettert i eppendorfrør med filter, og sentrifugert på 9000 x g i 1-2 min. Etter sentrifugering ble væsken overført til prøvekopper. Deretter ble prøver, kontroller og standarder plassert på et brett tilhørende instrumentet, og aldosteronkonsentrasjonen ble målt ved UHPLC-MS/MS. Signalene fra instrumentet ble overført til programvaren tilhørende instrumentet, og resultatene ble beregnet i pmol/L aldosteron i prøven. Analyseprinsippet er beskrevet nærmere i kapittel 1.5.

2.7 Statistiske analyser

For å bearbeide analyseresultatene ble det benyttet et regneark fra NOKLUS som er laget til holdbarhetsundersøkelser (11). Regnearket inneholder statistiske beregninger som er aktuelle for vurdering av prøvematerialets holdbarhet. I regnearket beregnes konsentrasjonsendring i prosent fra nullprøven, som er den første prøven som er fryst ned like etter sentrifugering. Dette gjøres for de tre oppbevaringsmetodene. Disse prosentandelene av nullprøvene, er tallene som benyttes i videre beregninger. Det er for at nivået på konsentrasjonen til prøven ikke skal ha noe å si, kun endring fra første prøve. I dette prosjektet brukes regnearket som kalles "Batch vs A"-metoden, da prøvene kan lagres stabilt ved -80°C frem til analysering. Resultatene ble ført inn i sitt respektive tidsintervall og det ble beregnet endring av aldosteronkonsentrasjon i forhold til nullprøven. Det betyr at nullprøven blir satt som 100%, mens de andre analyseverdiene blir regnet som prosent av nullverdien. For eksempel hvis nullprøven er 150 pmol/L vil det bli satt til 100%, og en prøve som er 120 pmol/L vil bli satt som 80%. Regnearket leverer også et linjediagram av alle prøvene, der hvert analyseresultat har sitt eget punkt og det trekkes linje mellom prøvene som tilhører samme deltaker og metode. Fullstendig resultat fra disse beregningene kan man se i vedlegg D.

Regnearket som har blitt brukt, regner ut gjennomsnitt, standardavvik (SD), standardfeil (SEM), t-verdi, t x SEM. Gjennomsnittet benyttes for å se om det er en trend om konsentrasjonen av aldosteron synker, øker eller forblir uendret med tiden. Gjennomsnittet sier ikke noe om spredningen av resultatene. For å vurdere dette benyttes konfidensintervall.

90 % konfidensintervall ble funnet ved hjelp av t-verdi x SEM. Konfidensintervallet inneholder det sanne gjennomsnittet med 90 % sikkerhet, og det er et mål på feilmarginen og angis i prosent. Konfidensintervallgrensene sammenlignes med tillatt bias. Dersom 90 % konfidensintervallet havner utenfor tillatt akseptgrense (100 % ± bias), betyr det at holdbarhetskriteriet ikke er oppfylt (10).

For å kunne avgjøre om aldosteron er holdbart i serum ved romtemperatur etter kravene beskrevet i kapittel 1.2, ble det først vurdert om enkeltverdier havnet utenfor tillatt totalfeil. Deretter ble konfidensintervallene sammenlignet med tillatt bias. Dersom alle verdier havner innenfor tillatt totalfeil, og gjennomsnittskonsentrasjonene er innenfor tillatt bias kan det konkluderes at aldosteron er holdbart i serum oppbevart i romtemperatur til og med fire døgn.

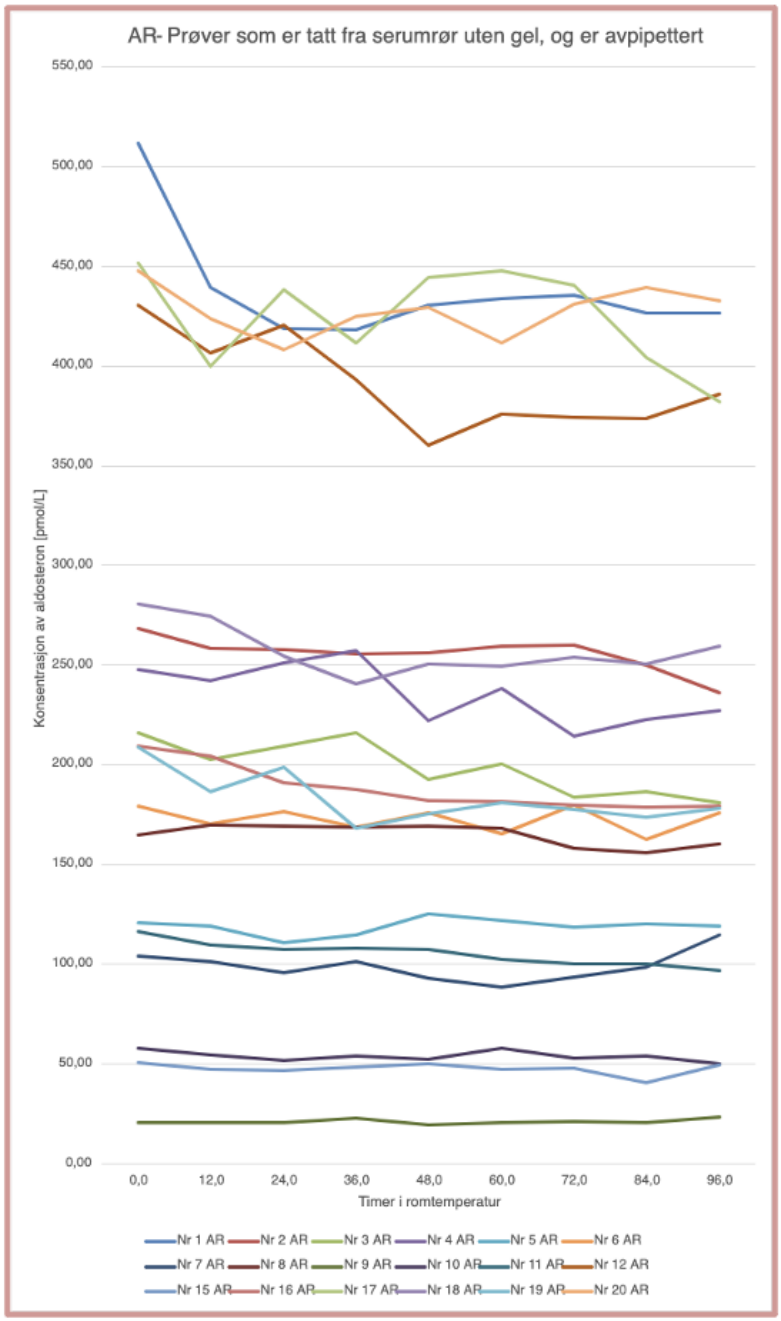
3 Resultater

Holdbarheten av aldosteron i serum oppbevart i romtemperatur ble undersøkt, da tidligere holdbarhetsundersøkelser har vist at holdbarheten synker allerede etter tre døgn. I denne bacheloroppgaven ble det analysert prøver fra 20 friske frivillige. Fra hver deltaker ble det tatt venøse blodprøver på serumrør uten gel (AR), serumrør med gel som ble avpipettert etter sentrifugering (AGR) og serumrør med gel, hvor prøvene ble stående på gel til alikvotene ble tatt ut (GR). Grensen for tillatt totalfeil er 42 % og bias er 13 %.

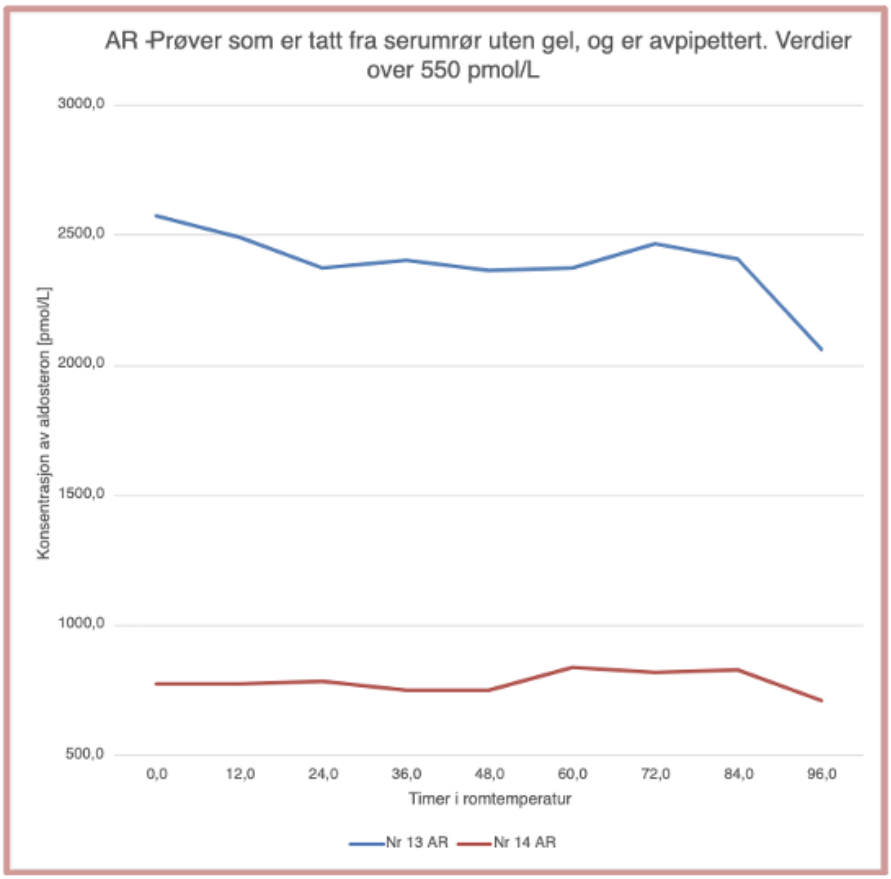
3.1 Holdbarhet av aldosteron i avpipettert serum tatt på serumrør uten gel

For å undersøke holdbarheten av aldosteron i serum ble det tatt tre serumrør uten gel per deltaker. Det ble laget totalt 9 alikvoter med 12 timers mellomrom inntil 96 timer for hver deltaker, som ble fryst ved -80 °C. Alle alikvotene fra samme deltaker ble analysert i samme batch på UHPLC-MS/MS, som beskrevet i kapittel 1.5.

Figur 3.1 og figur 3.2 viser konsentrasjonen av aldosteron i prøvene tatt på serumrør uten gel ved de ulike oppbevaringstidspunktene. Disse viser utviklingen for hver enkelt deltaker. Figur 3.1 inneholder aldosteronkonsentrasjoner under 550 pmol/L, mens 3.2 inneholder konsentrasjonene over 550 pmol/L. Resultatene er fordelt på to figurer fordi det er stor differanse mellom høyeste og laveste resultat.



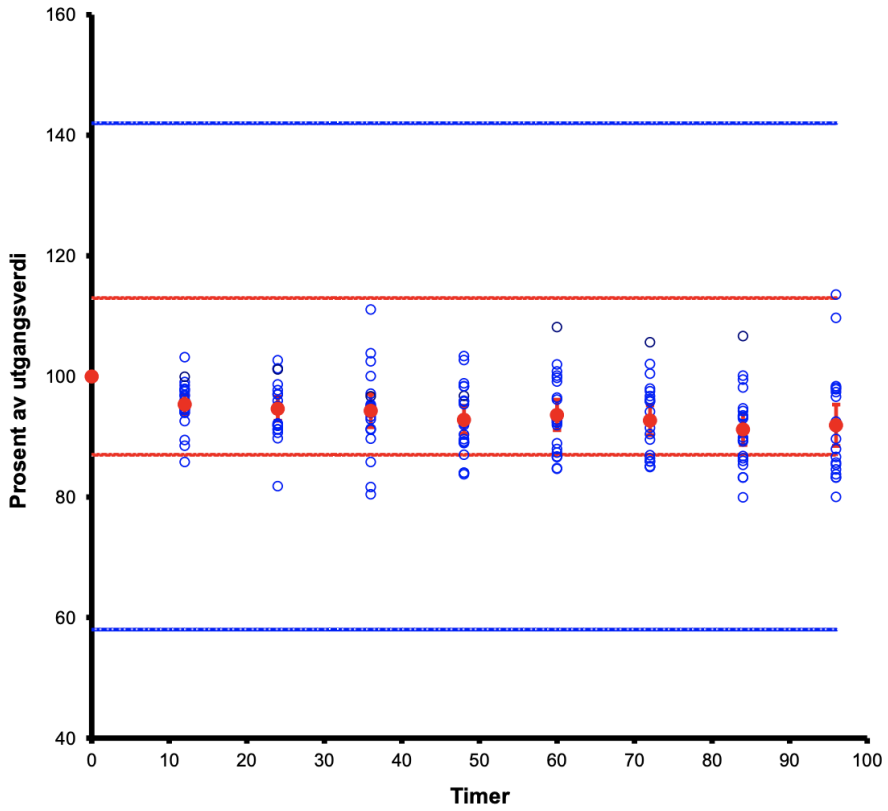
Figur 3.1: Aldosteronverdi i prøver tatt på serumrør uten gel (AR) oppbevart i inntil 96 timer i romtemperatur. Viser prøveresultater under 550 pmol/L aldosteron.



Figur 3.2: Aldosteronverdi i prøver tatt på serumrør uten gel (AR) oppbevart i inntil 96 timer i romtemperatur. Viser prøveresultater over 550 pmol/L aldosteron.

Utviklingen av aldosteronkonsentrasjonen for oppbevaringsmetoden AR for den enkelte deltaker er vist i figur 3.1 og figur 3.2. Konsentrasjonene kan se ut til å synke noe med økende oppbevaringstid, men det er ingen klar trend.

Figur 3.3 viser aldosteronverdi som prosent av nullverdi for hver enkelt måling (blå punkter) og gjennomsnittet av prosent av nullverdi for hvert måletidspunkt (røde punkter). De blå og røde horisontale linjene er grensene for henholdsvis tillatt totalfeil og tillatt bias.



Figur 3.3: De blå punktene viser enkeltresultater i prosent av nullverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av nullverdi. Området mellom de røde linjene er tillatt bias. De lottrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene.

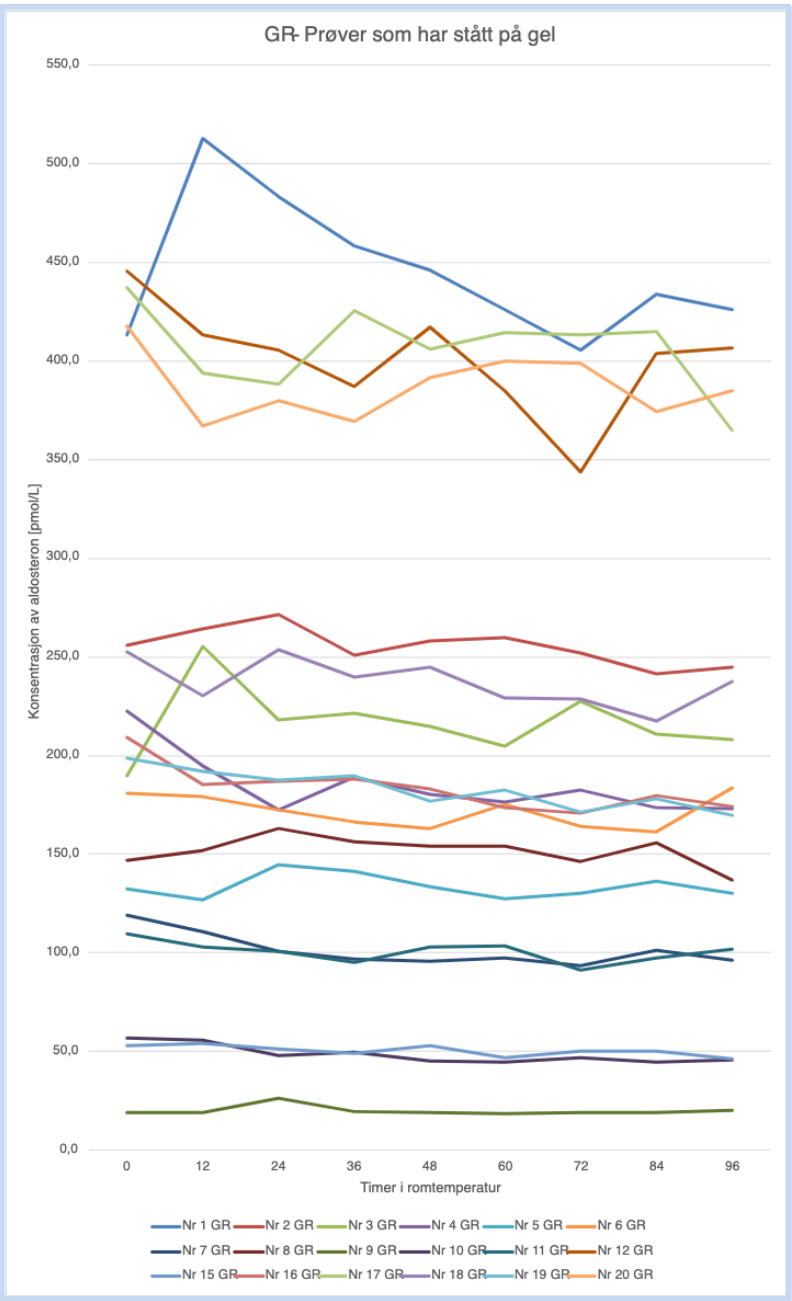
Resultatet vist i figur 3.3 viser at alle enkeltverdiene var innenfor tillatt totalfeil. Alle gjennomsnittene med deres tilhørende 90 % konfidensintervall var innenfor tillatt bias. Gjennomsnittsverdiene viser en noe synkende trend av aldosteronkonsentrasjon med økende oppbevaringstid i romtemperatur.

For fullstendig oversikt over alle resultater og beregninger, se vedlegg D.1.

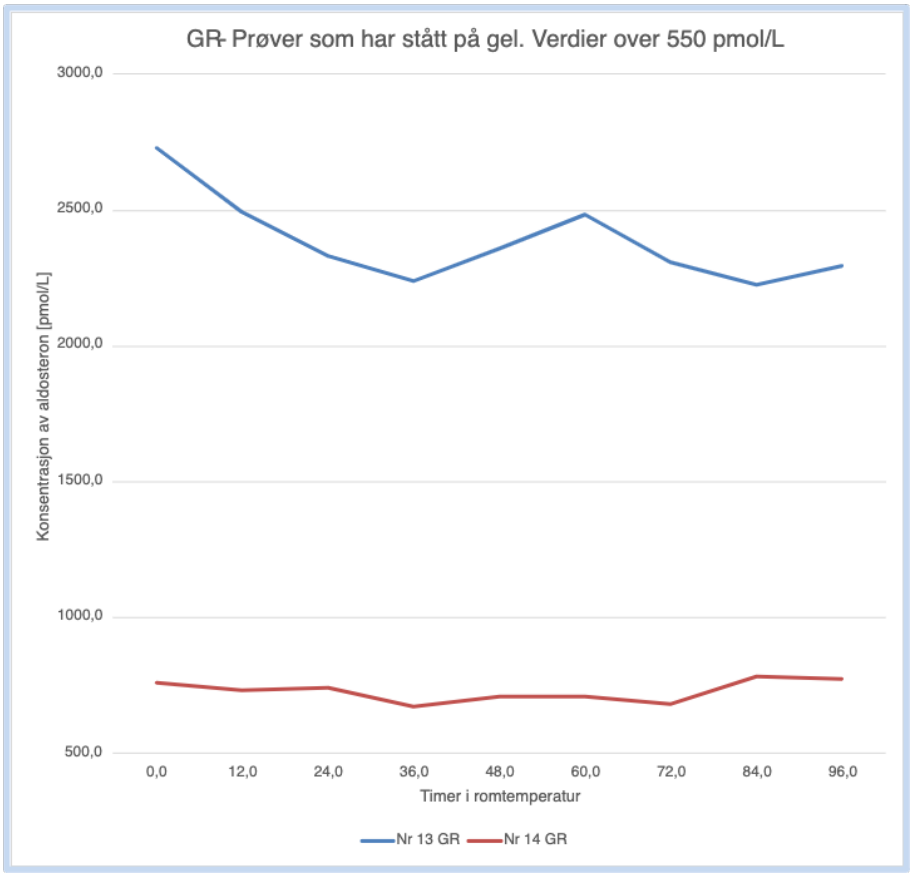
3.2 Holdbarhet av aldosteron i serum tatt på serumrør med gel

For å undersøke holdbarheten av aldosteron i serum som sto på gel ble det tatt venøse prøver serumrør med gel av alle deltakerne. Det ble laget totalt 8 alikvoter med 12 timers mellomrom inntil 96 timer for hver deltaker, som ble fryst ved -80 °C. For nullprøven ble det benyttet samme prøve som nullprøven for serum avpipettert fra gel, da den ble pipettert av og fryst ned like etter sentrifugering. Alle alikvotene fra samme deltaker ble analysert i samme batch på UHPLC-MS/MS, som beskrevet i kapittel 1.5.

Figur 3.4 og figur 3.5 viser konsentrasjonen av aldosteron i prøvene som sto på serumrør med gel ved de ulike oppbevaringstidspunktene. Disse viser utviklingen for hver enkelt deltaker. Figur 3.4 inneholder aldosteronkonsentrasjoner under 550 pmol/L, mens 3.5 inneholder konsentrasjonene over 550 pmol/L. Resultatene er fordelt på to figurer fordi det er stor differanse mellom høyeste og laveste resultat.



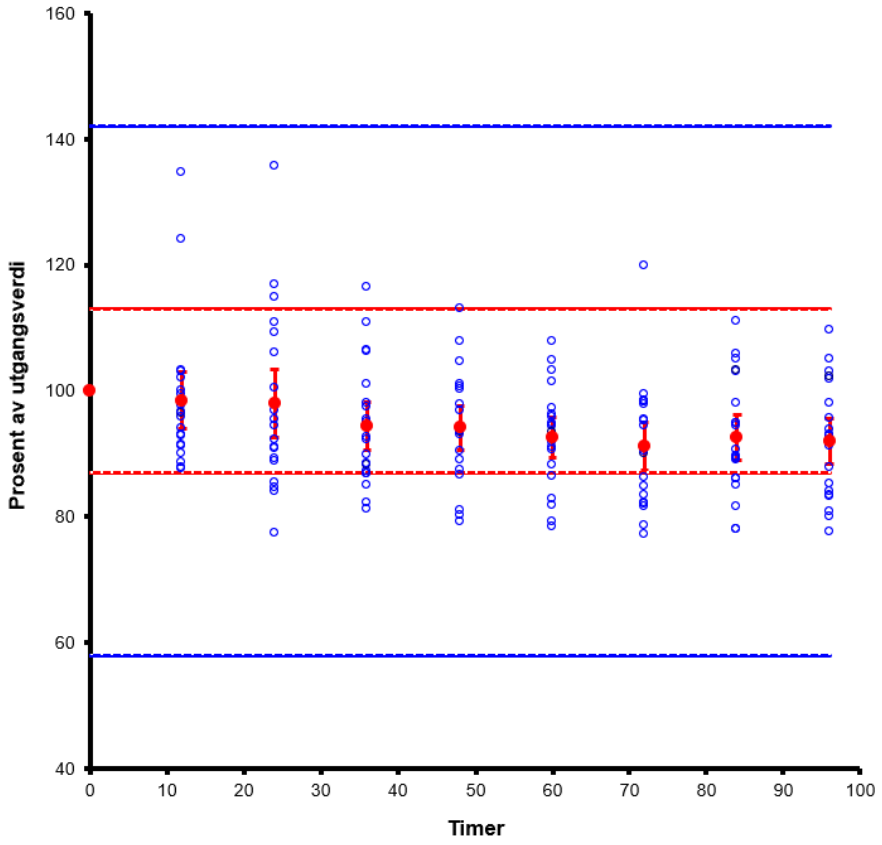
Figur 3.4: Aldosteronverdi i prøver oppbevart på serumrør med gel (GR)i inntil 96 timer i romtemperatur. Viser prøveresultater under 550 pmol/L aldosteron.



Figur 3.5: Aldosteronverdi i prøver oppbevart på serumrør med gel (GR) i inntil 96 timer i romtemperatur. Viser prøveresultater over 550 pmol/L aldosteron.

Utviklingen av aldosteronkonsentrasjonen for oppbevaringsmetoden GR for den enkelte deltaker er vist i figur 3.4 og figur 3.5. Konsentrasjonene kan se ut til å synke noe med økende oppbevaringstid, men det er ingen klar trend.

Figur 3.6 viser aldosteronverdi som prosent av nullverdi for hver enkelt måling (blå punkter) og gjennomsnittet av prosent av nullverdi for hvert måletidspunkt (røde punkter). De blå og røde horisontale linjene er grensene for henholdsvis tillatt totalfeil og tillatt bias.



Figur 3.6: De blå punktene viser enkeltresultater i prosent av nullverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av nullverdi. Området mellom de røde linjene er tillatt bias. De lottrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene.

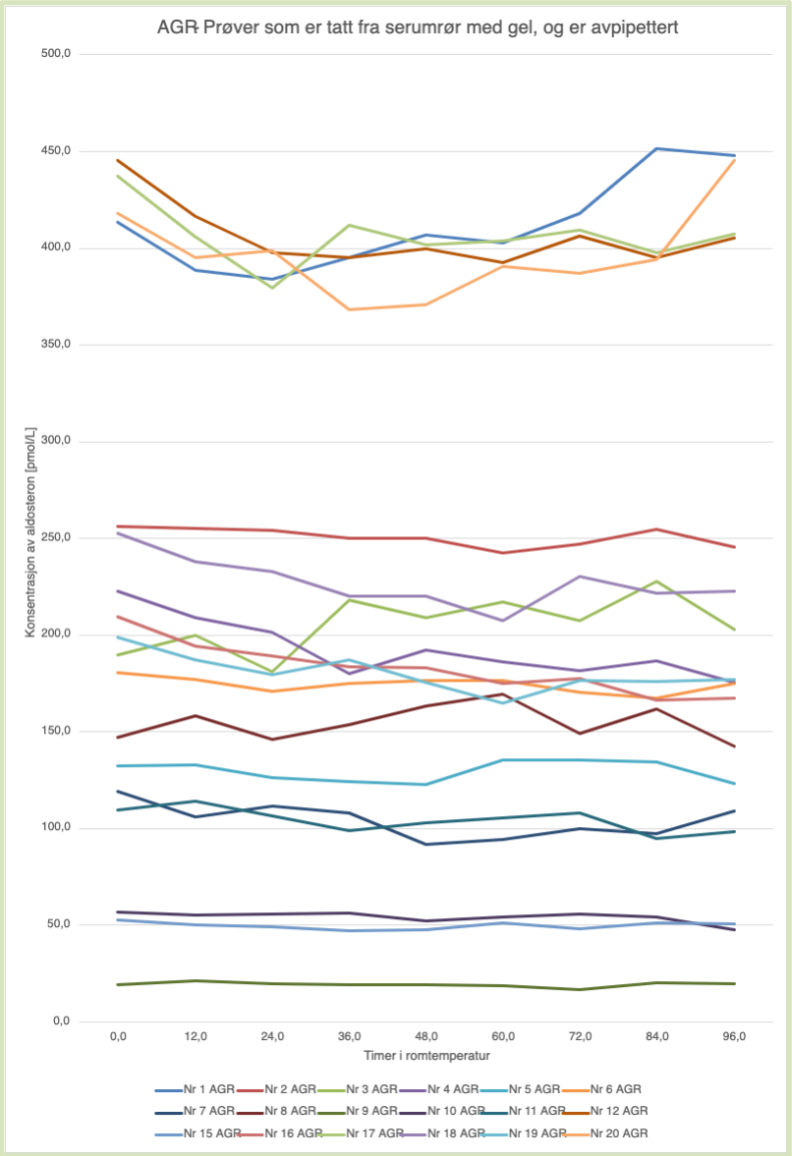
Resultatet vist i figur 3.6 viser at alle enkeltverdiene var innenfor tillatt totalfeil. Alle gjennomsnittene med deres tilhørende 90 % konfidensintervall var innenfor tillatt bias. Gjennomsnittsverdiene viser en noe synkende trend av aldosteronkonsentrasjon med økende oppbevaringstid i romtemperatur.

For fullstendig oversikt over alle resultater og beregninger, se vedlegg D.2.

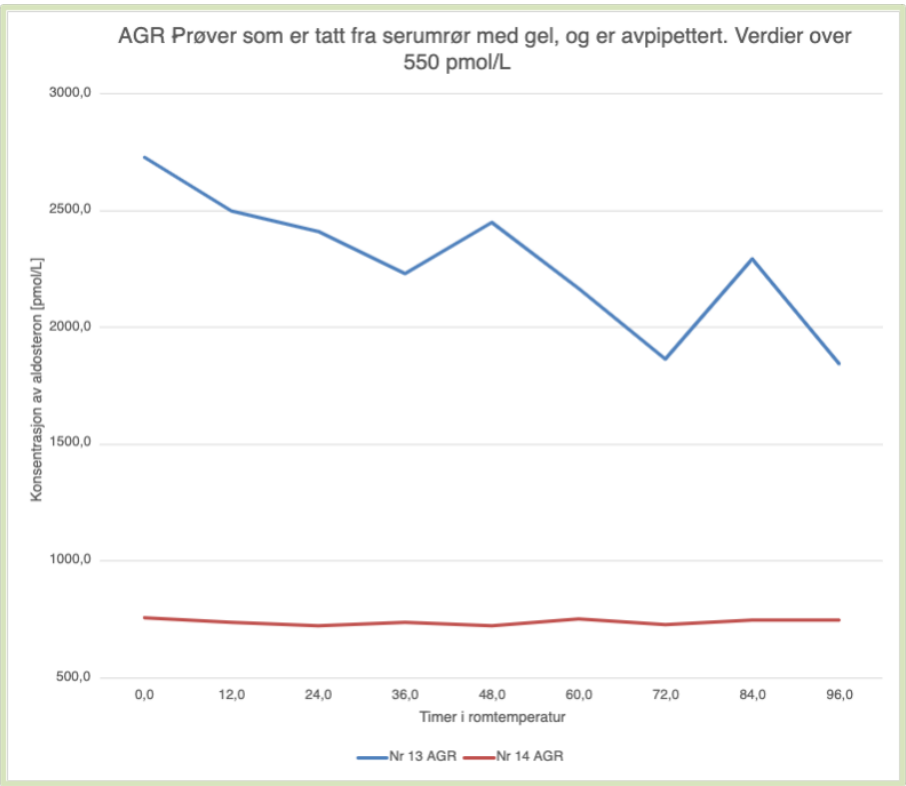
3.3 Holdbarhet av aldosteron i avpipettert serum tatt på serumrør med gel

For å undersøke holdbarheten av aldosteron i serum avpipettert fra gelrør ble det tatt venøse prøver serumrør med gel av alle deltakerne. Det ble laget totalt 9 alikvoter med 12 timers mellomrom inntil 96 timer for hver deltaker, som ble fryst ved -80 °C. Alle alikvotene fra samme deltaker ble analysert i samme batch på UHPLC-MS/MS, som beskrevet i kapittel 1.5.

Figur 3.7 og figur 3.8 viser konsentrasjonen av aldosteron i prøvene som sto på serumrør med gel ved de ulike oppbevaringstidspunktene. Disse viser utviklingen for hver enkelt deltaker. Figur 3.7 inneholder aldosteronkonsentrasjoner under 550 pmol/L, mens 3.8 inneholder konsentrasjonene over 550 pmol/L. Resultatene er fordelt på to figurer fordi det er stor differanse mellom høyeste og laveste resultat.



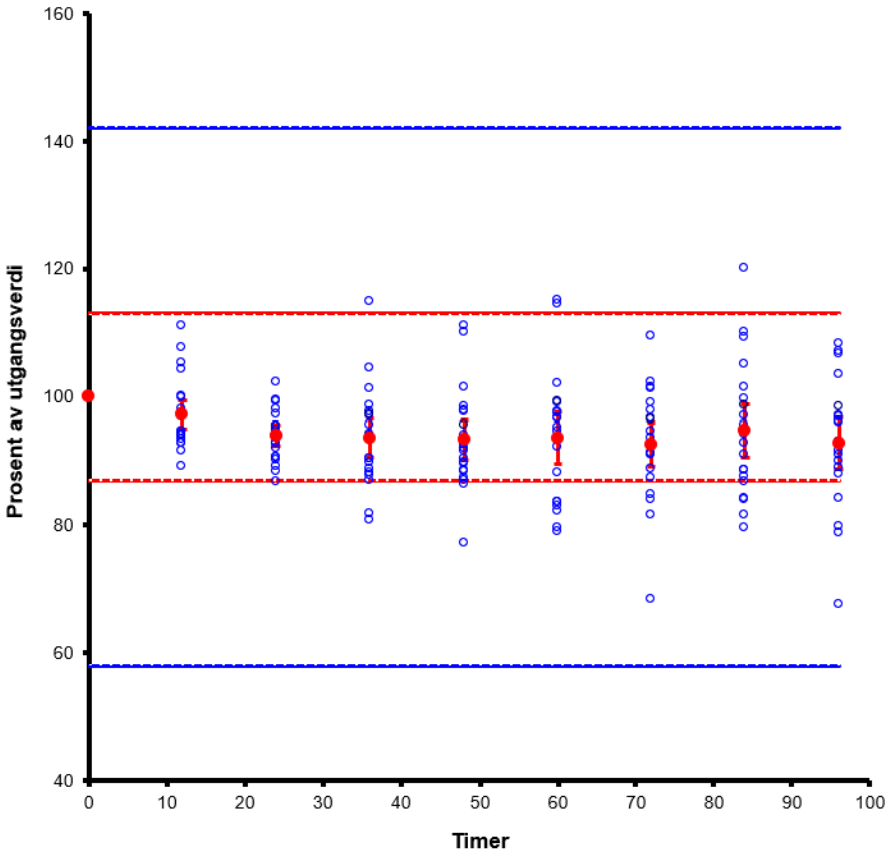
Figur 3.7: Aldosteronverdi i prøver avpipettert fra serumrør med gel (AGR) oppbevart i romtemperatur i inntil 96 timer i romtemperatur. Viser prøveresultater under 550 pmol/L aldosteron.



Figur 3.8: Aldosteronverdi i prøver avpipettert fra serumrør med gel (AGR) oppbevart i romtemperatur i inntil 96 timer Viser prøveresultater over 550 pmol/L aldosteron.

Utviklingen av aldosteronkonsentrasjonen for oppbevaringsmetoden AGR for den enkelte deltaker er vist i figur 3.7 og figur 3.8. Konsentrasjonene kan se ut til å synke noe med økende oppbevaringstid, men det er ingen klar trend.

Figur 3.9 viser aldosteronverdi som prosent av nullverdi for hver enkelt måling (blå punkter) og gjennomsnittet av prosent av nullverdi for hvert måletidspunkt (røde punkter). De blå og røde horisontale linjene er grensene for henholdsvis tillatt totalfeil og tillatt bias.



Figur 3.9: De blå punktene viser enkeltresultater i prosent av nullverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av nullverdi. Området mellom de røde linjene er tillatt bias. De lottrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene.

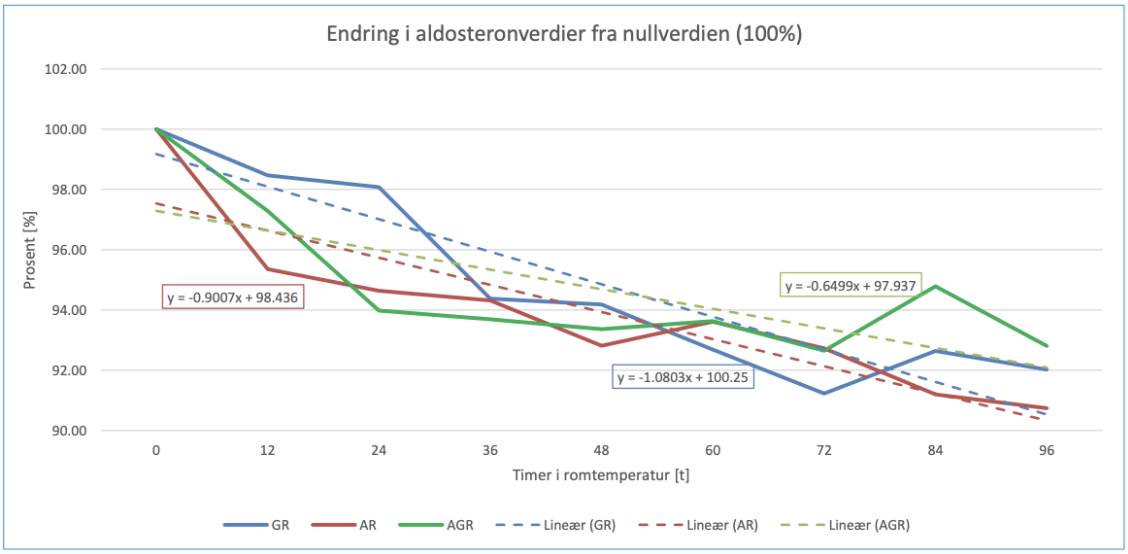
Resultatet vist i figur 3.9 viser at alle enkeltverdiene var innenfor tillatt totalfeil. Alle gjennomsnittene med deres tilhørende 90 % konfidensintervall var innenfor tillatt bias. Gjennomsnittsverdiene viser en noe synkende trend av aldosteronkonsentrasjon med økende oppbevaringstid i romtemperatur.

For fullstendig oversikt over alle resultater og beregninger, se vedlegg D.3

3.4 Sammenligning av de tre oppbevaringsmetodene

De tre oppbevaringsmetodene ble sammenlignet med hverandre for å undersøke om en av metodene gir bedre holdbarhet ved oppbevaring av aldosteronprøver enn de andre. Konsentrasjonen av aldosteron i prosent av nullverdi og konfidensintervall for hver oppbevaringsmetode ble sammenlignet. I hver batch ble alle alikvotene for de tre oppbevaringsmetodene analysert på UHPLC-MS/MS som beskrevet i kapittel 1.5.

Figur 3.10 viser utviklingen over tid av gjennomsnittsendring av aldosteronkonsentrasjon fra nullverdi for de tre oppbevaringsmetodene. Hvert punkt i diagrammet viser gjennomsnittsverdien av prosenten av nullverdi for alle de 20 prøveresultatene tatt ved tilhørende tidspunkt og oppbevaringsmetode. Trendlinjer er lagt på for hver oppbevaringsmetode og viser trenden endringene i aldosteronkonsentrasjon har. Stigningstallet i likningene for trendlinjene viser hvilken metode som endrer seg mest.



Figur 3.10: De heltrukne linjene representerer hver sin oppbevaringsmetode, med tilhørende stiplede trendlinjer. Boksene inneholder likningene til trendlinjene i samme farge. Hvert punkt på linjene viser gjennomsnittet av alle prøvene ved de ulike oppbevaringstidspunktene.

Resultatet vist i figur 3.10 viser at alle oppbevaringsmetodene gir en noe synkende aldosteronkonsentrasjon i løpet av perioden som er undersøkt. Ifølge trendlinjene er det oppbevaringsmetoden for serum stått på gel (GR) som synker mest over tid. Oppbevaringsmetoden avpipettert serum fra serumrør uten gel (AR) synker noe mindre, mens oppbevaringsmetoden avpipettert serum fra serumrør med gel (AGR) har minst fall over tid.

Konfidensintervallene beregnes ut ifra gjennomsnittet av aldosteronkonsentrasjonen i prosent fra nullverdi (100 %). Tabell 3.1 viser konfidensintervallene for hver metode fordelt etter hvor mange timer prøvene er oppbevart i romtemperatur. 90 % konfidensintervall viser hvor man med 90 % sikkerhet kan si at det sanne gjennomsnittet befinner seg. Konfidensintervallene kan brukes for å se spredningen på prøvene for tilhørende tidspunkt og oppbevaringsmetode.

Tabell 3.1: 90 % konfidensintervall for gjennomsnittet av prosent av nullverdi for hvert oppbevaringstidspunkt.

Oppbevaringstid i RT	**90 % Konfidensintervall for prosent av nullverdi**		
timer	AR	GR	AGR
12	93,8 - 96,9	93,9 - 103,0	95,1 - 99,5
24	92,7 - 96,6	92,7 - 103,5	92,4 - 95,5
36	91,6 - 97,1	90,6 - 98,1	90,7 - 96,7
48	90,5 - 95,1	90,7 - 97,7	90,3 - 96,4
60	91,1 - 96,1	89,5 - 95,9	89,7 - 97,6
72	90,3 - 95,2	87,4 - 95,1	89,2 - 96,1
84	88,6 - 93,8	89,0 - 96,3	90,7 - 98,9
96	88,5 - 95,3	88,5 - 95,6	88,9 - 96,7

I tabell 3.1 ser vi at konfidensintervallet for aldosteronprøvene har en synkende trend uansett oppbevaringsmetode. Resultatene viser likevel at konfidensintervallet er innenfor tillatt bias på 13% som gir akseptgrenser for konfidensintervallet på 87% og 113%. Da konfidensintervallene er innenfor akseptgrensene på begge sider kan man med stor sikkerhet si at det sanne gjennomsnittet befinner seg innenfor tillatt bias.

4 Diskusjon

Resultater fra denne holdbarhetsundersøkelsen viser at aldosteronverdier for alle prøver for de tre oppbevaringsmetodene lå innenfor tillatt totalfeil. Gjennomsnittsverdiene for prosentvis endring fra utgangsverdi er innenfor tillatt bias ved alle måletidspunktene. Med bias på 13 %, er akseptgrensen for konfidensintervallene [87 - 113]. Konfidensintervallene er innenfor tillatt bias ved alle oppbevaringstidspunktene. Dette tyder på at prøvematerialet er holdbart i 96 timer med de kriteriene som er satt for analysen, for alle tre oppbevaringsmetodene. Resultatene viser at begge kriteriene NOKLUS har for at prøvematerialet skal vurderes som holdbart, er oppfylt.

Alle analyseseriene ble godkjent, og prøveresultatene ble verifisert, som beskrevet i kapittel 1.5.6. Kontrollene som ble analysert sammen med prøvene var alle innenfor kravene som er gitt for analysen (± 3 standardavvik), og standardene var godkjent. Dette indikerer at analyseresultatene kan vurderes som pålitelige.

Resultatene viser at det er en synkende trend i aldosteronkonsentrasjonen med økende oppbevaringstid i romtemperatur. Avviket er likevel innenfor grensene for holdbarhet i 96 timer i romtemperatur, for alle tre oppbevaringsmetodene, se figurer 3.3, 3.6 og 3.9.

For å undersøke om det var forskjell i holdbarheten på de tre oppbevaringsmetodene, ble de sammenlignet i figur 3.10. Resultatet viste at aldosteronkonsentrasjonen sank ved alle tre oppbevaringsmetodene. Resultatene fra serum oppbevart på gel (GR) ser ut til å synke mest, men differansen på de tre oppbevaringsmetodene er liten. Kravene satt av NOKLUS er overholdt for alle tre metodene, og det ser ikke ut som om nevnte oppbevaringsbetingelser har hatt påvirkning på holdbarheten av aldosteron i serum.

Alle prøvene per deltaker blitt tatt samtidig. Preanalytiske faktorer som bruk av stase, blanding og hvor mye personen har vært stående før prøvetaking er lik for alle prøvene, og eventuelle avvik i disse faktorene gjelder da for alle prøveglassene tilhørende deltakeren og vil ikke påvirke analyseresultatene ulikt.

Referanseområdet for "oppegående" voksne er som nevnt i tabell 1.1; 76 - 588 pmol/L aldosteron. Fem av deltakere har verdier som er utenfor dette referanseområdet, tre under og to over. Dette kan tyde på at også prøver med høye og lave aldosteronverdier er holdbare, men utvalgsstørrelsen i disse områdene er for liten for å kunne si noe sikkert. Funn av unormale prøvesvar hos friske frivillige var ikke som forventet, og vi kan ikke

si noe om årsaken. Som nevnt i kapittel 1.4, kan enkelte medikamenter påvirke aldosteronkonsentrasjonen. Ved normal prøvetaking av aldosteron kan pasientene bli bedt om å slutte på disse medisinene på forhånd. I denne undersøkelsen er det ikke tatt hensyn til medikamentbruk. Ansvarlig lege ble kontaktet angående patologisk høye prøveresultater.

En tidligere holdbarhetsundersøkelse fra 2017, viste at prøvematerialet ikke var holdbart etter tre døgn, men man hadde da ingen målinger i perioden 0 – 3 døgn. Hensikten med denne bacheloroppgaven var derfor å undersøke når i dette tidsrommet prøvematerialet ikke lenger var holdbart. I motsetning til det som var forventet, viste resultatene våre at prøvematerialet er holdbart i 96 timer, altså 4 døgn. Innsamling, preparering og analysering av prøvene skal ha blitt gjort på samme måte i begge holdbarhetsstudiene, og det er vanskelig å peke på årsaker til at de to studiene har fått forskjellig resultat.

Ifølge Seksjon spesiell biokjemi er det oppgitt at steroidhormoner som ligner aldosteron har holdbarhet over 6 dager. Holdbarhetsundersøkelsen fra 2017 viste derfor mye kortere holdbarhet enn forventet. Resultatene fra vår holdbarhetsundersøkelse viser at aldosteron er holdbar til og med 96 timer innenfor holdbarhetskriteriene gitt av NOKLUS. I den forrige undersøkelsen ble det ikke analysert hver 12. time. Hvis vi kun ser på prøven ved 72 timer, gir den ingen informasjon om forløpet frem til måletidspunktet. Ved å ha analyseverdi for hver 12. time får vi et bedre bilde av holdbarheten av aldosteron over tid.

Funnene betyr at det går fint å fortsette med samme prosedyre for prøvetaking som brukes per dags dato; at prøvene tas og oppbevares på serumrør med gel (GR). Resultatene indikerer også at prøver fra primærhelsetjenesten fortsatt kan sendes med post selv om transporten kan ta opp til fire døgn. For prøvetakere betyr dette at aldosteron-prøver kan behandles på samme måte som før.

Fordi resultatene fra denne oppgaven viser lenger holdbarhet enn den tidligere undersøkelsen, kan det være behov for å gjenta holdbarhetsundersøkelsen. Dersom avdelingen ønsker det, kan det være nyttig å utvide studien til å omfatte oppbevaring i romtemperatur lenger enn fire dager, helst til syv dager. Det er også hensiktsmessig å fortsette med samme tidsintervall (hver 12. time) for å se når prøvematerialet eventuelt ikke lenger er holdbart. Det kan også anbefales å ha flere deltakere i studien.

5 Konklusjon

Holdbarhetsundersøkelsen viste at aldosteron er holdbart i serum oppbevart i romtemperatur i inntil 96 timer. Dette gjelder både serum avpipettert fra rør uten gel, serum avpipettert fra gelrør og serum oppbevart på gelrør. Prosedyren som benyttes av primærhelsetjenesten i dag for prøver som skal analysere aldosteron, er at de sendes på serumrør med gel uten å være frosset. Denne metoden kan fortsatt benyttes selv om postgangen kan ta opptil 4 dager.

Referanser

[1] M. Lie, "Holdbarhet av prøvematerialet - rapport, analyse: Aldosteron på lc-msms," *St. Olavs hospital*, 2018.

[2] J. P. Berg, "Hormoner." https://sml.snl.no/hormoner, Hentet 03.05.21.

[3] Wikipedia, "Aldosteron." https://en.wikipedia.org/wiki/Aldosterone, Hentet 10.05.21.

[4] Wikipedia, "Androstendione." https://en.wikipedia.org/wiki/Androstenedione, Hentet 03.05.21.

[5] Wikipedia, "Kortisol." https://no.wikipedia.org/wiki/Kortisol, Hentet 03.05.21.

[6] Avdeling for medisinsk biokjemi, "Aldosteron i serum." https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html, Hentet 26.04.21.

[7] Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitets sykehus, "Aldosteron i plasma." https://ehandboken.ous-hf.no/document/101818, Hentet 27.04.21.

[8] Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi, Haukeland universitetssjukehus, "Aldosteron." https://analyseoversikten.no/analyse/12, Hentet 27.04.21.

[9] Greiner Bio-One International, "Cat serum clot activator." https://shop.gbo.com/en/row/products/preanalytics/venous-blood-collection/vacuette-tube/serum/cat-serum-clot-activator/, Hentet 10.05.21.

[10] K. M. Aakre, P. Rustad, H. Eilertsen, T. Kalfoss, A. Åsberg, and A. H. Kristoffersen, "Nasjonalt prosjekt for standardisering av holdbarhetsforsøk," 2015.

[11] NOKLUS - Norsk kvalitetsforbedring av laboratorieundersøkelser, "Utføre et holdbarhetsforsøk?." https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/utfore-holdbarhetsforsok/, Hentet 19.04.21.

[12] J. Halse, "Aldosteron." https://sml.snl.no/aldosteron, Sist endret 10.12.20. Hentet 15.03.21.

[13] Nasjonal brukerhåndbok i Medisinsk Biokjemi, "Aldosteron." https://brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=52f1ac0d47611bafc3da, Hentet 15.03.21.

[14] MSD and the MSD Manuals, "Regulating blood pressure: The renin-angiotensin-aldosterone system." https://www.msdmanuals.com/en-jp/home/multimedia/figure/cvs_regulating_blood_pressure_renin, Hentet 03.05.21.

[15] NHI.no, "Hyperaldosteronisme." https://nhi.no/sykdommer/hormoner-og-naring/binyresykdommer/hyperaldosteronisme/, Sist endret 05.01.21.

[16] J. P. Berg, "Renin-angiotensin-aldosteron-systemet." https://snl.no/renin-angiotensin-aldosteron-systemet, Sist endret 21.10.20, Hentet 20.04.20.

[17] Laboratoriemedisink klinikk, St. Olavs Hospital, "Aldestron/renin-ratio." https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html, Hentet 20.04.2021.

[18] J. Saló, A. Ginès, L. Anibarro, W. Jiménez, R. Bataller, J. Clària, P. Ginès, F. Rivera, V. Arroyo, J. Rodés., "Effect of upright posture and physical exercise on endogenous neurohormonal systems in cirrhotic patients with sodium retention and normal supine plasma renin, aldosterone, and norepinephrine levels," *Hepatology*, vol. 22, no. 2, pp. 479–87, 1995.

[19] B. Almås, "Hormonmålinger," *Hormonlaboratoriet - Haukeland universitetssykehus*, 2014.

[20] D. Zhong, Q. Ji, and J.-N. Mess, *Advanced LC-MS Applications in Bioanalysis*. Future Science Ltd, 2015.

[21] Matriks, "Prøveopparbeidelse." https://www.matriks.no/produkter/kolonner-forbruksvarer/pr%C3%B8veopparbeidelse, Hentet 06.05.21.

[22] A. L. Lydersen and N. Nesse, "Ekstraksjon - separasjonsmetode."

https://snl.no/ekstraksjon_-_separasjonsmetode, Sist endret 28.02.2018. Hentet 06.05.21.

[23] H. H. Nestande, "Parallell ekstraksjon av basiske legemidler over kunstige væskemembraner," pp. 6–7, 2018.

[24] T. Hansen, "Aldosteron i serum, LC/MS-MS." Avdeling for medisinsk biokjemi, 07.01.21.

[25] T. Holtebekk, J. O. Eeg, and J. Linder, "Nøytron." https://snl.no/nøytron, Sist endret 28.12.19. Hentet 07.05.21.

[26] Laboratoriemedisink klinikk, St. Olavs hospital, "Serum-aldosteron." https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html, Hentet 20.04.21.

[27] Sigma Aldrich, "Aldosterone-2,2,4,6,6,21,21-d7." https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/706035?lang=enregion=NO, Hentet 07.05.21.

[28] M. Lie, "Valideringsrapport," *Seksjon for spesiell biokjemi*, 2014.

[29] C. A. Burtis and D. E. Bruns, *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*. Elsevier Health Sciences, 2014.

[30] Agilent, "The 6490 triple quad lc/ms enables the highest sensitivity for peptide quantitation in plasma," pp. 1–2, 2010.

[31] E. Laboratories, "Ultra high performance liquid chromatography (uhplc)." https://www.eag.com/techniques/chromatography/ultra-high-performance-liquid-chromatography-uhplc/, Hentet 22.03.21.

[32] Agilent Technologies, "Agilent 6400 series triple quadrupole lc/ms system - consept guide," pp. 13–25, 2012.

[33] Grethe Wibetoe, "Kromatografi." https://snl.no/kromatografi, Sist endret 22.12.20. Hentet 07.05.21.

[34] T. Holtebekk, E. Uggerud, and G. Wibetoe, "Massespektrometer."

[35] G. Wibetoe, "Presisjon - kjemi." https://snl.no/presisjon_-_kjemi, Hentet 15.04.21.

[36] Fürst, "Nøyaktighet." https://www.furst.no/om-furst/kvalitetssikring/noyaktighet/, Hentet 15.04.21.

[37] European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, "EFLM Biological variation database – aldosteron meta analysis." https://biologicalvariation.eu/search?q=aldosteron, Hentet 23.04.21.

Vedlegg

A RÅDATA 43

B STANDARDER 45

C KONTROLLER 47

D STATISTISKE PARAMETRE 48

E PROTOKOLL FOR PRØVEINNSAMLING 50

F TIDLIGERE HOLDBARHETSUNDERSØKELSE 53

A Rådata

Holdbarhet av Aldosteron i romtemperatur (LS-MSMS)

Tillatt bias 13 %, og tillatt totalfeil 42 %

		Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
	Timer	0	12	24	36	48	60	72	84	96
	Prøve nr	Målte verdier								
1	AR	512,0124	439,43	418,94	418,10	430,23	434,09	435,71	426,40	426,40
	GR	413,39	513,14	483,29	458,40	446,13	426,40	405,87	434,09	426,03
	AGR	413,39	388,57	383,91	395,41	407,05	402,85	418,13	451,48	447,78
2	AR	268,68	258,23	257,87	255,67	256,38	259,29	259,98	249,92	236,35
	GR	256,02	264,46	271,33	251,00	258,42	259,64	251,81	241,47	244,63
	AGR	256,02	255,35	254,33	249,92	250,13	242,26	247,17	254,91	245,60
3	AR	215,97	202,95	209,66	216,11	192,43	200,49	183,50	186,72	180,97
	GR	189,79	255,45	217,92	221,17	214,50	204,66	227,45	210,64	208,06
	AGR	189,79	199,91	180,95	218,11	208,79	217,02	207,62	227,72	203,08
4	AR	247,96	242,52	251,28	257,51	222,19	238,50	214,30	222,95	227,14
	GR	222,54	194,90	172,23	189,25	180,47	176,20	182,55	173,69	172,84
	AGR	222,54	209,18	201,64	179,88	192,48	186,00	181,40	186,78	175,53
5	AR	120,92	119,16	111,06	114,60	125,02	121,92	118,51	120,29	118,97
	GR	132,58	126,97	144,80	141,18	133,53	127,64	130,32	136,57	129,99
	AGR	132,58	132,74	126,54	124,29	122,91	135,30	135,42	134,57	123,24
6	AR	179,04	170,30	176,69	168,92	176,12	165,57	179,88	162,61	175,73
	GR	180,56	179,42	172,34	166,61	163,30	175,38	163,96	161,21	183,74
	AGR	180,56	177,09	171,06	175,06	176,69	176,30	170,69	167,45	175,18
7	AR	104,31	101,15	95,77	101,34	92,80	88,34	93,38	98,36	114,47
	GR	119,19	110,93	100,82	96,69	95,54	97,42	93,72	101,36	96,29
	AGR	119,19	106,26	111,62	107,83	91,94	94,23	100,17	97,26	109,26
8	AR	164,65	169,95	169,08	168,78	169,18	167,93	157,95	155,93	160,40
	GR	147,12	151,64	163,02	156,40	153,97	154,10	146,30	155,61	136,74
	AGR	147,12	158,42	145,87	153,56	163,49	169,21	149,19	161,97	142,32
9	AR	20,55	20,36	20,82	22,84	19,70	20,58	20,98	20,59	23,35
	GR	19,19	19,19	26,02	19,40	18,78	18,13	18,78	18,83	20,13
	AGR	19,19	21,29	19,61	19,43	19,44	18,99	16,79	20,15	19,86
10	AR	57,77	54,57	51,86	54,27	52,21	57,64	52,83	53,91	50,06
	GR	56,85	55,45	47,74	49,36	44,97	44,61	46,75	44,35	45,43
	AGR	56,85	55,08	55,71	56,10	52,08	54,11	55,56	54,37	47,82
11	AR	116,41	109,51	107,27	108,12	107,37	102,38	99,97	100,12	96,91
	GR	109,39	102,89	100,81	95,36	102,94	103,26	91,34	97,29	101,62
	AGR	109,39	114,05	106,33	98,81	102,87	105,74	108,29	94,91	98,52
12	AR	430,30	406,43	420,51	392,92	360,57	376,03	374,21	373,50	385,82
	GR	445,65	413,38	405,34	387,29	417,21	384,79	343,97	403,98	406,67
	AGR	445,65	416,30	397,99	395,39	399,52	392,91	406,44	394,98	405,43
13	AR	2574,06	2490,11	2373,50	2402,02	2366,40	2375,86	2467,36	2408,23	2060,02
	GR	2727,43	2494,35	2330,12	2239,37	2360,54	2483,17	2310,55	2227,10	2293,35
	AGR	2727,43	2496,73	2410,41	2230,94	2450,06	2169,44	1864,84	2295,16	1843,54
14	AR	773,99	773,68	783,05	748,59	749,14	837,53	818,04	825,80	709,70
	GR	758,63	731,83	741,90	669,02	708,37	709,13	682,27	782,85	774,83
	AGR	758,63	738,80	723,77	737,80	724,78	752,75	731,29	748,72	747,32
15	AR	50,79	47,03	46,69	48,44	50,22	47,13	47,82	40,61	49,71
	GR	52,83	53,87	51,14	48,95	52,92	46,57	50,32	50,14	46,40
	AGR	52,83	50,04	49,04	47,41	47,75	51,06	48,12	51,28	50,89
16	AR	209,31	204,16	190,95	187,68	182,14	181,28	179,88	178,61	179,42
	GR	209,29	185,36	186,82	187,85	182,79	173,36	170,79	179,87	174,09
	AGR	209,29	194,18	189,44	183,85	183,07	174,89	177,35	166,57	167,16
17	AR	451,62	399,71	438,12	411,79	444,41	447,75	440,61	404,21	381,94
	GR	437,32	393,75	388,17	425,69	406,34	414,63	413,27	414,81	364,92
	AGR	437,32	405,94	379,70	412,06	402,03	403,60	409,40	397,82	407,16
18	AR	280,57	274,80	254,39	240,81	250,43	249,44	253,74	250,36	259,63
	GR	252,82	230,41	253,72	240,05	245,01	229,01	228,57	217,44	237,32
	AGR	252,82	238,09	232,81	220,17	219,94	207,61	230,51	221,54	222,59
19	AR	208,79	186,76	198,58	168,03	175,49	181,07	177,64	173,77	178,30
	GR	198,84	192,20	187,70	189,90	176,99	182,64	171,55	177,81	169,55
	AGR	198,84	187,08	179,57	187,04	175,61	165,10	176,63	176,25	176,87
20	AR	447,65	424,05	408,50	424,91	429,65	411,65	430,87	439,53	432,63
	GR	417,93	367,18	379,78	369,31	391,66	400,23	399,10	374,39	385,01
	AGR	417,93	395,20	398,87	368,51	370,62	390,67	386,95	394,06	445,54

Figur A.1: Aldosteronkonsentrasjon i alle alikvotene for alle deltakerene.

		Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)								
Prøve nr		Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
1	AR	100,00	85,82	81,82	81,66	84,03	84,78	85,10	83,28	83,28
1	GR	100,00	124,13	116,91	110,89	107,92	103,15	98,18	105,01	103,06
1	AGR	100,00	94,00	92,87	95,65	98,47	97,45	101,15	109,21	108,32
2	AR	100,00	96,11	95,98	95,16	95,42	96,51	96,76	93,02	87,97
2	GR	100,00	103,30	105,98	98,04	100,94	101,42	98,36	94,32	95,55
2	AGR	100,00	99,74	99,34	97,62	97,70	94,63	96,55	99,57	95,93
3	AR	100,00	93,97	97,08	100,07	89,10	92,83	84,97	86,45	83,79
3	GR	100,00	134,59	114,82	116,53	113,02	107,83	119,84	110,98	109,62
3	AGR	100,00	105,33	95,34	114,92	110,01	114,35	109,39	119,98	107,00
4	AR	100,00	97,81	101,34	103,85	89,61	96,19	86,43	89,92	91,60
4	GR	100,00	87,58	77,39	85,04	81,09	79,18	82,03	78,05	77,67
4	AGR	100,00	93,99	90,61	80,83	86,49	83,58	81,51	83,93	78,87
5	AR	100,00	98,54	91,84	94,77	103,39	100,82	98,01	99,48	98,39
5	GR	100,00	95,77	109,22	106,49	100,72	96,27	98,29	103,01	98,05
5	AGR	100,00	100,12	95,44	93,75	92,71	102,05	102,14	101,50	92,95
6	AR	100,00	95,12	98,69	94,35	98,37	92,47	100,47	90,82	98,15
6	GR	100,00	99,37	95,45	92,28	90,44	97,13	90,81	89,28	101,76
6	AGR	100,00	98,08	94,74	96,96	97,86	97,64	94,54	92,74	97,02
7	AR	100,00	96,97	91,82	97,15	88,97	84,69	89,52	94,29	109,74
7	GR	100,00	93,07	84,58	81,12	80,15	81,73	78,63	85,04	80,78
7	AGR	100,00	89,15	93,65	90,46	77,13	79,06	84,04	81,60	91,66
8	AR	100,00	103,22	102,69	102,51	102,75	101,99	95,93	94,70	97,42
8	GR	100,00	103,07	110,80	106,30	104,66	104,74	99,44	105,77	92,94
8	AGR	100,00	107,68	99,15	104,38	111,12	115,02	101,40	110,09	96,73
9	AR	100,00	99,07	101,27	111,13	95,84	100,14	102,06	100,16	113,59
9	GR	100,00	100,03	135,59	101,11	97,89	94,49	97,88	98,12	104,95
9	AGR	100,00	110,98	102,23	101,29	101,34	98,98	87,50	105,04	103,49
10	AR	100,00	94,46	89,77	93,95	90,38	99,77	91,46	93,32	86,66
10	GR	100,00	97,53	83,97	86,83	79,11	78,47	82,24	78,02	79,91
10	AGR	100,00	96,88	97,99	98,69	91,62	95,19	97,73	95,64	84,11
11	AR	100,00	94,07	92,15	92,88	92,24	87,95	85,88	86,01	83,25
11	GR	100,00	94,05	92,16	87,17	94,10	94,40	83,49	88,93	92,90
11	AGR	100,00	104,26	97,20	90,33	94,04	96,66	98,99	86,76	90,06
12	AR	100,00	94,45	97,73	91,31	83,80	87,39	86,97	86,80	89,66
12	GR	100,00	92,76	90,95	86,90	93,62	86,34	77,18	90,65	91,25
12	AGR	100,00	93,41	89,30	88,72	89,65	88,16	91,20	88,63	90,97
13	AR	100,00	96,74	92,21	93,32	91,93	92,30	95,85	93,56	80,03
13	GR	100,00	91,45	85,43	82,11	86,55	91,04	84,72	81,66	84,08
13	AGR	100,00	91,54	88,38	81,80	89,83	79,54	68,37	84,15	67,59
14	AR	100,00	99,96	101,17	96,72	96,79	108,21	105,69	106,69	91,69
14	GR	100,00	96,47	97,80	88,19	93,37	93,48	89,93	103,19	102,14
14	AGR	100,00	97,39	95,40	97,25	95,54	99,23	96,40	98,69	98,51
15	AR	100,00	92,61	91,94	95,39	98,87	92,80	94,15	79,97	97,89
15	GR	100,00	101,95	96,80	92,65	100,16	88,14	95,24	94,90	87,82
15	AGR	100,00	94,70	92,82	89,74	90,37	96,64	91,08	97,07	96,32
16	AR	100,00	97,54	91,23	89,67	87,02	86,61	85,94	85,33	85,72
16	GR	100,00	88,57	89,27	89,75	87,34	82,83	81,61	85,94	83,18
16	AGR	100,00	92,78	90,52	87,84	87,47	83,56	84,74	79,59	79,87
17	AR	100,00	88,50	97,01	91,18	98,40	99,14	97,56	89,50	84,57
17	GR	100,00	90,04	88,76	97,34	92,92	94,81	94,50	94,85	83,44
17	AGR	100,00	92,82	86,82	94,22	91,93	92,29	93,62	90,97	93,10
18	AR	100,00	97,94	90,67	85,83	89,26	88,90	90,44	89,23	92,54
18	GR	100,00	91,14	100,36	94,95	96,91	90,59	90,41	86,01	93,87
18	AGR	100,00	94,17	92,09	87,09	87,00	82,12	91,17	87,63	88,04
19	AR	100,00	89,45	95,11	80,48	84,05	86,72	85,08	83,23	85,39
19	GR	100,00	96,66	94,40	95,50	89,01	91,85	86,27	89,42	85,27
19	AGR	100,00	94,09	90,31	94,06	88,32	83,03	88,83	88,64	88,95
20	AR	100,00	94,73	91,25	94,92	95,98	91,96	96,25	98,19	96,65
20	GR	100,00	87,86	90,87	88,37	93,71	95,77	95,49	89,58	92,12
20	AGR	100,00	89,45	95,11	80,48	84,05	86,72	85,08	83,23	85,39

Figur A.2: Første prøven (nullprøven) er satt til 100%, de følgende prøvene er representert i prosent av nullprøven

B Standarder

Innkjøpt stamløsning av aldosteron

- Molekylformel: $C_{21}H_{28}O_5$
- Det som kjøpes inn er 277,4 uM
- Molekylvekt: 360,44 g/mol
- Leverandør: Sigma-Aldrich Norway AS
- LOT/fremstilt dato: 060919
- Kommer som 100 ug/mL ampuller = 277,4 uM
- Aldosteron stamløsning 1
  - 27,74 uM. Er fortynnet med metanol
- Aldosteron stamløsning 2 lages fra stamløsning 1
  - Konsentrasjon: 50,0 uM.
  - Er fortynnet med metanol.
  - Denne brukes som stamløsning i analysen

Standardrekken

Tabell B.1: Standardrekken som brukes til analysering av aldosteron på UHPLC-MS/MS

	Volum Aldosteron Stamløsning 2 (50,0 nM) fortynnes til 100 ml
Standard 0,0 pM	30% metanol
Standard 5,0 pM	10 uL
Standard 10,0 pM	20 uL
Standard 50,0 pM	100 uL
Standard 100,0 pM	200 uL
Standard 500,0 pM	1000 uL
Standard 1000,0 pM	2,0 mL
Standard 2500,0 pM	5,0 mL
Standard 5000,0 pM	10,0 mL

C Kontroller

Tabell C.1: Kontroll A som er brukt i analysen av aldosteron på UHPLC-MS/MS

Kontroll navn:	**Pool kontroll A**
Materiale:	Serumpool samlet ved avdelingen
Dato/lot:	140107 A2
Langtidsoppbevaring:	-80 °C
Korttidsoppbevaring:	-20 °C
Holdbarhet	Minst 5 år

Tabell C.2: Kontroll E som er brukt i analysen av aldosteron på UHPLC-MS/MS

Kontroll navn:	**Pool kontroll E**
Materiale:	Serumpool samlet ved avdelingen
Dato/lot:	170316-E2
Langtidsoppbevaring:	-80 °C
Korttidsoppbevaring:	-20 °C
Holdbarhet	Minst 4 år

Tabell C.3: Kontroll F som er brukt i analysen av aldosteron på UHPLC-MS/MS

Kontroll navn:	**Pool kontroll F**
Materiale:	Serumpool samlet ved avdelingen
Dato/lot:	200226 F2
Langtidsoppbevaring:	-80 °C
Korttidsoppbevaring:	-20 °C
Holdbarhet	Minst 4 år

D Statistiske parametere for de ulike oppbevaringsmetodene

Tabell D.1: Antall timer henstand for prøvene i romtemperatur ved de ulike analysetidspunkt

Tid nr.	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
Oppbevart i RT (t)	0	12	24	36	48	60	72	84	96

Holdbarhet av aldosteron i romtemperatur

AR

Tillatt bias 13 %, og tillatt totalfeil 42 %

Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)

Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
1	100,00	85,82	81,82	81,66	84,03	84,78	85,10	83,28	83,28
2	100,00	96,11	95,98	95,16	95,42	96,51	96,76	93,02	87,97
3	100,00	93,97	97,08	100,07	89,10	92,83	84,97	86,45	83,79
4	100,00	97,81	101,34	103,85	89,61	96,19	86,43	89,92	91,60
5	100,00	98,54	91,84	94,77	103,39	100,82	98,01	99,48	98,39
6	100,00	95,12	98,69	94,35	98,37	92,47	100,47	90,82	98,15
7	100,00	96,97	91,82	97,15	88,97	84,69	89,52	94,29	109,74
8	100,00	103,22	102,69	102,51	102,75	101,99	95,93	94,70	97,42
9	100,00	99,07	101,27	111,13	95,84	100,14	102,06	100,16	113,59
10	100,00	94,46	89,77	93,95	90,38	99,77	91,46	93,32	86,66
11	100,00	94,07	92,15	92,88	92,24	87,95	85,88	86,01	83,25
12	100,00	94,45	97,73	91,31	83,80	87,39	86,97	86,80	89,66
13	100,00	96,74	92,21	93,32	91,93	92,30	95,85	93,56	80,03
14	100,00	99,96	101,17	96,72	96,79	108,21	105,69	106,69	91,69
15	100,00	92,61	91,94	95,39	98,87	92,80	94,15	79,97	97,89
16	100,00	97,54	91,23	89,67	87,02	86,61	85,94	85,33	85,72
17	100,00	88,50	97,01	91,18	98,40	99,14	97,56	89,50	84,57
18	100,00	97,94	90,67	85,83	89,26	88,90	90,44	89,23	92,54
19	100,00	89,45	95,11	80,48	84,05	86,72	85,08	83,23	85,39
20	100,00	94,73	91,25	94,92	95,98	91,96	96,25	98,19	96,65
Mean	100,00	95,35	94,64	94,31	92,81	93,61	92,73	91,20	91,90
SD	0,00	4,07	5,12	7,10	5,98	6,55	6,40	6,64	8,88
SEM	0,00	0,91	1,14	1,59	1,34	1,46	1,43	1,48	1,98
t	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73
t x SEM	0,00	1,58	1,98	2,74	2,31	2,53	2,47	2,57	3,43
Øvre 90 % KI	100,0	96,9	96,6	97,1	95,1	96,1	95,2	93,8	95,3
Nedre 90 % KI	100,0	93,8	92,7	91,6	90,5	91,1	90,3	88,6	88,5

Figur D.1: Prosent av nullverdi for hver prøve ved de ulike måletidspunktene, i serum avpipettert fra rør uten gel (AR). Nederst kan man se statistiske parametere som gjelder for hver tid ved bruk av denne metoden.

Holdbarhet av aldosteron i romtemperatur

GR

Tillatt bias 13 %, og tillatt totalfeil 42 %

Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)

Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
1	100,00	124,13	116,91	110,89	107,92	103,15	98,18	105,01	103,06
2	100,00	103,30	105,98	98,04	100,94	101,42	98,36	94,32	95,55
3	100,00	134,59	114,82	116,53	113,02	107,83	119,84	110,98	109,62
4	100,00	87,58	77,39	85,04	81,09	79,18	82,03	78,05	77,67
5	100,00	95,77	109,22	106,49	100,72	96,27	98,29	103,01	98,05
6	100,00	99,37	95,45	92,28	90,44	97,13	90,81	89,28	101,76
7	100,00	93,07	84,58	81,12	80,15	81,73	78,63	85,04	80,78
8	100,00	103,07	110,80	106,30	104,66	104,74	99,44	105,77	92,94
9	100,00	100,03	135,59	101,11	97,89	94,49	97,88	98,12	104,95
10	100,00	97,53	83,97	86,83	79,11	78,47	82,24	78,02	79,91
11	100,00	94,05	92,16	87,17	94,10	94,40	83,49	88,93	92,90
12	100,00	92,76	90,95	86,90	93,62	86,34	77,18	90,65	91,25
13	100,00	91,45	85,43	82,11	86,55	91,04	84,72	81,66	84,08
14	100,00	96,47	97,80	88,19	93,37	93,48	89,93	103,19	102,14
15	100,00	101,95	96,80	92,65	100,16	88,14	95,24	94,90	87,82
16	100,00	88,57	89,27	89,75	87,34	82,83	81,61	85,94	83,18
17	100,00	90,04	88,76	97,34	92,92	94,81	94,50	94,85	83,44
18	100,00	91,14	100,36	94,95	96,91	90,59	90,41	86,01	93,87
19	100,00	96,66	94,40	95,50	89,01	91,85	86,27	89,42	85,27
20	100,00	87,86	90,87	88,37	93,71	95,77	95,49	89,58	92,12
Mean	100,00	98,47	98,08	94,38	94,18	92,68	91,23	92,64	92,02
SD	0,00	11,75	13,93	9,74	9,01	8,22	9,91	9,36	9,20
SEM	0,00	2,63	3,12	2,18	2,01	1,84	2,22	2,09	2,06
t	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73
t x SEM	0,00	4,54	5,39	3,77	3,48	3,18	3,83	3,62	3,56
Øvre 90 % KI	100,0	103,0	103,5	98,1	97,7	95,9	95,1	96,3	95,6
Nedre 90 % KI	100,0	93,9	92,7	90,6	90,7	89,5	87,4	89,0	88,5

Figur D.2: Prosent av nullverdi for hver prøve ved de ulike måletidspunktene, i serum oppbevart på gel (GR). Nederst kan man se statistiske parametere som gjelder for hver tid ved bruk av denne metoden.

Holdbarhet av aldosteron i romtemperatur

AGR

Tillatt bias 13 %, og tillatt totalfeil 42 %

Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)

Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
1	100,00	94,00	92,87	95,65	98,47	97,45	101,15	109,21	108,32
2	100,00	99,74	99,34	97,62	97,70	94,63	96,55	99,57	95,93
3	100,00	105,33	95,34	114,92	110,01	114,35	109,39	119,98	107,00
4	100,00	93,99	90,61	80,83	86,49	83,58	81,51	83,93	78,87
5	100,00	100,12	95,44	93,75	92,71	102,05	102,14	101,50	92,95
6	100,00	98,08	94,74	96,96	97,86	97,64	94,54	92,74	97,02
7	100,00	89,15	93,65	90,46	77,13	79,06	84,04	81,60	91,66
8	100,00	107,68	99,15	104,38	111,12	115,02	101,40	110,09	96,73
9	100,00	110,98	102,23	101,29	101,34	98,98	87,50	105,04	103,49
10	100,00	96,88	97,99	98,69	91,62	95,19	97,73	95,64	84,11
11	100,00	104,26	97,20	90,33	94,04	96,66	98,99	86,76	90,06
12	100,00	93,41	89,30	88,72	89,65	88,16	91,20	88,63	90,97
13	100,00	91,54	88,38	81,80	89,83	79,54	68,37	84,15	67,59
14	100,00	97,39	95,40	97,25	95,54	99,23	96,40	98,69	98,51
15	100,00	94,70	92,82	89,74	90,37	96,64	91,08	97,07	96,32
16	100,00	92,78	90,52	87,84	87,47	83,56	84,74	79,59	79,87
17	100,00	92,82	86,82	94,22	91,93	92,29	93,62	90,97	93,10
18	100,00	94,17	92,09	87,09	87,00	82,12	91,17	87,63	88,04
19	100,00	94,09	90,31	94,06	88,32	83,03	88,83	88,64	88,95
20	100,00	94,56	95,44	88,17	88,68	93,48	92,59	94,29	106,61
Mean	100,00	97,28	93,98	93,69	93,36	93,63	92,65	94,79	92,81
SD	0,00	5,78	4,02	7,84	7,95	10,15	8,94	10,56	10,15
SEM	0,00	1,29	0,90	1,75	1,78	2,27	2,00	2,36	2,27
t	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73
t x SEM	0,00	2,23	1,55	3,03	3,07	3,93	3,45	4,08	3,92
Øvre 90 % KI	100,0	99,5	95,5	96,7	96,4	97,6	96,1	98,9	96,7
Nedre 90 % KI	100,0	95,1	92,4	90,7	90,3	89,7	89,2	90,7	88,9

Figur D.3: Prosent av nullverdi for hver prøve ved de ulike måletidspunktene, i serum avpipettert fra gel (AGR). Nederst kan man se statistiske parametere som gjelder for hver tid ved bruk av denne metoden.

E Protokoll for prøveinnsamling

ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM

Protokoll for innsamling, fordeling, oppbevaring og analyse av prøvemateriale til bruk for holdbarhetsundersøkelse av Aldosteron.

Hensikt

Innsamling av prøvemateriale for å gjenta undersøkelse av holdbarheti) i romtemperatur av serum oppbevart på gelrør og i tillegg undersøke holdbarhet av avpipettert serum. Holdbarhetsundersøkelsen utføres som en bacheloroppgave.

- Tid: Oppbevaring inntil 4 døgn i romtemperatur
- Oppbevaringsbetingelser: (18-25˚ C)
- Fordi tidligere holdbarhetsundersøkelse viser at serum på gelrør ikke er holdbart i 3 døgn ved romtemperatur, blir det laget alikvoter på 12 timers intervall. Prøver sendes rutinemessig med post over natt fra distriktet, på gel og ikke frosset, og mottas på lab neste morgen. Unntaksvis kan det gå 4 døgn før prøver ankommer lab (torsdag-mandag).

Utstyr

Vacuette serum gelrør, 5 mL. 13x100 mm (Antall: 5 x 20)
Vacuette serumrør uten gel, 6 mL. 13x100 mm (Antall: 3 x 20)
Rør til å fordele og fryse ned prøvematerialet, eppendorf rør, Sarstedt 1,5 mL eller lignende som tåler nedfrysning i -80 ºC frys.
Esker for nedfrysing av fryserør med inndeling med plass for ca 10 x 10 rør.

Merking av fryserør:

	Tidspunkt - timer	Avpipettert serum	Serum på gelrør	Serum avpipettert fra gelrør
Person 1	0	1-AR0		1-AGR0
	12	1-AR12	1-GR12	1-AGR12
	24 – 1 døgn	1-AR24	1-GR24	1-AGR24
	36	1-AR36	1-GR36	1-AGR36
	48 – 2 døgn	1-AR48	1-GR48	1-AGR48
	60	1-AR60	1-GR60	1-AGR60
	72 – 3 døgn	1-AR72	1-GR72	1-AGR72
	84	1-AR84	1-GR84	1-AGR84
	96 – 4 døgn	1-AR96	1-GR96	1-AGR96
		9 alikv	8 alikv	9 alikv
Person 2	0	2-R0		
	12	2-AR12	2-GR12	
	24	2-AR24	2-GR24	
Osv.				

Dette blir totalt 26 alikvoter pr person.

Det fordeles 0,6 mL i hvert rør, 26 alikvoter x 0,6mL = 15,6 mL (dvs 8 glass)

Det tas 3 rør uten gel + 5 gelrør pr person for å være sikker på å få nok til alle alikvotene.

Innsamling av prøvemateriale

Prøvemateriale fra frivillige ansatte.

- Prøveinnsamling: 22.02.21 + 01.03.21
- Antall personer: 10 + 10
- Antall rør fra hver person: 8 (3 rør uten gel + 5 rør med gel)
- Alikvoteres over 96 timer i 12 timers intervaller

Prøvefordeling

Rørene sentrifugeres etter 30-90 minutters henstand etter prøvetaking,
10 min/ 2200 G 20˚ C.

Fordeling av prøver i 12-timers intervall:

Tid 0	**1**. 0,6 mL serum fra rør med og uten gel fordeles i hvert sitt eppendorfrør merket 1-AR0/1-ARG0 umiddelbart etter sentrifugering. Fryses straks ved -80˚C. Benytt ferdigmerkede «arkivesker» for eppendorfrør. **2**. 0,6 mL serum fra rør uten gel avpipetteres direkte i eppendorfrør merket AR12-96 for videre henstand i romtemp. **3**. 0,6 mL serum fra **halvparten** av gelrørene pipetteres direkte over i eppendorfrør merket AGR12-96 for videre henstand i romtemp.
Tid 12 timer	**1**. Serum fra gelrør som ikke er fordelt, fordeles i 1 eppendorfrør á 0,6 mL merket GR12. Eppendorfrøret er merket med svart ring på lokket. Fordelingen utføres kl. 9:30 og kl. 21:30 **2**. Dette røret, samt tidligere avpipettert serum og avpipettert serum fra gelrør, fryses umiddelbart ved -80˚C. Dvs rør merket AR12, GR12 og AGR 12
Tid 24 timer osv	Som 12-timer osv.

Oppbevaring av eppendorfrør i -80˚C-fryser

- Eskene står i hylle 1, nederst til venstre i fryseren
- De er merket med analyse, holdbarhetsundersøkelse.
- 2 personer pr eske – dvs 10 esker totalt
- Alle alikvotene fra hver person settes etter hverandre i eske.

Analysering

Alle alikvoter fra samme person skal analyseres i samme batch.

Ansvar og tidsplan

Februar: Avtale med frivillige testpersoner
Februar/Mars: Ta alle prøvene
Mars/April: Analysere alle alikvotene.
Mai: Innlevering av bacheloroppgave (frist 20.05.21)

Ansvar: Runa Rosmæl (veileder) og Trine Hansen (fagansvarlig bioingeniør).

11.02.21 Trine Hansen

22.02.21 Runa Rosmæl

F Tidligere holdbarhetsundersøkelse av aldosteron

ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM

Holdbarhet av prøvematerialet – rapport

Analyse: Aldosteron på LC-MSMS

Prøvemateriale:
Del 1A: serum – oppbevart på gel i romtemperatur (18 - 25°C)
Del 1B: serum – oppbevart på gel i kjøleskap (2 - 8°C)
Del 1C: serum – tatt på gelglass, avpipettert og oppbevart i frys (- 20°C)

Holdbarhetskrav

$CV_{innen\ person}$, %:	29,4	(1)	$CV_{mellom\ person}$, %:	40,1	(1)
Tillatt bias, %:	12,4	(1)			
Tillatt totalfeil, %:	36,7	(1)			

Kommentar: Holdbarhet er basert på data for normal biologisk variasjon.
https://www.westgard.com/biodatabase1.htm. Data for tillatt bias er minimumskrav.

Design

Se protokoll «2017_Protokoll_innsamling av prøvemateriale til Aldosteron + evt TestoAndro17OHprog» finnes på:
I:\STOLAV - Laboratoriemedisin\Medisinsk biokjemi\Spesiell biokjemi\Arkiv Spesiell biokjemi\Analyser\Aldosteron i serum\Holdbarhet

Antall prøver

20

Resultater

Tillatt bias, 12,4 %:
Romtemperatur

Oppbevaringstid (dager)	Prosent endring (økende/reduksjon)	
	Gjennomsnitt	90%-konfidensintervall
3	88,81	86,9 – 90,7
7	82,40	79,8 – 85,0
10	75,97	73,3 – 78,6
14	69,08	65,6 – 72,6

Kjøleskap

Oppbevaringstid (dager)	Prosent endring (økende/reduksjon)	
	Gjennomsnitt	90%-konfidensintervall
3	98,21	95,25 – 101,2
7	99,23	96,4 – 102,1
10	99,28	95,7 – 102,9
14	98,78	95,4 – 102,2
17	98,06	95,7 – 100,5
21	96,92	94,4 – 99,5

Frys (- 20°C)

Oppbevaringstid (dager)	Prosent endring (økende/reduksjon)	
	Gjennomsnitt	90%-konfidensintervall
30	98,45	95,6 – 101,4
60	98,87	97,0 – 100,8
90	98,81	96,4 – 101,2

Vurdering:
Prøver analysert i konsentrasjonsområdet 51 – 943 pmol/L.

Vedlegg til dokument 9756 "Holdbarhet av prøvematerialet. AMB" Ver. 1.7 – EQS Side 1 av 2

Romtemperatur:
Gjennomsnittsverdien av prosentendring for 3 dagers oppbevaring i romtemperatur er akkurat innenfor tillatt bias, men 90 % konfidensintervall er utenfor tillatt bias.
Alle andre gjennomsnittsverdier er utenfor tillatt bias.
Kjøleskap og Frys (-20°C):
Alle gjennomsnittsverdier av prosentendring med 90 % konfidensintervall er innenfor tillatt bias. Vi kan imidlertid se en synkende tendens ved oppbevaring i kjøleskap etter 10-14 dager.

Dette holdbarhetskriteriet er oppfylt for oppbevaring i kjøleskap og fryser. Men ikke for oppbevaring i romtemperatur.

Tillatt totalfeil, 36,7%:
Vurdering:
Romtemperatur:
Alle enkeltverdier for 3 dagers oppbevaring i romtemperatur er innenfor tillatt totalfeil.

Kjøleskap og Frys (-20°C):
Alle enkeltverdier er innenfor tillatt totalfeil.

Dette holdbarhetskriteriet er oppfylt for oppbevaring i kjøleskap og fryser. Men ikke for oppbevaring i romtemperatur etter 3 dager.

Konklusjon

Aldosteron i serum (på gel) er holdbart i 21 dager ved oppbevaring i kjøleskap og i 90 dager (avpipettert fra gel) ved oppbevaring i frys ved - 20°C

Aldosteron er ikke holdbart i serum på gel i romtemperatur i 3 dager.

3 dager ble valgt som minstetid, da det ble antatt at aldosteron skulle være holdbar under alle forhold i denne perioden. Denne vurderingen ble gjort ut i fra at prøver rutinemessig sendes i post, også på gel og ikke frosset.

Forsøket bør utvides til å omfatte:

- Del 2A: serum – oppbevart på gel i romtemperatur (18 - 25°C) fra dag 0 til dag 3, muligens delt i 12 timers intervaller.
- Del 2B: serum – tatt på gelglass, avpipettert innen rimelig tid og oppbevart i romtemperatur (18 - 25°C) minst fra dag 0 til dag 3, helst til dag 7.
- Del 2C: serum – tatt på glass uten gel, avpipettert innen rimelig tid og oppbevart i romtemperatur (18 - 25°C) minst fra dag 0 til dag 3, helst dag 7.

Arbeidet utført av: analysert ved analyseseksjonen og validert av Margrete Lie

Dato: 4/4-18

Rita Spets
Seksjonsleder (Rita Spets)

Fagansvarlig lege (Lena Løfblad)

Kristine B. Solem
Valideringsansvarlig (Kristine Solem)

Referanse:
1. https://www.westgard.com/biodatabase1.htm (20.12.17)

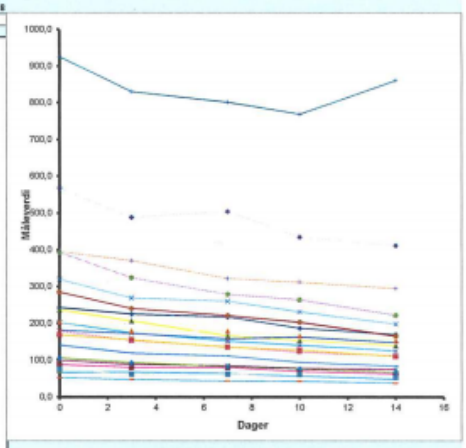
Vedlegg til dokument 9756 "Holdbarhet av prøvematerialet. AMB" Ver. 1.7 – EQS Side 2 av 2

ST. OLAVS HOSPITAL

Holdbarhet av Aldosteron i serum - romtemperatur(på gel)

Tillatt bias 12,4 %, og tillatt totalfeil 36,7 %

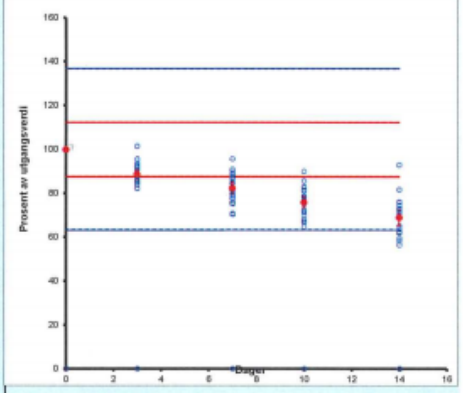
	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
Timer	0	3	7	10	14				
Prøve nr	Måle verdier								
1	242,50	225,00	217,00	187,00	170,00				
2	88,00	80,00	80,00	69,00	63,00				
3	236,00	206,00	166,00	153,00	140,00				
4	202,00	174,00	152,00	141,00	125,00				
5	99,35	88,70	84,40	76,70	75,60				
6	285,00	240,00	221,00	205,00	166,00				
7	925,00	890,00	801,00	768,00	860,00				
8	181,00	179,00	158,00	163,00	148,00				
9	66,40	67,40	63,60	56,90	48,60				
10	568,00	488,00	504,00	435,00	412,00				
11	75,20	61,80	62,20	61,00	58,60				
12	203,50	180,00	179,00	166,00	155,00				
13	315,50	269,00	260,00	231,00	198,00				
14	179,50	159,00	136,00	122,00	112,00				
15	393,50	324,00	279,00	264,00	222,00				
16	395,50	371,00	322,00	312,00	295,00				
17	141,00	115,00	111,00	94,10	83,70				
18	52,00	48,00	44,00	43,00	38,00				
19	105,50	93,00	82,00	76,00	67,00				
20	169,00	155,00	135,00	127,00	110,00				
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									
49									
50									



Figur 1. Hver linje representerer måleverdiene for en enkelt prøve.

Prosent (blå tall er større enn tillatt totalfeil)

Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3	Tid 4	Tid 5	Tid 6	Tid 7	Tid 8
1	100,00	92,78	89,48	77,11	70,10				
2	100,00	90,91	90,91	78,41	71,59				
3	100,00	87,29	70,34	64,83	**59,32**				
4	100,00	86,14	75,25	69,80	**61,88**				
5	100,00	89,28	84,95	77,20	76,09				
6	100,00	84,21	77,54	71,23	**58,25**				
7	100,00	96,73	86,59	83,03	92,97				
8	100,00	95,58	87,29	90,06	81,77				
9	100,00	101,51	95,78	85,69	73,19				
10	100,00	85,92	88,73	76,59	72,54				
11	100,00	82,18	82,71	81,12	71,28				
12	100,00	88,45	87,96	81,57	76,17				
13	100,00	84,19	81,38	72,30	**61,97**				
14	100,00	88,24	75,77	67,97	**62,48**				
15	100,00	82,34	70,90	67,09	**56,43**				
16	100,00	93,81	81,42	78,89	74,59				
17	100,00	84,40	78,72	66,74	**59,34**				
18	100,00	92,31	84,62	82,69	73,08				
19	100,00	88,15	77,73	72,04	63,51				
20	100,00	91,72	79,88	75,15	65,09				
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									
49									
50									
Mean	100,00	88,81	82,40	75,97	69,08				
n	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SD	0,00	4,88	6,75	6,90	9,12				
SEM	0,00	1,09	1,51	1,54	2,04				
t	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73				
t x SEM	0,00	1,89	2,61	2,67	3,53				
Minimum	100,00	82,18	70,34	64,83	58,42				
Maksimum	100,00	101,51	95,78	90,06	92,97				
Bias nedre gr	87,60	87,60	87,60	87,60	87,60	87,60	87,60	87,60	87,60
Bias øvre gr	112,40	112,40	112,40	112,40	112,40	112,40	112,40	112,40	112,40
TEA nedre gr	63,30	63,30	63,30	63,30	63,30	63,30	63,30	63,30	63,30
TEA øvre gr	136,70	136,70	136,70	136,70	136,70	136,70	136,70	136,70	136,70



Figur 2. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil.

Vedlegg til dokument 9756 "Holdbarhet av prøvematerialet. AMB" Ver. 1.7 - EQS

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM