



UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN
LABORATORIUM VOOR ANALYTISCHE CHEMIE

**ISOTOOPDILUTIE-VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE-
MASSASPECTROMETRIE REFERENTIEMEETPROCEDURES
VOOR DE BEPALING VAN THYROÏD- EN PEPTIDENHORMONEN
IN SERUM EN URINE**

door

Apoth. COLETTE FIERENS

Proefschrift voorgelegd tot het verkrijgen van de
graad van Doctor in de Farmaceutische Wetenschappen

Promotor: PROF. DR. L.M. THIENPONT

Copromotor: PROF. DR. A.P. DE LEENHEER

2003

VOORWOORD

Bij het beëindigen van deze thesis zou ik graag iedereen bedanken die mij gesteund heeft tijdens de realisatie van mijn doctoraatswerk. Allereerst ben ik dank verschuldigd aan mijn promotor Prof. Dr. L. Thienpont en copromotor Prof. Dr. AP. De Leenheer, die me de mogelijkheid gaven te doctoreren in hun massaspectrometrisch laboratorium. Daar werd ik onmiddellijk ondergedompeld in een ruime kennis van de kwantitatieve massaspectrometrie en kreeg ik de kans mij te ontplooiën. Daarbij wil ik zeker niet vergeten Dr. D. Stöckl te bedanken. De praktische realisatie van dit werk zou immers onmogelijk geweest zijn zonder zijn intensieve begeleiding. We konden uren wetenschappelijke gesprekken voeren en steeds stond hij klaar met allerhande praktische en statistische hulp.

In het algemeen wil ik ook alle collega's en ex-collega's van deze dienst bedanken voor hun hulp, elk op hun eigen manier, en vooral voor de mooie momenten die we samen beleefd hebben.

Verder wil ik ook Dhr. Klinisch-Bioloog D. Baetens (AZ Middelheim) bedanken voor zijn uitvoerige medewerking bij de evaluatie van de routinemeetsystemen voor de bepaling van C-peptide in urine, alsook Dhr. S. Marivoet (Eurogenetics), Dhr. Ch. Depierreux (Biosource), Dhr. R. Vermeulen (DPC) en Dhr. G. Pazzaglia (Diasorin). Aan Ir. AL. Hantson en Ir. N. Guerit (Université de Mons, Hainaut) ben ik dank verschuldigd voor hun hulp bij het maken van de franse samenvatting, en Col. Cardozo, LtCol. Walther en Mrs. Lowe (NATO HQ) voor het kritisch herlezen van de engelse of franse samenvatting.

Ten slotte mag ik zeker niet vergeten mijn familie te bedanken voor de vele onuitputtelijke steun die ze mij gedurende die 4 jaar gegeven hebben, alsook mijn vrienden voor het vele geduld die ze hadden, en vooral mijn echtgenoot Alex, voor zijn nooit eindigende interesse in mijn werk en vooral zijn humor waarmee hij me kon blijven aanmoedigen.

Colette Fierens
Gent, Januari, 2003.

OVERZICHT VAN VEEL GEBRUIKTE AFKORTINGEN

BSA	Runderserumalbumine (“Bovine serum albumin”)
CAD	Collisie geactiveerde dissociatie (“Collision activated dissociation”)
CAD-l	Collisie geactiveerde dissociatie met lage collisie-energie
CAD-h	Collisie geactiveerde dissociatie met hoge collisie-energie
CI	Betrouwbaarheidsinterval (“Confidence interval”)
CTA	Celluloseetriacetaat
DTT	Dithiotreitol
ED	Evenwichtsodialyse
EI	Electron impact
ELISA	“Enzyme linked immuno sorbent assay”
ESI	Electrospray ionisatie
FT4	Vrij thyroxine
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N’-2-ethaansulfonzuur
HFBA	Heptafluoroboterzuur
HPLC	Hoge druk vloeistofchromatografie (“High performance liquid chromatography”)
i.d.	Interne diameter
IDDM	Insuline afhankelijke diabetes mellitus (“Insulin dependent diabetes mellitus”)
ID-GC-MS	Isotoopdilutie-gaschromatografie/massaspectrometrie
ID-LC-MS/MS	Isotoopdilutie-vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrie
i-prNH ₂	Isopropylamine
IS	Interne standaard
IQC	Interne kwaliteitscontrole (“Internal quality control”)
MALDI	“Matrix assisted laser desorption ionisation”
MRM	“Multiple reaction monitoring”
MS	Massaspectrometrie
Mr	Relatieve molecuulmassa
<i>m/z</i>	Massa/lading
NIDDM	Niet-insuline afhankelijke diabetes mellitus (“Non-insulin dependent diabetes mellitus”)
PC	“Proinsuline convertend enzyme”

PES	Polyethersulfon
PTH	Parathyroïd hormoon
PTV	“Programmable temperature vaporizing”
RC	Geregenereerde cellulose
RIA	Radio-immunotestsysteem (“Radio immunoassay”)
RPC	“Reversed phase” chromatografie
rT3	Reverse trijodothyronine
SD	Standaarddeviatie
SI-eenheden	Système International d’Unités
SIM	“Single ion monitoring”
S/N	Signaal-tot-ruis-verhouding
SPE	Vaste faseëxtractie (“Solid phase extraction”)
ST	Standaard
T2	Dijodothyronine
T3	Trijodothyronine
T4	Thyroxine
TBG	Thyroxinebindend globuline
TEA	Triethylamine
TFA	Trifluoroazijnzuur
TMA-OH	Tetramethylammoniumhydroxide
TMCS	Trimethylchlorosilaan
TRH	Thyrotropine vrijstellend hormoon
TSH	Thyroïd stimulerend hormoon
TT3	Totaal trijodothyronine
TT4	Totaal thyroxine
TTR	Transthyretine
UF	Ultrafiltratie
VC	Variatiecoëfficiënt (“Coefficient of variation”)
wESI	“Wrong-way-round” electrospray ionisatie
WWR	“Wrong-way-round”

DEFINITIONS

Bij de beschrijving van de validatie van de meetprocedures werden de definities van de begrippen “trueness” en “commutability” overgenomen uit CEN prEN ISO 17511 (i):

Trueness of a measurement:

The closeness of agreement between the average value, obtained from a large series of results, and a true value.

Commutability of a material:

Degree to which a material yields the same numerical relationships between results of measurements by a given set of measurement procedures, purporting to measure the same measurable quantity, as those between the expectations of the relationships for the same procedures applied to those other types of material for which the procedures are intended.

De definities van de begrippen “accuracy” en “traceability” werden overgenomen uit de “Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Généraux de Métrologie” (ii):

Accuracy of a measurement:

The closeness of agreement between the result of a measurement and a true value of the measurand.

Traceability:

Property of the result of a measurement or the value of a standard whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties.

Voor de term “precision” werd de definitie overgenomen uit ISO - Statistics—Vocabulary and symbols (iii):

Precision of a measurement:

The closeness of agreement between independent results of measurements obtained under stipulated conditions.

Deze termen werden in het Nederlands vertaald volgens (iv):

Accuracy:	Nauwkeurigheid
Trueness:	Juistheid
Precision:	Precisie

Door het Belgisch Instituut voor Normalisatie (BIN) werd de term “traceability” in het Nederlands door herleidbaarheid vertaald (v).

Voor zover wij weten kreeg het begrip “commutability” nog geen officiële Nederlandstalige vertaling.

- (i) International Organization for Standardization (ISO), European Commission for Standardisation (CEN). CEN prEN ISO 17511 (draft Dec 2000) IVD medical devices – Measurement of quantities in samples of biological origin – Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials (ISO 17511:2000).
- (ii) BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Généraux de Métrologie (VIM). 2nd ed. Geneva : ISO, 1993.
- (iii) ISO. Statistics – Vocabulary and symbols – Part 1. Probability and general statistical terms. ISO 3534. 1st ed. Geneva, 1993.
- (iv) Maas C, Bravenboer J, van der Putten A, Salm M. Validatie van methoden. De Ware Chemicus 1993;23:90-106.
- (v) Belgisch Instituut voor Normalisatie (BIN). Algemene criteria voor de werking van beproevingslaboratoria (NBN – EN 45001). Brussel: BIN, 1990:7.

INHOUDSTAFEL

Voorwoord.....	i
Afkortingen.....	ii
Definities	iv

HOOFDSTUK I: ACHTERGROND EN OBJECTIEVEN VAN DE ONTWIKKELING VAN LC-MS-REFERENTIEMEETPROCEDURES VOOR DE BEPALING VAN THYROID- EN PEPTIDENHORMONEN

I.1. Achtergrond en rol van referentiemeetprocedures in de klinische chemie	1
I.2. Objectieven van het onderzoek	6
Referenties	9

HOOFDSTUK II: ONTWIKKELING VAN LC-MS-REFERENTIEMEETPROCEDURES VOOR DE BEPALING VAN THYROIDHORMONEN IN SERUM

II.1. Inleiding	14
II.1.1. Fysiologie van de schildklier.....	14
II.2. Trijodothyronine (T3).....	16
II.2.1. Inleiding.....	16
II.2.1.1. De pathofysiologie en diagnostische bepaling van T3	16
II.2.1.2. Bestaande bepalingprocedures voor T3	17
II.2.1.3. Objectieven.....	19
II.2.1.4. Fysicochemische eigenschappen van T3.....	20
II.2.2. Experimenteel gedeelte	21
II.2.2.1. Standaarden, reagentia en sera	21
II.2.2.2. Apparatuur	22
II.2.2.3. Analyseprocedure voor serum T3	24
II.2.2.3.1. Deproteïnisatie en vloeistof-vloeistofextractie.....	25
II.2.2.3.2. HPLC-opzuivering	26
II.2.2.3.3. Derivatisatieprocedure.....	26
II.2.2.4. Bepaling van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure	27
II.2.2.4.1. Specificiteit en meten zonder storing van andere jodothyronines	27

II.2.2.4.2. Detectielimiet	27
II.2.2.4.3. Precisie	27
II.2.2.4.4. Nauwkeurigheid/Juistheid	28
II.2.2.5. Vergelijking van de ID-LC-MS/MS- met de ID-GC-MS- meetprocedure	28
II.2.3. Resultaten en discussie	29
II.2.3.1. Vereisten voor een referentiemeetprocedure	29
II.2.3.1.1. Kalibratie	29
II.2.3.1.2. Isotoopdilutie	29
II.2.3.1.3. Meetprotocol	30
II.2.3.1.4. Interne kwaliteitscontrole	30
II.2.3.2. Bespreking van de meetcondities	31
II.2.3.2.1. MS-condities in de LC-MS-meetprocedure	31
II.2.3.2.2. MS-condities in de GC-MS-meetprocedure	32
II.2.3.3. Bespreking van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure	35
II.2.3.3.1. Specificiteit en meten zonder storing van andere jodothyronines	35
II.2.3.3.2. Detectielimiet	37
II.2.3.3.3. Precisie	37
II.2.3.3.4. Nauwkeurigheid/Juistheid	39
II.2.3.4. Vergelijking van de ID-LC-MS/MS- met de ID-GC-MS-meet- procedure	43
II.2.4. Besluit	46
II.3. Vrij Thyroxine (FT4)	47
II.3.1. Inleiding	47
II.3.1.1. De pathofysiologie en klinische bepaling van FT4	47
II.3.1.2. Bestaande bepalingsprocedures voor FT4	48
II.3.1.3. Vereisten voor een referentiemeetprocedure voor FT4	50
II.3.1.3.1. Scheiding tussen de vrije en proteïnegebonden fractie	50
II.3.1.3.2. Analytische bepalingsprocedure	52
II.3.1.4. Objectieven	52
II.3.1.5. Fysicochemische eigenschappen van thyroxine	53
II.3.2. Experimenteel gedeelte	54

II.3.2.1. Standaarden, reagentia, ultrafilters en sera.....	54
II.3.2.2. Apparatuur.....	55
II.3.2.3. Analyseprocedure voor serum FT4.....	56
II.3.2.3.1. Ultrafiltratie.....	57
II.3.2.3.1.1. pH-variantie gedurende ultrafiltratie.....	58
II.3.2.3.1.2. Adsorptie aan de filter.....	58
II.3.2.3.1.3. Proteïnelekkage.....	58
II.3.2.3.2. Vaste faseextractie (SPE).....	59
II.3.2.3.2.1. Extractieprocedure.....	59
II.3.2.3.2.2. Terugvinding van SPE.....	60
II.3.3. Resultaten en discussie.....	61
II.3.3.1. Evaluatie van ultrafiltratie als scheidingsprocedure.....	61
II.3.3.1.1. pH-variantie gedurende ultrafiltratie.....	62
II.3.3.1.2. Adsorptie aan de filter.....	62
II.3.3.1.3. Proteïnelekkage.....	64
II.3.3.1.4. Aanbevelingen voor het verder gebruik van ultrafiltratie...	65
II.3.3.2. Vaste faseextractie.....	66
II.3.3.2.1. Extractieprocedure.....	67
II.3.3.2.2. Terugvinding van de SPE.....	67
II.3.3.3. Verbeteren van de detectiegevoeligheid.....	68
II.3.4. Besluit.....	71
Referenties.....	72

HOOFDSTUK III: ONTWIKKELING VAN LC-MS-MEETPROCEDURES VOOR DE BEPALING VAN PEPTIDEN EN PROTEÏNEN

III.1. Inleiding.....	78
III.1.1. Overzicht van referentiemeetprocedures voor de bepaling van proteïnen...	78
III.2. Detectie van peptiden en proteïnen met electrospray ionisatie massa- spectrometrie.....	80
III.2.1. Kenmerken van massaspectra in ESI.....	80
III.2.1.1. De “wrong-way-round” electrospray ionisatiemodus (WWR).....	82
III.2.2. Collisie geactiveerde dissociatie.....	84
III.2.3. Doelstelling van de experimenten.....	85
III.2.4. Experimenteel gedeelte.....	87

III.2.5. Modulatie van de ladingsverdeling in “single ion monitoring” (SIM)	88
III.2.5.1. Invloed van de “cone”spanning in ESI+ en ESI-	88
III.2.5.2. Invloed van de samenstelling van de spray (wESI+ en wESI-)	91
III.2.6. Optimalisatie voor collision geactiveerde dissociatie (CAD)	93
III.2.6.1. CAD-“low” experimenten.....	93
III.2.6.2. CAD-“high” experimenten.....	95
III.2.6.3. Benaming van de fragmentionen van peptiden en proteïnen	98
III.2.7. Additie van zuren en basen via de gasfase.....	101
III.3. Chromatografische eigenschappen en staalopzuivering.....	106
III.3.1. Chromatografische eigenschappen.....	106
III.3.1.1. Interactiemechanismen tussen peptiden en proteïnen en “reversed phase”-HPLC-kolommen	106
III.3.1.2. Isocratische versus gradiëntelutie	108
III.3.2. Staalopzuivering.....	108
III.3.2.1. Suppressie en matrixeffecten	108
III.3.2.1.1. Opmerking: overwinnen van praktische beperkingen van ultrafilters.....	110
III.3.2.1.2. Verder onderzoek naar de ionisatiesuppressie	111
III.3.2.2. Besluit	113
III.3.2.3. Staalopzuivering en chromatografie: beide in 1 stap?	114
III.3.2.3.1. Toepassing.....	115
III.4. Stabiliteit van peptiden en proteïnen in oplossing.....	116
III.5. Besluit.....	120
Referenties	122

**HOOFDSTUK IV: ONTWIKKELING VAN EEN REFERENTIEMEETPROCEDURE VOOR DE
BEPALING VAN C-PEPTIDE IN URINE**

IV.1. Inleiding.....	130
IV.1.1. De fysiologie van C-peptide	130
IV.1.2. Diagnostische toepassingen	132
IV.1.3. Bestaande meetprocedures voor de bepaling van C-peptide	133
IV.1.4. Objectieven	133
IV.1.5. Fysicochemische eigenschappen van C-peptide.....	134
IV.2. Experimenteel gedeelte	135

IV.2.1. Standaarden, reagentia en urines.....	135
IV.2.2. Apparatuur	136
IV.2.3. Analyseprocedure voor de bepaling van C-peptide in urine.....	137
IV.2.4. Bepaling van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure	138
IV.2.4.1. Specificiteit	138
IV.2.4.2. Detectielimiet.....	139
IV.2.4.3. Terugvinding van de ultrafiltratie	139
IV.2.4.4. Nauwkeurigheid/Juistheid.....	139
IV.2.4.5. Precisie.....	139
IV.3. Resultaten en discussie.....	141
IV.3.1. Controle van de stabiliteit van de standaard	141
IV.3.2. Vereisten voor een referentiemeetprocedure	142
IV.3.2.1. Kalibratie.....	142
IV.3.2.1.1 Vergelijking ICN Biomedicals C-peptidestandaard en IRP 84/510 standaard.....	143
IV.3.2.2. Isotoopdilutie	143
IV.3.2.3. Meetprotocol voor een referentiemeetprocedure	144
IV.3.2.4. Interne kwaliteitscontrole (IQC).....	145
IV.3.3. Bespreking van de meetcondities.....	146
IV.3.3.1. LC-condities in de LC-MS-meetprocedure	146
IV.3.3.2. MS-condities in de LC-MS-meetprocedure.....	147
IV.3.4. Bespreking van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure voor C-peptide.....	148
IV.3.4.1. Specificiteit	148
IV.3.4.1.1. Opsporen van storende substanties bij m/z 1517>1508	148
IV.3.4.1.2. Opsporen van storende substanties bij m/z 1509>1500	149
IV.3.4.2. Detectielimiet.....	151
IV.3.4.3. Terugvinding van de ultrafiltratie	151
IV.3.4.4. Nauwkeurigheid/Juistheid.....	152
IV.3.4.5. Precisie.....	153
IV.3.5. Toepassing	154
IV.4. Besluit.....	156
Referenties	157

**HOOFDSTUK V: TOEPASSING VAN DE REFERENTIEMEETPROCEDURE VOOR URINAIR
C-PEPTIDE: EVALUATIE EN REKALIBRATIE VAN ROUTINEMEET-
PROCEDURES**

V.1. Inleiding.....	160
V.1.1. Objectieven.....	161
V.2. Routinetestsysteem voor C-peptide	162
V.2.1. Problematiek in hun ontwikkeling	162
V.2.1.1. C-peptideantiseren.....	162
V.2.1.2. C-peptidestandaard en kalibratie.....	162
V.2.1.3. Specificiteit van de systemen	163
V.2.1.4. Geëvalueerde routinetestsysteem	163
V.3. Experimenteel gedeelte.....	167
V.3.1. Urinestalen	167
V.3.2. Interne kwaliteitscontroles voor de routinemeetprocedures.....	167
V.3.3. Analyseprotocol voor de evaluatie.....	168
V.3.3.1. Metingen met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure	168
V.3.3.2. Metingen met de routinetestsysteem	168
V.3.4. Verwerking van de resultaten.....	169
V.3.4.1. Statistische methoden	169
V.3.4.2. Grafische voorstelling	169
V.4. Resultaten en discussie	171
V.4.1. Urinestalen	171
V.4.2. Interne kwaliteitscontrole.....	172
V.4.3. Imprecisie	173
V.4.4. Methodevergelijking – systematische afwijking.....	174
V.4.5. Methodevergelijking – recalibratie	177
V.4.6. Methodevergelijking – robuustheid/specificiteit.....	180
V.4.6.1. Specificiteit van de ID-LC-MS/MS-meetprocedure	181
V.4.6.2. Specificiteit van de immunotestsysteem	181
V.5. Besluit.....	183
Referenties	184
SAMENVATTING.....	187
SUMMARY	191
RESUME	195

HOOFDSTUK I

ACHTERGROND EN OBJECTIEVEN VAN DE ONTWIKKELING VAN LC-MS-REFERENTIEMEETPROCEDURES VOOR DE BEPALING VAN THYROID- EN PEPTIDENHORMONEN

I.1. Achtergrond en rol van referentiemeetprocedures in de klinische chemie

Het is al sinds lang bekend dat voor vergelijkbaarheid van analyseresultaten in de klinische chemie een algemeen aanvaard coherent meet- of referentiesysteem nodig is (1). Vooraleer dit systeem echter kan uitgelegd worden, is het noodzakelijk de metrologische achtergrond van een meting toe te lichten.

In de klinische chemie wordt, zoals trouwens ook in andere disciplines, een meting gedefinieerd als ‘een serie handelingen met als doel een waarde voor de hoeveelheid (“a value for the quantity”) te bepalen’ (2). Daarenboven omvat de volledige specificatie van een meting 3 elementen, nl. het ‘systeem’ (bvb. bloedserum), de ‘analyt’ (bvb. thyroxine) en de ‘soort hoeveelheid’ (“kind-of-quantity”) (bvb. de hoeveelheid bestanddeelconcentratie, “amount-of-substance concentration”) (3, 4). Deze 3 elementen samen worden ook de “measurand” genoemd (2). Het resultaat van een meting, nl. de gevonden waarde van hoeveelheid, wordt uitgedrukt via een getal en een eenheid. Hierbij is het duidelijk dat, teneinde vergelijkbare meetresultaten te verkrijgen, het een basisvereiste is dat ze in algemeen aanvaarde eenheden uitgedrukt worden. Hiervoor werd door de internationale metrologische gemeenschap het “Système International d’ Unités” (5), beter bekend als SI-eenheden, ontwikkeld. Ook in de klinische chemie werd door de “International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine” (IFCC, Milaan, Italië) het gebruik van voornoemd eenhedenstelsel aanbevolen, tenminste voor analyten waarvan de identiteit eenduidig gekend is (3). De meest gebruikte eenheden zijn massaconcentraties (g/L) en substantieconcentraties (mol/L). Nota: voor analyten die nog onvoldoende gekarakteriseerd zijn, werd door de “World Health Organization” (WHO) het concept van de “International Unit” (IU) ontwikkeld (6, 7). Aangezien dit eenhedenstelsel echter voor deze thesis niet van toepassing is, zal op dit concept niet verder worden ingegaan.

Om de SI-eenheid praktisch te verwezenlijken, wordt in het eenvoudigste geval een ‘materiaal’ gebruikt (8). In de klinische chemie wordt meestal een vergaand gezuiverd en gekarakteriseerd product gebruikt (nota: in het coherent meetsysteem (zie verder) spreekt men over de ‘primaire kalibrator’). Het materiaal wordt meestal ter beschikking gesteld door een nationaal of internationaal metrologisch instituut bvb. het National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, Verenigde Staten) en wordt vergezeld van een certificaat, waarin de zuiverheid en geassocieerde onzekerheid worden gespecificeerd. Om nu een meetresultaat, geproduceerd met een meetprocedure, met de juiste waarde zoals verwezenlijkt door de primaire kalibrator en dus de SI-eenheid in relatie te brengen, is een coherent meet- of referentiesysteem nodig. De relatie tot de SI-eenheid zelf wordt ‘metrologische herleidbaarheid’ (“traceability”) genoemd (Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Généraux de Métrologie, VIM, 2). Verder dient nog opgemerkt te worden dat de SI-herleidbaarheid van een meetresultaat gelijk staat met de juistheid (“trueness”) van het meetresultaat.

Een moderne voorstelling van het coherent meetsysteem tot SI-herleidbaarheid wordt in figuur I.1. getoond. Het omvat als essentiële elementen de definitie van de “measurand” en de SI-eenheid, en een hiërarchie van meetprocedures en materialen, met name een primaire referentiemeetprocedure, een primaire kalibrator, een secundaire referentiemeetprocedure, de werkkalibrator van de fabrikant, de ‘uitgelezen’ procedure (“standing” procedure) van de fabrikant, de productkalibratoren van de fabrikant en tot slot de gebruikers routine-meetprocedure. Zoals uit figuur I.1. blijkt, omvat het coherent meetsysteem verschillende niveaus, waarbij elk niveau gekenmerkt wordt door de combinatie van een materiaal en een meetprocedure. De meetprocedure wordt telkens gebruikt om een waarde toe te kennen aan een materiaal, waarna dit materiaal gebruikt wordt ter kalibratie van de meetprocedure op het onderliggend niveau. Elke toepassing van de combinatie materiaal/meetprocedure brengt een graad van onzekerheid met zich mee (GUM, “Guide to the expression of uncertainty in measurement”, 9) die des te groter wordt naarmate naar lagere niveaus wordt afgezakt.

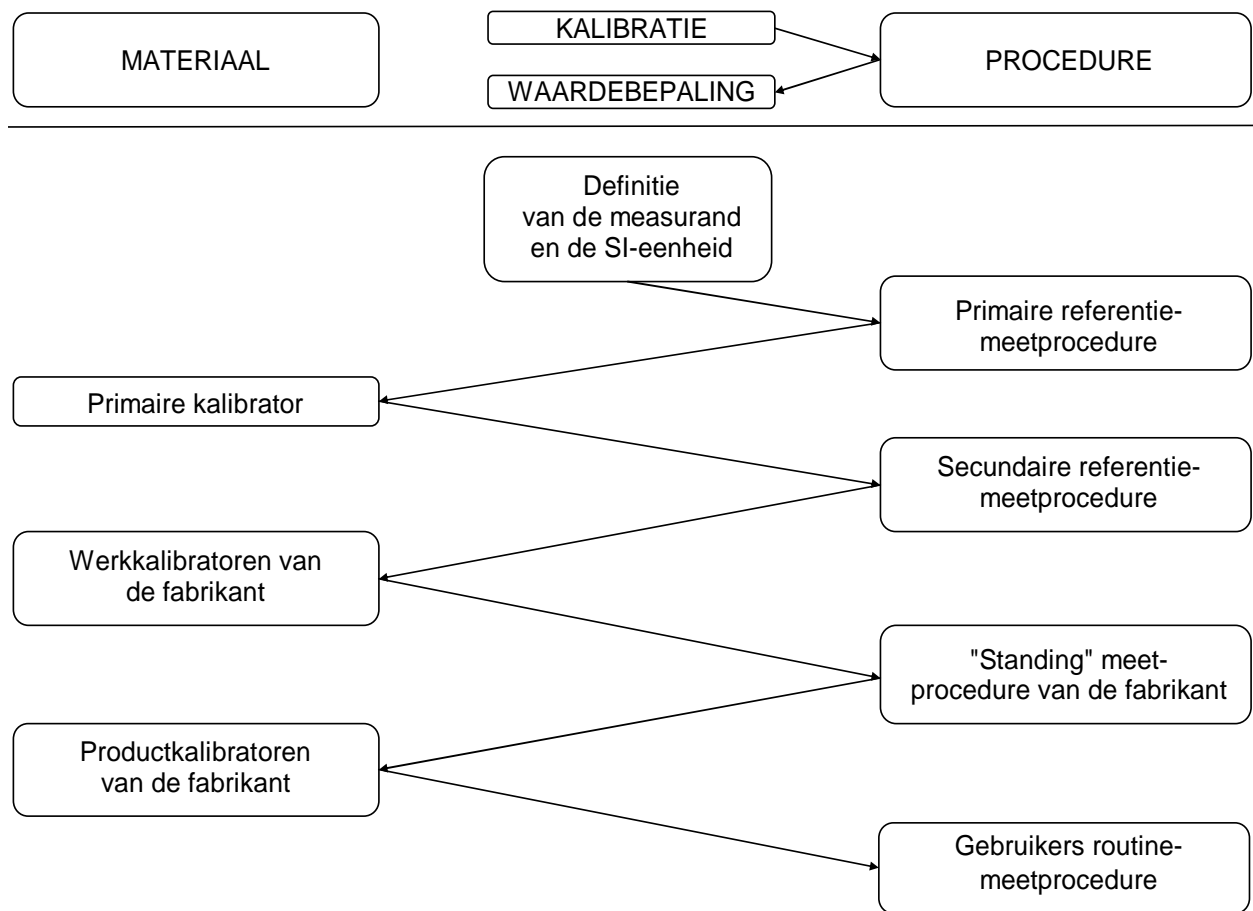
Aan de top van de hiërarchie vinden we, na de definitie van de measurand en de SI-eenheid voor de uitdrukking van de meetresultaten, de ‘primaire referentiemeetprocedure’ terug. Het “Comité Consultatif pour la Quantité de Matière” (CCQM) van het “Comité International des Poids et Mesures” (CIPM) identificeerde bvb. het meetprincipe gravimetrie als primaire referentiemeetprocedure. Deze procedure laat toe, uitgaande van een gecertificeerd standaardmateriaal, de primaire kalibrator met de hoogst mogelijke juistheid en zeer kleine onzekerheid te bereiden. Direct onder de primaire referentiemeetprocedure staat

een secundaire referentiemeetprocedure zoals bvb. isotoopdilutie gaschromatografie-massaspectrometrie (ID-GC-MS) of isotoopdilutie vloeistofchromatografie massaspectrometrie (ID-LC-MS) (10). Meetprocedures van dit type worden gekenmerkt door het feit dat zij direct kunnen gekalibreerd worden met een primaire kalibrator omdat zij matrix onafhankelijk uitvoerbaar zijn. Om aan deze eigenschap te voldoen, moet de secundaire referentiemeetprocedure niet alleen op een theoretisch meetprincipe, dat hoge nauwkeurigheid en specificiteit garandeert (zoals ID-MS), gebaseerd zijn maar tevens uitvoerig geëvalueerd zijn. Zoals hoger uitgelegd, worden secundaire referentiemeetprocedures aangewend om de waarde van de werkkalibratoren, bereid door de fabrikant, te bepalen. Deze werkkalibratoren kunnen in principe verschillende matrices hebben, weliswaar matrices die deze van menselijk serum nabootsen. In dit verband zou in principe voor de fabrikant natuurlijk deze matrix de meest aantrekkelijke zijn die op een vrij eenvoudige en reproduceerbare manier kan aangemaakt worden. Bovendien wordt een fabrikantenkalibrator bij voorkeur door een goede stabiliteit gekenmerkt. Vanuit dit opzicht zou een gelyofiliseerde matrix op basis van bvb. “gepooled” humaan serum of humaan albumine zeer geschikt zijn. Dergelijke kalibratoren hebben echter één groot nadeel: zij kunnen zogenaamde artificiële matrixeffecten vertonen (11, 12). Dit fenomeen wordt ook nog niet-commutabiliteit genoemd (7) en is er oorzaak van dat een routinemeetprocedure zich met dit materiaal anders gedraagt dan met natief serum (nota: natieve serumstalen zijn het normale staalmateriaal voor meting met een routinemeetprocedure). Niet-commutabiliteit van een kalibrator kan afkomstig zijn van het feit dat in het basismateriaal, gebruikt bij de bereiding, modificaties aan de matrix werden aangebracht, bvb. door het lyofilisatieproces, door immuuncomplexvorming bij “poolen” van verschillende sera, door delipideren van het serum, door toevoegen van stabilisatoren of bewaarmiddelen enz. Aangezien niet-commutabiliteit van een materiaal met een meetprocedure als gevolg heeft dat het, in vergelijking tot een natief serumstaal met een zelfde analytconcentratie, een verschillende respons geeft, is het niet als zodanig bruikbaar in het coherent meetsysteem voor transfer van de juistheid naar lagere niveaus. Daarom worden de hoger beschreven kalibratoren vaak in combinatie met sets van natieve serumstalen gebruikt. Deze stalen, ook gemeten met de secundaire referentiemeetprocedure, worden dan gebruikt om de waarden voor de fabrikantenwerkkalibratoren te corrigeren voor het beschreven matrixeffect. Om diezelfde reden wordt zelfs op het niveau van de fabrikantenwerkkalibratoren rechtstreeks gebruik gemaakt van natieve menselijke sera. Verder is het belangrijk dat de secundaire referentiemeetprocedures, waarmee aan deze werkkalibratoren een waarde wordt toegekend, onder gecontroleerde omstandigheden van nauwkeurigheid/juistheid worden uitgevoerd. Dit

gebeurt via interne kwaliteitscontrole met gelyofiliseerde referentiematerialen op basis van menselijk serum, waarvan de concentratie onafhankelijk met verschillende secundaire referentiemeetprocedures werd bepaald (=gecertificeerd) (bvb. in zogenaamde certificatiecampagnes van bvb. BCR, Bureau Communautaire de Référence, Brussel).

Op hun beurt worden de fabrikantenwerkkalibratoren gebruikt ter kalibratie van de “uitgelezen” meetprocedure van de fabrikant. Via deze laatste meetprocedure kent de fabrikant dan waarden toe aan de fabrikantenproductkalibratoren. Deze bestaan in elk geval uit het vereenvoudigde staalmateriaal (bvb. op basis van gelyofiliseerd menselijk albumine). Teneinde deze waarden opnieuw te corrigeren voor eventuele matrixeffecten wordt deze laatste waardentoe wijzing meestal vergezeld van een methodevergelijking met natieve sera. Hierbij worden de sera, gecertificeerd met een secundaire referentiemeetprocedure, gemeten met de gekalibreerde gebruikersroutinemeetprocedure. Op basis van de vergelijking van de waarden (secundaire referentie- versus routinemeetprocedure) worden dan de fabrikantenproductkalibratoren eventueel aangepast. Op die manier dragen zij dus eventueel een andere waarde dan de echte concentratie die zij daadwerkelijk bevatten. Het eindresultaat van deze werkwijze is dat voor natieve serumstalen in routine-omstandigheden metrologisch herleidbare resultaten worden verkregen.

Algemeen kan dus gesteld worden dat, via toepassing van het coherent meetsysteem, de juistheidsbasis, gelegd door de primaire kalibrator als verwezenlijking van de SI-eenheid, en de primaire referentiemeetprocedure, getransfereerd wordt naar de routinemeetprocedure.



Figuur I.1. Schematische voorstelling van het coherent meetsysteem tot SI-herleidbaarheid.

I.2. Objectieven van het onderzoek

Uit de beschrijving van het coherent meetsysteem onder I.1. is dus duidelijk gebleken dat, naast de primaire referentiemeetprocedure, de secundaire referentiemeetprocedures een sleutelpositie tot metrologische herleidbaarheid innemen. In verband met deze procedures werd er ook reeds op gewezen dat, alvorens zij hun rol in het coherent meetsysteem kunnen vervullen, zij terdege op nauwkeurigheid/juistheid en specificiteit dienen geëvalueerd te worden. In tabel I.1. wordt een overzicht gegeven van de verschillende organische analyten in serum waarvoor er in ons laboratorium reeds een secundaire referentiemeetprocedure op basis van ID-MS ontwikkeld werd.

Tabel I.1. Overzicht van de organische analyten waarvoor in ons laboratorium een secundaire referentiemeetprocedure op basis van ID-MS werd ontwikkeld.

Analyt (in serum)	Referentie
Cholesterol	13, 14, 15
Glucose	13, 14, 15
Urinezuur	13, 14, 15
Kreatinine	13, 14, 15
Totaal triacylglycerolen	15
Aldosteron	15, 16
Oestradiol-17 β	15, 17
Cortisol	15, 18
Progesteron	15, 19
Testosteron	15, 19
Theofylline	15, 20
Thyroxine	21, 22, 23

Op de bepalingprocedure voor thyroxine (T4) na werden tot nu toe alle meetprocedures in ons laboratorium op basis van ID-GC-MS ontwikkeld. Aangezien echter niet alle klassen analyten, zoals bvb. peptiden en proteïnen, via ID-GC-MS bepaalbaar zijn, besloten wij de stap naar de ontwikkeling van referentiemeetprocedures op basis van ID-LC-MS te zetten. Door technologische vernieuwingen is LC-MS vandaag de dag een uitstekend

hulpmiddel geworden voor de bepaling van peptiden en proteïnen in biologische matrices (24-34). In de meeste reeds gepubliceerde meetprocedures op basis van LC-MS wordt echter geen gebruik gemaakt van ID. Dit is te wijten aan de relatief hoge kost voor de synthese van stabiele, isotopisch gemerkte analogen van polypeptiden. Op die manier maakten sommige gebruik van een homolog (34) of een diastereomeer (32) als interne standaard (IS). Het gebruik van **ID-LC-MS** werd, voor zover wij weten, slechts door 2 groepen toegepast (24, 26, 30). Eén van hen beschreef een “off-line” ID-LC-MS-bepalingsprocedure voor C-peptide in serum (24), een andere beschreef een ID-LC-MS-meetprocedure voor de bepaling van apolipoproteïne A-1 na enzymatische digestie (26).

Wij vonden het daarom een uitdaging, via deze doctoraatsstudie, de aanwendbaarheid van de ID-LC-MS-technologie voor de ontwikkeling van **referentiemeetprocedures** te exploreren. Hierbij zou de volgende strategie worden aangewend:

i) Gezien de succesvolle ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor T4 op basis van ID-LC-MS, besloten wij eerst over te gaan naar de ontwikkeling van een meetprocedure voor de bepaling van serum trijodothyronine (T3). Deze substantie is weliswaar analoog aan T4 (T4 minus 1 joodatoom), maar zij komt in een veel geringere concentratie voor in serum (gemiddeld 2.3 nmol/L T3 versus 103.2 nmol/L T4). Het werd daarom ons objectief de gevoeligheid van de reeds ontwikkelde ID-LC-MS-meetprocedure voor T4 (22) zodanig te verbeteren dat ook een ID-LC-MS-meetprocedure voor T3 ontwikkeld kon worden. Daarbij zou nog steeds voortgegaan worden op de jarenlange ervaring met ID-GC-MS in ons laboratorium en zou ook in parallel een ID-GC-MS-meetprocedure ontwikkeld worden. Op die manier zou de ID-LC-MS- met de ID-GC-MS-meetprocedure geëvalueerd worden.

Enkele bijzondere aandachtspunten tijdens de ontwikkeling van de meetprocedure zouden hierbij zijn:

- controle op nauwkeurigheid/juistheid van de meetprocedure.
- de isolatieprocedure van T3 uit het serum.
- het vermijden van een mogelijke omzetting van T4, eveneens endogeen aanwezig in serum, naar T3 door dejodering

De evaluatie van de ontwikkelde ID-LC-MS- en ID-GC-MS-referentiemeetprocedure zou gebeuren door ze toe te passen op een aantal gelyofiliseerde controlesera en op een groter aantal patiëntensera.

ii) Vervolgens was het onze bedoeling over te gaan naar de bepaling van analyten die in nog lagere concentraties in serum voorkomen. Voor dit objectief werd geopteerd voor de bepaling van de vrije fractie van T4 in serum, die slechts met een concentratie van gemiddeld 19 pmol/L voorkomt. Deze experimenten maakten deel uit van een haalbaarheidsonderzoek als basis voor een Europees project i.v.m. de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor vrij thyroxine (FT4). Het definitieve project wordt het onderwerp van een volgende doctoraats thesis.

In de ontwikkelingsfase van deze studie zou vooral aandacht besteed worden aan de mogelijkheden om de vrije fractie fysisch van de gebonden hormoonfractie te scheiden. Tevens zou worden nagegaan of het bepalen van zo'n lage hormoonconcentraties met onze huidige GC- en LC-apparatuur wel realiseerbaar is.

iii) Tot slot was het de bedoeling over te gaan naar de klasse van substanties zoals peptiden/proteïnen die enkel met LC-MS bepaald kunnen worden. Het werd ons objectief een referentiemeetprocedure voor de bepaling van C-peptide (relatief moleculair gewicht, Mr 3020) in urine op punt te stellen. De concentraties van C-peptide in urine liggen bij gezonde personen tussen ongeveer 17 tot 33 nmol/L (35). Onze aandacht voor C-peptide was afkomstig van het feit dat ons laboratorium interesse had om de reeds bestaande referentiemeetprocedures voor analyten van belang bij de behandeling van diabetes, met name glucose (13, 14) en glycohemoglobine (36, 37), uit te breiden.

Aangezien chromatografie en massaspectrometrie van peptiden/proteïnen in ons laboratorium nog een onbekend terrein was, werden de eerste massaspectrometrische experimenten uitgevoerd met insuline (Mr 5807.6). Insuline is immers veel gemakkelijker en goedkoper verkrijgbaar dan C-peptide. Voor de chromatografische experimenten werd wel gebruik gemaakt van C-peptide.

Bijzondere aandachtspunten tijdens de ontwikkeling van de LC-MS-meetprocedure zouden de volgende zijn:

- isolatie van het peptide uit de urinematrix.
- goede chromatografie en selectieve massaspectroscopische detectie van het peptide.
- stabiliteit van de kalibratoren gedurende analyse en bewaring.
- een goede nauwkeurigheid/justheid, precisie en voldoende robuustheid van de meetprocedure.

De evaluatie van de ontwikkelde ID-LC-MS-meetprocedure zou gebeuren door ze toe te passen op een gelyofiliseerd controlestaal en op een groot aantal urinestalen (~45). Tot slot zou een methodevergelijking met 5 routinetests systemen uitgevoerd worden.

REFERENTIES

- (1) Tietz NW. A model for a comprehensive measurement system in clinical chemistry. Clin. Chem. 1979;25:833-9.
- (2) BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Généraux de Métrologie. 2nd ed. Geneva :ISO, 1993.
- (3) International Federation of Clinical Chemistry, International Union of Pure and Applied Chemistry. Approved recommendations (1978) on quantities and units in clinical chemistry. Prepared for publication by R. Dybkaer. Pure Appl. Chem. 1979; 51:2451-79.
- (4) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Properties and units in the clinical laboratory sciences. I. Syntax and semantic rules (Recommendation 1995). Prepared for publication by H. Olesen. Eur. J. Clin. Chem. Biochem. 1995;33:627-36.
- (5) ISO Standards handbook. Quantities and units. 3rd ed. Geneva: International Organization for Standardization, 1993.
- (6) Dybkaer R and PL Storrang. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Application of IUPAC-IFCC recommendations on quantities and units to WHO biological reference materials for diagnostic use. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1995;33:623-5.
- (7) Dybkaer R. Quantities and units for biological reference materials used with in vitro diagnostic measuring systems for antibodies. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1996;56:385-91.
- (8) Bureau International des Poids et Mesures (BIPM). The Convention of the Metre. <http://www.bipm.fr/>.

- (9) International Organization for Standardization (ISO). Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. Geneva, Switzerland, 1993.
- (10) De Leenheer AP, Lefevre MF, Lambert WE, Colinet ES. Isotope-dilution mass spectrometry in clinical chemistry [Review]. *Adv. Clin. Chem.* 1985;24:111-61.
- (11) Eckfeld JH, Copeland KR. Accuracy verification and identification of matrix effects. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993;117:381-6.
- (12) Miller WG. How useful are reference materials [Editorial]. *Clin. Chem.* 1996;42:1733-4.
- (13) Thienpont LM, De Leenheer AP, Stöckl D, Reinauer H. Candidate reference method for the determination of target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. II. Method transfer. *Clin. Chem.* 1993;39:1001-6.
- (14) Stöckl D, Reinauer H. Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method setup. *Clin. Chem.* 1993;39:993-1000.
- (15) Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, Reinauer H, De Leenheer AP. Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: a five years' experience of two European reference laboratories. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996;34:853-60.
- (16) Stöckl D, Reinauer H, Thienpont LM, De Leenheer AP. Determination of aldosterone in human serum by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry using a new heptafluorobutyryl derivative. *Biol. Mass Spectrom.* 1991;20:657-64.
- (17) Thienpont LM, Verhaeghe PG, Van Brussel KA, De Leenheer AP. Estradiol-17 β quantified in serum by isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry: reversed phase C₁₈ high performance liquid chromatography compared with immuno-affinity chromatography for sample pretreatment. *Clin. Chem.* 1988;34:2066-9.

- (18) Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Candidate reference method for determining serum cortisol based on isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry using heptafluorobutyrylation as derivatisation method. *Anal. Biochem.* 1996;234:204-9.
- (19) Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Use of cyclodextrins for prepurification of progesterone and testosterone from human serum prior to determination with isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1994;66:4116-9.
- (20) Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, De Leenheer AP. Candidate reference method for the determination of serum theophylline and its application for target-setting in external quality assessment and routine method evaluation. *Clin. Chem.* 1994;40:1503-11.
- (21) Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Development of a new method for the determination of thyroxine in serum based on isotope dilution-gas chromatography mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 1994;23:475-82.
- (22) De Brabandere V, Hou P, Stöckl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. Isotope dilution-liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of serum thyroxine as a potential reference method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998;12:1099-103.
- (23) De Brabandere VI, Stöckl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. On the use of trimethylchlorosilane in methanol for methylation of thyroxine prior to perfluoroacylation and isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1998;33:1032.
- (24) Kippen DA, Cerini F, Vadas L, Stöcklin R, Vu L, Offord RE, Rose K. Development of an isotope dilution assay for precise determination of Insulin, C-peptide, and Pro-insulin level in non-diabetic and Type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J. Biol. Chem.* 1997;272:12513-22.

- (25) Dass C, Kusmierz JJ, Desiderio DM. Mass spectrometric quantification of endogenous beta-endorphin. *Biol. Mass Spectrom.* 1991;20:130-8.
- (26) Barr JR, Maggio VL, Patterson Jr. DG, Cooper GR, Henderson LO, Turner WE et al. Isotope dilution-mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I. *Clin. Chem.* 1996;42:1676-82.
- (27) Kobold U, Jeppsson JO, Dülffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A_{1c} based on peptide mapping. *Clin. Chem.* 1997; 43:1944-51.
- (28) Bunk DM, Welch MJ. Electrospray ionization mass spectrometry for the quantitation of albumin in human serum. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997;8:1247-54.
- (29) Roberts NB, Green BN, Morris N. Potential of electrospray mass spectrometry for quantifying glycohemoglobin. *Clin. Chem.* 1997;43:771-8.
- (30) Stöcklin R, Vu L, Vadas L, Cerini F, Kippen AD, Offord RE, Rose K. A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes* 1997;46:44-50.
- (31) Mitchell AE, Morin D, Lakritz J, Jones D. Quantitative profiling of tissue-and gender-related expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the mouse. *Biochem. J.* 1997;325:207-16.
- (32) Wilbert SM, Engrissei G, Yau EK, Grainger DJ, Tatalick L, Axworthy DB. Quantitative analysis of synthetic peptide, NR58-3.14.3, in serum by LC-MS with inclusion of a diastereomer as internal standard. *Anal. Biochem.* 2000;278:14-21.
- (33) Desiderio DM. Mass spectrometric analysis of neuropeptidergic systems in the human pituitary and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999;731:3-22.

- (34) Kobayashi N, Kanai M, Seta K, Nakamura K. Quantitative analysis of synthetic human calcitonin by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1995;672:17-23.
- (35) Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994:928-1001.
- (36) Jeppsson JO, Kobold U, Mauri P, Miedema K, Mosca A, Niederau C, Paroni R, Susanto F, Thienpont LM. International network of reference laboratories for the determination of HbA1c. *Clin. Chem.* 1998;44:A22.
- (37) Willekens E, Thienpont LM, Stöckl D, Kobold U, Hoelzel W, De Leenheer AP. Quantification of glycohemoglobin in blood by mass spectrometry applying multiple-reaction monitoring. *Clin. Chem.* 2000;46:281-3.

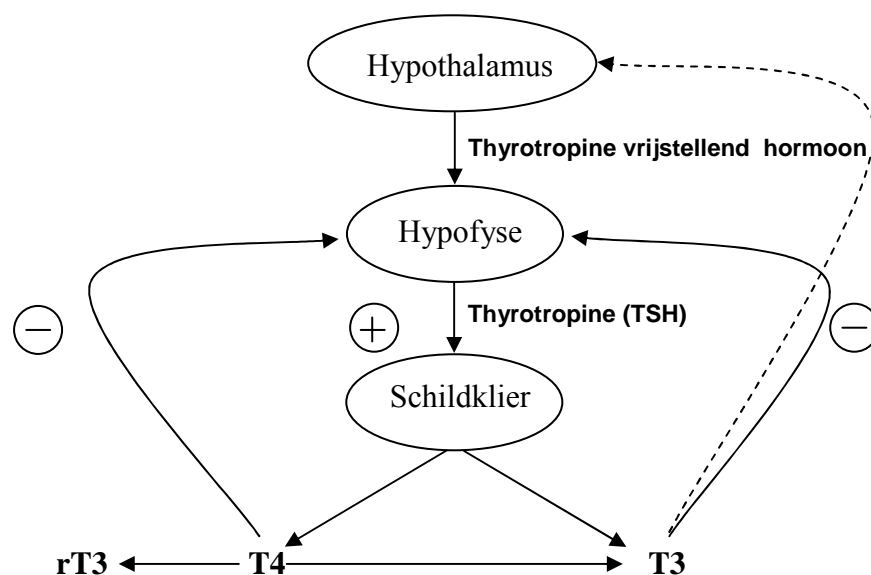
HOOFDSTUK II

ONTWIKKELING VAN LC-MS-REFERENTIE- MEETPROCEDURES VOOR DE BEPALING VAN THYROIDHORMONEN IN SERUM

II.1. Inleiding

II.1.1. Fysiologie van de schildklier

De schildklier is in het menselijk lichaam verantwoordelijk voor de secretie van voornamelijk T₄ en T₃. De secretie wordt geregeld via het thyrotropine vrijstellend hormoon (protireline of TRH) en het thyroïd stimulerend hormoon (thyrotropine of TSH). TRH is een tripeptide [L-(pyro)Glu-L-His-L-Pro(NH₂)] dat gesynthetiseerd wordt in de hypothalamus. Het zorgt, door de inwerking op de hypofyse, voor de vrijstelling van TSH, een heterodimeer glycoproteïne. De secretie van TSH wordt geregeld door een negatief “feedback” mechanisme, d.w.z. wanneer in het bloed de concentraties aan T₃ en T₄ verminderen, zal de vrijstelling van TSH toenemen (zie figuur II.1.). Recent wordt verondersteld dat ook een tweede feedback mechanisme bestaat die inwerkt op de vrijstelling van TRH.



Figuur II.1. Schematische voorstelling van de wisselwerking tussen de verschillende thyroïdhormonen. (—): inwerking op de hypofyse; (---): inwerking op de hypothalamus.

Onder invloed van het TSH worden de folliculaire epitheelcellen van de schildklier gestimuleerd om thyroglobuline te produceren. Verscheidene tyrosineresidu's in de thyroglobulinemolecule zijn geïodeerd en worden dan gekoppeld om jodothyronines te vormen. Deze worden opgeslagen in het folliculair lumen tot hun vrijstelling in de circulatie plaatsvindt. Er bestaan 3 verschillende types deiodases die de deiodatie van de jodothyronines katalyseren, nl. type I deiodase monodejodeert de buitenste ring en converteert op die manier T₄ (3,5,3',5'-L-tetraiodothyronine) naar T₃ (3,5,3'-L-trijodothyronine). Dit is de belangrijkste bron van T₃ (80%) in het serum. De overige 20% van T₃ is afkomstig van de directe synthese in de schildklier gevolgd door secretie. Type I deiodase deïodeert ook reverse T₃ (3,3',5'-L-trijodothyronine, rT₃) tot diiodothyronine (T₂). Type II deiodase werkt eveneens enkel in op de buitenste ring en converteert op die manier ook T₄ naar T₃. De activiteit van het type II deïodase stijgt wanneer er weinig T₄ beschikbaar is en verhoogt zo de efficiëntie van de T₃ productie (1). Type III deïodase werkt in op de binnenste ring en converteert T₄ naar rT₃ en T₃ naar T₂. Ongeveer 40% van het gesecreteerde T₄ wordt gedeïodeerd in de lever en in andere perifere weefsels tot T₃ en ongeveer 45% wordt gedeïodeerd tot rT₃. Zo wordt er bij een normale dagelijkse T₄-productie van 100 nmol (80 µg) ongeveer 40 nmol (26 µg) T₃ en 45 nmol (29 µg) rT₃ geproduceerd door perifere deïodatie. T₃ is de meest actieve metabooliet en is 5 à 10 keer actiever dan T₄. Bij euthyroïde volwassenen ligt de serumconcentratie van T₄ tussen 65 en 155 nmol/L en van T₃ tussen 1 en 3 nmol/L (2). De schildklierhormonen zijn zeer sterk proteïnegebonden: T₄ is voor 99.98% gebonden aan proteïnen, T₃ daarentegen is met ~99.8% 10 maal minder sterk gebonden aan proteïnen. Het voornaamste bindingsproteïne voor T₃ en T₄ is het thyroxinebindend globuline (TBG). De proteïnegebonden schildklierhormonen kunnen de cellen niet binnendringen en worden beschouwd als biologisch inert. Hun functie is voornamelijk als reservoir voor de circulerende schildklierhormonen (3). Dit in tegenstelling tot de vrije fracties, die onmiddellijk de cellen kunnen binnendringen via een specifiek membraan transportmechanisme om zo hun biologische functie uit te oefenen.

De schildklierhormonen brengen 2 grote fysiologische effecten teweeg, ten eerste verhogen ze praktisch in elke lichaamscel de proteïnesynthese. Inderdaad, wanneer T₄ en T₃ de cellen binnendringen, werkt T₃ in op de zure chromatine proteïnereceptoren die gebonden zijn op het DNA in de celkern. Dit leidt tot de stimulatie van de DNA-transcriptie en de translatie van het mRNA. Ten tweede wordt de zuurstofconsumptie verhoogd door bevordering van de activiteit van het Na⁺, K⁺-ATPase en dit vooral in de lever, de nieren, het hart en de skeletspieren. T₄ en T₃ worden bepaald ter diagnose van hyper- en hypothyroïdisme.

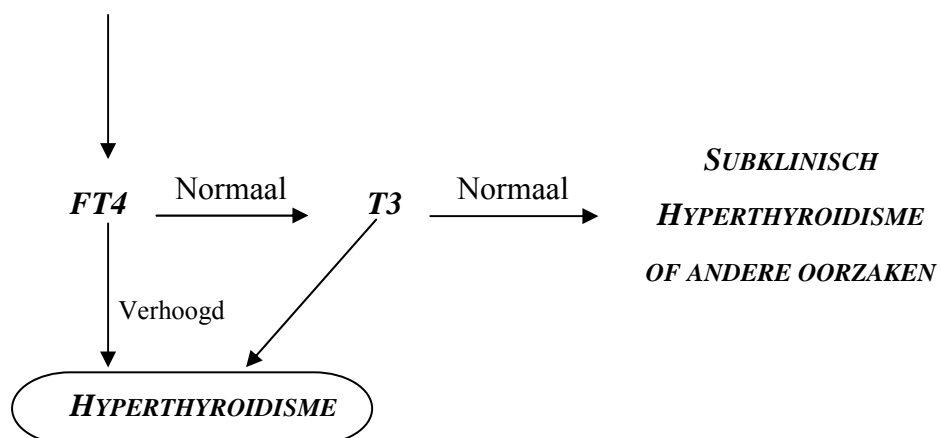
II.2. Trijodothyronine (T3)

II.2.1. Inleiding

II.2.1.1. De pathofysiologie en diagnostische bepaling van T3

De bepaling van T3 maakt deel uit van de evaluatie van de schildklierfunctie en ze wordt uitgevoerd wanneer er twijfel is of de patiënt hyper- (of hypo)thyroïd is na de bepaling van vrij of totaal T4 (TT4). De eerste bepaling in de evaluatie van de schildklierfunctie is de bepaling van TSH. Wanneer de concentratie aan TSH onderdrukt is, heeft men een vermoeden dat de patiënt aan hyperthyroïdisme lijdt. Ter bevestiging zal men de concentratie van FT4 (of TT4) bepalen. Indien deze normaal is, maar toch symptomen van hyperthyroïdisme aanwezig zijn, wordt overgegaan tot de bepaling van T3. Bij normale T3-concentraties is de diagnose subklinisch hyperthyroïdisme, tenzij er een aandoening is van de hypofyse of er andere interfererende factoren aanwezig zijn. In het geval van verhoogde T3-concentraties spreekt men van T3-toxicose en volgt de behandeling van hyperthyroïdisme (4). Voor de vaststelling van hypothyroïdisme is de bepaling van T3 niet nuttig. Bij 20 tot 30% van de patiënten met hypothyroïdisme ligt immers de T3-concentratie in het normale bereik. Daarenboven is de T3-concentratie subnormaal bij 70% van de gehospitaliseerde, maar euthyroïde patiënten (5).

TSH beneden de detectielimiet van een gevoelige meetprocedure



Figuur II.2. Diagnoseschema bij de bepaling van T3 wanneer er twijfel bestaat of de patiënt al dan niet hyperthyroïd is.

II.2.1.2. Bestaande bepalingprocedures voor T3

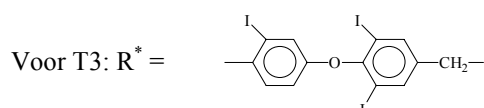
De bepalingprocedures voor totaal T3 (proteïnegebonden + vrij, TT3) zijn gedurende de laatste 4 decennia enorm geëvolueerd. In de eerste testen, die dateren uit de jaren '50, werd de hormoonconcentratie afgeleid uit het proteïnegebonden jood. Deze meetprocedure werd in de jaren '60 vervangen door competitieve proteïnebindingsmeetprocedures en later in 1970 door radioimmunologische meetprocedures (RIA). Tegenwoordig worden TT3-concentraties bepaald met competitieve of niet-competitieve immunologische meetprocedures. Deze maken gebruik van radioactief jood, enzymen, fluorescentie of chemiluminescente moleculen om het meetsignaal te produceren. Momenteel zijn er ongeveer 13 verschillende routinetestsystemen (al dan niet automatisch uitgevoerd) commercieel beschikbaar voor de bepaling van TT3 (18). Helaas verschillen de resultaten van deze meetprocedures, wanneer op hetzelfde staal toegepast, soms enorm. Dit is onder meer te wijten aan verschillen in de matrix van de kalibratoren, de efficiëntie van de gebruikte inhibitoren voor binding aan proteïnen en natuurlijk ook de specificiteit van de antilichamen. Op die manier is elk testsysteem noodgedwongen geassocieerd met specifieke referentie-intervallen en wordt het algemeen gebruik van één goed bepaald referentie-interval, op basis van grote epidemiologische studies, verhinderd. Bovendien geven de verschillen in resultaten vaak aanleiding tot herhaling van een laboratoriumanalyse, wanneer een thyroïdpatiënt om een of andere reden van behandelende geneesheer wisselt. Omwille van voornoemde nadelen is de nood aan de beschikbaarheid van een referentiemeetprocedure hoog.

Bij de start van onze studie was er in de literatuur, voor zover wij weten, nog geen enkele referentiemeetprocedure voor de bepaling van T3 gepubliceerd. Wel werden er artikels gevonden waarin een grote verscheidenheid aan procedures beschreven werden voor derivatisatie van de jodothyronines, zodat GC-MS-analyses mogelijk werden (tabel II.1.). Voor ID-GC-MS-referentiemeetprocedures zijn de derivaten uit tabel II.1. echter niet alle geschikt. Vele resulteren vaak in ionen met lage intensiteit in het hoge m/z gebied (6), terwijl het voor de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure met voldoende specificiteit, juist wenselijk is om ionen uit het hoge m/z gebied met voldoende intensiteit te kunnen monitoren.

Tabel II.1. Overzicht van verschillende procedures voor de derivatisatie van jodothyronines.

Derivaat	Derivatisatiereagens	Reactieproduct	Ref.
Trimethylsilyl	Bis(trimethylsilyl)-acetamide	$(\text{CH}_3)_3\text{SiO}-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{NHSi}(\text{CH}_3)_3 \\ \text{CO}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{matrix}$	7, 8, 9
Trimethylsilylmethylester	1) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 2) Bis(trimethylsilyl)acetamide	$(\text{CH}_3)_3\text{SiO}-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{NHSi}(\text{CH}_3)_3 \\ \text{CO}_2\text{CH}_3 \end{matrix}$	10
Pivalylmethylester	1) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 2) Pivalylanhydride/TEA ¹	$(\text{CH}_3)_3\text{CO}_2-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{NHCOC}(\text{CH}_3)_3 \\ \text{CO}_2\text{CH}_3 \end{matrix}$	11
Permethyl	Methylsulphonyl carbanion of Methyleenchloride/diazomethaan	$\text{CH}_3\text{O}-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{N}(\text{CH}_3)_2 \\ \text{CO}_2\text{CH}_3 \end{matrix}$	12, 13
	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{diazomethaan}$	$\text{CH}_3\text{O}-\text{R}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}_2\text{CH}_3$	14
Oxazolidinone	Dichlorotetrafluoroaceton in $\text{CN}_3\text{CN}/\text{pyridine}$	$\text{HO}-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{CO} \\ \text{NH} \text{---} \text{O} \\ \text{C}(\text{CF}_2\text{Cl})_2 \end{matrix}$	15
O-acetyloxazolidinone	1) Dichlorotetrafluoroaceton in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{pyridine}$ 2) Azijnzuuranhydride	$\text{CH}_3\text{CO}_2-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{CO} \\ \text{NH} \text{---} \text{O} \\ \text{C}(\text{CF}_2\text{Cl})_2 \end{matrix}$	16
O-methyloxazolidinone	1) Dichlorotetrafluoroaceton in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{pyridine}$ 2) diazomethaan in benzeen/ diethylether	$\text{CH}_3\text{O}-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{CO} \\ \text{NH} \text{---} \text{O} \\ \text{C}(\text{CF}_2\text{Cl})_2 \end{matrix}$	17
O-heptafluoro- butyryloxazolidinone	1) Dichlorotetrafluoroaceton in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{pyridine}$ 2) HFBA ²	$\text{C}_3\text{F}_7\text{CO}_2-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{CO} \\ \text{NH} \text{---} \text{O} \\ \text{C}(\text{CF}_2\text{Cl})_2 \end{matrix}$	18
Trifluoroacetyl- methylester	1) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 2) TFA ³ / CH_3CN	$\text{CF}_3\text{CO}_2-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{NHCOCF}_3 \\ \text{CO}_2\text{CH}_3 \end{matrix}$	19
Heptafluoro- butyrylmethylester	1) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 2) HFBA/ CH_3CN	$\text{C}_3\text{F}_7\text{CO}_2-\text{R}-\text{CH} \begin{matrix} \text{NHCOC}_3\text{F}_7 \\ \text{CO}_2\text{CH}_3 \end{matrix}$	20

¹ Triethylamine, ² Heptafluoroboterzuuranhydride, ³ Trifluoroazijnzuuranhydride



II.2.1.3. Objectieven

Aangezien er nog geen referentiemeetprocedure voor TT3 beschreven werd, beslisten wij over te gaan tot de ontwikkeling ervan. Gezien de gelijkenis van T3 en T4 baseerden wij ons op de in ons laboratorium eerder ontwikkelde referentiemeetprocedures voor T4 (21, 22). Dit betekende onder meer voor GC-MS derivatisatie tot vorming van het *N,O*-(di-HFB)-methylester (23).

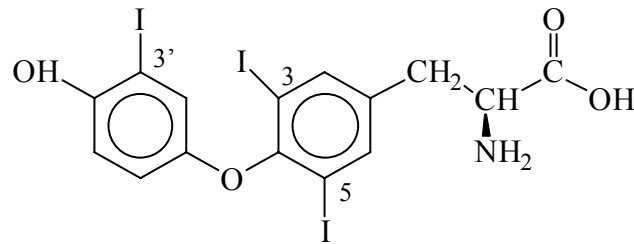
Wij realiseerden ons echter dat, in vergelijking met T4, T3 in serum in veel kleinere concentraties voorkomt, wat zou betekenen dat vooral aan de gevoeligheid van de te ontwikkelen LC-MS- en GC-MS-meetprocedure zeker aandacht zou moeten besteed worden om T3 in fysiologische concentraties te kunnen bepalen. Ofschoon de ervaring in het labo met de ontwikkeling van referentiemeetprocedures op basis van ID-GC-MS groter was dan op basis van ID-LC-MS, zagen wij in de ontwikkeling van een ID-LC-MS-meetprocedure toch een groot voordeel aangezien geen derivatisatie nodig was. Dit zou niet alleen een enorme tijds winst betekenen wanneer een groot aantal stalen geanalyseerd moest worden, maar zou tegelijkertijd het zwakke punt van de GC-MS-meetprocedure, nl. de derivatisatie, wegnemen (23). Desalniettemin zagen wij het nut van een parallelle ontwikkeling van een ID-GC-MS- en een ID-LC-MS-meetprocedure in, aangezien dit ons zou toelaten de meetprocedures tegen elkaar te evalueren.

Een bijkomend probleem voor de bepaling van T3 en elk ander jodothyronine met minder dan 4 joodatomen is de mogelijkheid van artificiële dejodatie van endogeen T4. Inderdaad, endogeen T4 kan dejoderen tot bvb. T3 onder invloed van UV-licht en/of de chemische samenstelling van de oplossing bvb. in sterk zuur midden. Dit betekende dat bij de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure grote zorg zou moeten besteed worden aan de extractie- en derivatisatieprocedure, om mogelijke dejodatie uit te sluiten. Wij realiseerden ons nl. dat, gezien de grotere concentratie (~50 x hoger) van T4 t.o.v. T3 in het serum, een dejodatie van zelfs minder dan 1% al zou resulteren in volledig onjuiste resultaten voor de bepaling van T3 (1% dejodatie bij een normale T4-concentratie van 103 nmol/L zou het resultaat van T3 (~2.3 nmol/L) met ~50% doen stijgen).

Verder diende ook rekening gehouden te worden met de aanwezigheid van endogeen rT3. Deze substantie verschilt enkel van T3 in de positie van 1 joodatoom en heeft bijgevolg hetzelfde relatief moleculair gewicht.

II.2.1.4. Fysicochemische eigenschappen van T3

L-Trijodothyronine ($C_{15}H_{12}I_3NO_4$) of β [4-(3-jodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodofenyl]-L-alanine (figuur II.3.) heeft een Mr 651.01 en is onoplosbaar in water, alcohol en propyleenglycol. Het is oplosbaar in verdund alkalisch milieu (bvb. NaOH-oplossing) en daarbij wordt een bruin, water oplosbaar natriumzout ($C_{15}H_{11}I_3NNaO_4$) gevormd (2).

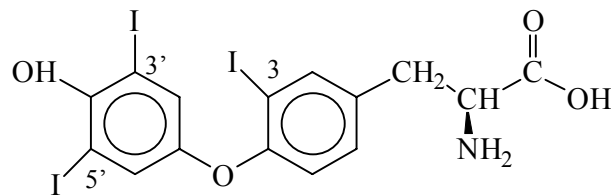


Figuur II.3. De structuurformule van 3,5,3'-L-trijodothyronine (T3).

De L-vorm is de actieve en meest voorkomende vorm. Bij volwassenen ligt de serum T3-concentratie in het bereik van 1.5 – 2.8 nmol/L (0.98 - 1.82 ng/mL).

Het reverse T3 (figuur II.4.) verschilt enkel in de positie van 1 joodatoom van T3, nl. het joodatoom dat zich bij T3 in positie 5 bevindt, vinden we bij rT3 in positie 5' terug.

De serum rT3-concentratie bij volwassen ligt tussen 0.15 en 0.43 nmol/L (0.098 – 0.28 ng/mL).



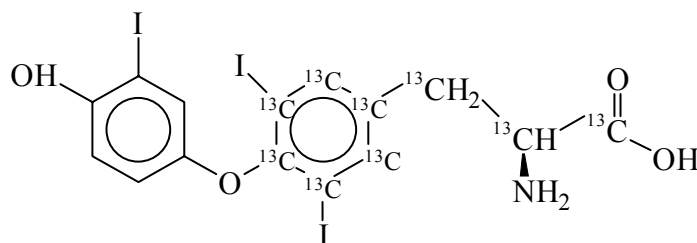
Figuur II.4. De structuurformule van 3,3',5'-reverse L-trijodothyronine (rT3).

II.2.2. Experimenteel gedeelte

II.2.2.1. Standaarden, reagentia en sera

Het primair standaardmateriaal 3,5,3'-trijodo-L-thyronine of β [4-(3-jodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodofenyl]-L-alanine was afkomstig van Henning (Berlijn, Duitsland). Het bezat een zuiverheidsgraad van >99% en bevatte <0.1% T2 en <0.1% T4. Daarvan werd een stockoplossing bereid door 2.5 mg af te wegen op een 10 g analytische balans van Mettler (Greifensee, Zwitserland), type M5 met afleesbaarheid tot op 10^{-6} g, en op te lossen in 10 mL CH_3OH die een paar druppels 1 M HCl bevatte. Na volledig oplossen werd aangelengd tot 100 mL met CH_3OH . De werkoplossingen voor de LC-MS-meetprocedure werden bereid door 1.0 mL van deze stockoplossing te verdunnen met een 0.05 M Na_2HPO_4 buffer (pH 11.6) tot 25 mL, terwijl de werkoplossingen voor de GC-MS-meetprocedure bereid werden door verdunning van 1.0 mL van deze stockoplossing met CH_3OH . De concentratie van de werkoplossingen bedroeg ~ 20 pg/ μL . Deze verdunningen werden alle gravimetrisch gemaakt met een analytische Mettler AT261 Deltarange balans met afleesbaarheid tot op 10^{-5} g.

Het $^{13}\text{C}_9$ -trijodothyronine ($^{13}\text{C}_9$ -T3) of β [4-(3-jodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodo-(1,2,3,4,5,6- $^{13}\text{C}_6$ fenyl)]-L- $^{13}\text{C}_3$ -alanine werd gebruikt als isotopisch gemerkte IS (figuur II.5.). Hij bevatte <0.1% $^{13}\text{C}_0$ -T3 en ongeveer 1.5% $^{13}\text{C}_6$ -T3. De conversie van T4 naar T3 werd nagegaan met $^{13}\text{C}_6$ -thyroxine ($^{13}\text{C}_6$ -T4) of β [4-(3,5-dijodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodo-(1,2,3,4,5,6- $^{13}\text{C}_6$ fenyl)]-L-alanine, dat vooraf met C18 "reversed phase" (RP) HPLC werd opgezuiverd. Deze gemerkte producten werden aangekocht bij de "Service de Chimie et Biochimie Appliquées de la Faculté Polytechnique, Université de Mons, Hainaut".



Figuur II.5. Structuurformule van de gebruikte IS $^{13}\text{C}_9$ -trijodothyronine ($^{13}\text{C}_9$ -T3).

Het 3,3',5'-L-trijodothyronine (rT3) of β [4-(3, 5-dijodo-4-hydroxyfenoxy)-3-jodofenyl]-L-alanine was afkomstig van Sigma (St.-Louis, MO, Verenigde Staten). Trimethylchlorosilaan (TMCS) en heptafluoroboterzuuranhydride (HFBA) waren van Machery & Nagel (Düren, Duitsland). Alle andere chemicaliën hadden de “pro analysi” zuiverheidsgraad en werden bij Merck (Darmstadt, Duitsland) aangekocht, behalve ethylacetaat en acetonitrile, die “super purity” solventen van Romil Chemicals (Shepsed, Groot-Brittannië) waren.

De gelyofiliseerde sera, nl. Bio-Rad Lyphochek[®] Immunoassay Plus Control, die gebruikt werden als interne kwaliteitscontrolestalen en voor de vergelijking tussen de LC-MS- en GC-MS-meetprocedure, werden aangekocht bij Bio-Rad (Irvine, CA, Verenigde Staten). De andere sera werden door Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, Verenigde Staten) ter beschikking gesteld.

II.2.2.2. Apparatuur

Voor de gravimetrische staalname werd tevens de 100 g Mettler balans, type AT261 Delta range gebruikt. De opzuivering van ¹³C₆-T4 en de HPLC-staalopzuivering van de extracten werden uitgevoerd op een systeem dat bestond uit een L-6200-A pomp, een L-4250 UV-VIS detector, die werd ingesteld op 240 nm, en een D-2500 chromato-integrator van Merck (Darmstadt, Duitsland). Als chromatografische kolom werd een C18 Hypersil BDS (150 x 2.1 mm i.d. en partikelgrootte van 5 μm) kolom afkomstig van Alltech (Deerfield, IL, Verenigde Staten) gebruikt.

LC-MS-analyse:

De LC-MS-analysen werden uitgevoerd met een Micromass (Altrincham, Groot-Brittannië) VG Quattro II “triple stage” massaspectrometer, uitgerust met een “megaflow electrospray probe” en een “cross flow counter” elektrode. Deze configuratie was gekoppeld aan een Kontron (Milano, Italië) model 325 HPLC-systeem met een auto-injector model 425. Chromatografie werd uitgevoerd op een C18 Hypersil BDS (150 x 2.1 mm i.d., 5 μm) kolom afkomstig van Alltech (Deerfield, IL, Verenigde Staten). Een Valco splitter (Valco, Zwitserland) werd gebruikt om de solventpiek uit de massaspectrometer te splitsen.

Een LC-MS-analyse werd als volgt uitgevoerd: de opgezuiverde, drooggedampte HPLC-fractie werd gereconstitueerd in 100 μL eluens en 10 μL werd geïnjecteerd op de C18-kolom die isocratisch met CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (75:25:0.1, v/v) werd geëluëerd met een flow van 0.1 mL/min. De massaspectrometrische bepalingen gebeurden onder positieve

electrospray ionisatie (ESI) in de “multiple reaction monitoring” (MRM)-modus. Volgende ionentransities werden geselecteerd om in de MRM-modus te monitoren, $[MH^+]$ naar $[MH^+ - HCOOH]$ bij m/z 652>606 voor T3 en m/z 658>612 voor $^{13}C_6$ -T3 en m/z 661>614 voor $^{13}C_9$ -T3. Bij opname in de scanmodus werd gescand van m/z 50 tot 800 in 2.0 s. De scantijd voor de metingen in de MRM-modus was 0.5 s, zodat minstens 15 keer onder de LC-piek gescand werd. Als collisionegas werd argon gebruikt met een druk van 3×10^{-3} mbar en de collisione-energie werd geoptimaliseerd op 23 eV. De spanning op de cone bedroeg 30 V en de bron-temperatuur werd ingesteld op 175°C.

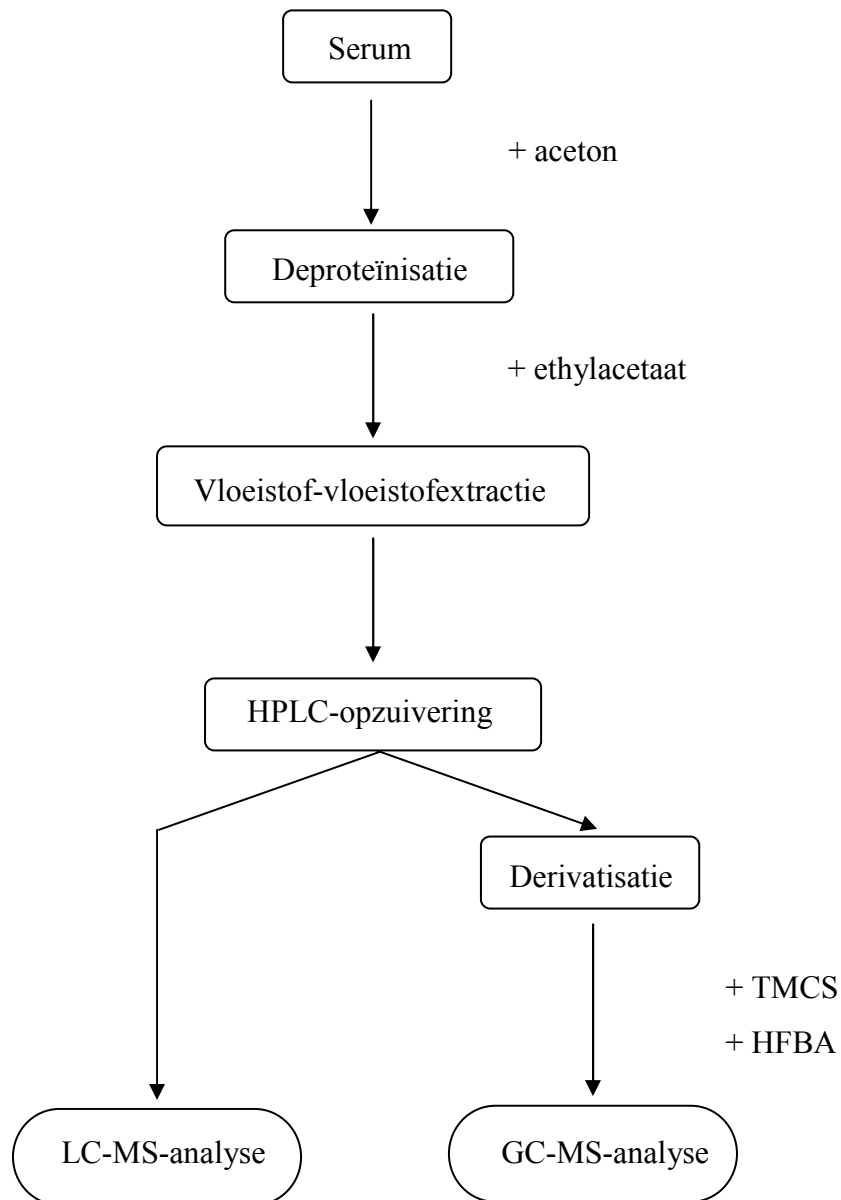
GC-MS-analyse:

De GC-MS-analysen werden uitgevoerd met een Finnigan MAT Incos XL massaspectrometer (San José, CA, Verenigde Staten) gekoppeld met een 5890 Series II GC van Hewlett Packard (Palo Alto, CA, Verenigde Staten). De injector was een “programmable temperature vaporizing” (PTV) injectiesysteem van Gerstel GmbH (Mülheim a.d. Ruhr, Duitsland). De GC-kolom was een 15 m x 0.18 mm i.d. DB-1, d.i. methylsilicone, “fused” silica kolom met een 0.4 μ m filmdikte van J & W Scientific (Folsom, CA, Verenigde Staten). Deze capillaire kolom was rechtstreeks met de massaspectrometer gekoppeld.

Een GC-MS-analyse werd als volgt uitgevoerd: het residu na derivatisatie werd heropgelost in 15 μ L cyclohexaan en 5 μ L werd geïnjecteerd in de PTV bij “purge on” en 70°C; na 0.3 min schakelde de injector naar de “purge off”, en werd hij opgewarmd tot 280°C met een snelheid van 12°C/s; na 1 min bij 280°C en “purge off” werd de injector terug omgeschakeld naar de “purge on” en gekoeld tot de starttemperatuur. Het GC-temperatuurprogramma was als volgt: de starttemperatuur was 220°C (behouden gedurende 1.3 min); zij werd opgevoerd met een snelheid van 20°C/min tot 315°C; deze temperatuur werd gedurende 20 min behouden. De temperatuur van de “transfer body” en “nozzle” waren 310 en 300°C respectievelijk. MS gebeurde steeds onder “electron impact” (EI, 70 eV) ionisatie. Bij opname in de scanmodus werd gescand van m/z 50 tot 950 in 0.57 s, in de “selected ion monitoring” (SIM) modus met de massaspectrometer bij m/z 844.0 - 844.25, 850.0 - 850.25 en 853.0 - 853.25 voor de fragmentionen van de T3-, $^{13}C_6$ -T3- en $^{13}C_9$ -T3-derivaten respectievelijk. De scantijden waren 0.16 s, zodat minstens 15 keer onder de GC-piek gescand werd.

II.2.2.3. Analyseprocedure voor serum T3

De staalvoorbereiding voor de analyse van T3 bestond ten eerste uit deproteïnisatie van het serum met aceton, gevolgd door vloeistof-vloeistofextractie met ethylacetaat en verdere opzuivering met HPLC, zoals schematisch voorgesteld in figuur II.6.



Figuur II.6. Schematische voorstelling van de analyseprocedure voor serum T3.

II.2.2.3.1. Deproteïnisatie en vloeistof-vloeistofextractie

Gedurende de volledige extractie werden de vials omwikkeld met aluminiumfolie om fotodegradatie of de conversie van endogeen T4 naar T3 te voorkomen.

Een volume serum, dat werd berekend zodat ongeveer 4.6 pmol (3 ng) (max. 3 mL) T3 door analyse zou gaan, werd gepipetteerd in 5 mL konische vials. Daaraan werd ook onmiddellijk een aangepaste hoeveelheid $^{13}\text{C}_9$ -T3 als IS toegevoegd om uiteindelijk een 1:1 isotoopratio te verkrijgen gedurende de MS-metingen. Additioneel werd nog eens 150 ng van het HPLC-opgezuiverde $^{13}\text{C}_6$ -T4 in 100 μL HPLC eluens toegevoegd om de eventuele conversie van T4 naar T3 te kunnen waarnemen. Na mengen werden de stalen gedurende 1 uur bij kamertemperatuur gehouden om het mengsel te laten equilibreren. Daarna werd aan elk staal, per mL totaal volume, 60 mg NaCl toegevoegd. Na oplossen van het NaCl werd opnieuw geëquilibreerd gedurende 30 min. Nadien werd het serum gedeproteïniseerd door, per mL totaal volume, 2 mL aceton toe te voegen en te mengen. Het mengsel werd gecentrifugeerd gedurende 15 min bij 1500 x g, gekoeld tot 4°C, en opnieuw 5 min gecentrifugeerd. Het supernatans werd overgebracht naar een andere vial en achtereenvolgens tweemaal gewassen (onder schudden) met cyclohexaan (0.9 mL cyclohexaan per mL staal, met een minimum volume van 0.5 mL) om de lipofiele serumcomponenten te verwijderen. Na centrifugeren werd de cyclohexaanfase verwijderd. Alvorens over te gaan tot de extractie van T3 en IS met ethylacetaat werd 30 μL 30% HCl oplossing toegevoegd aan de stalen om pH 1 te verzekeren. Per mL staal werd met 1.5 mL ethylacetaat geëxtraheerd. Na schudden en centrifugeren werd de ethylacetaatfase zo goed als mogelijk overgebracht in een 1.5 mL reactievial en drooggedampt onder een stikstofstroom bij 50°C. De waterige fase werd voor een tweede maal geëxtraheerd met 1 mL ethylacetaat. Deze tweede ethylacetaatfractie werd bij de vorige gevoegd en eveneens drooggedampt. Aangezien bij deproteïnisatie en vloeistof-vloeistofextractie het endogeen serum T4 werd meegeëxtraheerd, was een bijkomende HPLC-opzuivering vereist om T3 van T4 te isoleren en een verdere fractionatie van het extract te bewerkstelligen.

II.2.2.3.2. HPLC- opzuivering

Na het heroplossen van de ingedampde extractieresidu's in 50 µL HPLC-eluens bestaande uit CH₃OH/H₂O/HCOOH (60:40:0.1 v/v), werden deze geïnjecteerd op de Hypersil BDS C18-kolom. Isocratische elutie met een flow van 0.2 mL/min en UV detectie bij 240 nm werd uitgevoerd. Na de initiële bepaling van het opvangvenster met een equimolair mengsel van standaard (ST) en IS, werd de stabiliteit van het HPLC-systeem opgevolgd door bij de start, op het einde en om de 5 metingen 5 ng norgestrel als “marker” te injecteren. De retentietijden op de C18-kolom waren 6.5, 10.5 en 11.5 min voor T3, rT3 en T4 respectievelijk. Norgestrel elueerde onder dezelfde meetcondities bij 12.5 min. De T3/¹³C₉-T3 fractie en het eventueel aanwezige ¹³C₆-T3, mogelijks ontstaan door de conversie van het toegevoegde ¹³C₆-T4, werden opgevangen in 1.5 mL vials tussen ongeveer 6 en 9 min. Nota: wanneer verschuivingen van de retentietijd van norgestrel werden waargenomen, werd het opvangvenster voor de T3/¹³C₉-T3 fractie op een gelijkaardige manier aangepast. De opgevangen fractie werd bij 50°C drooggedampt onder een stikstofstroom.

De standaarden en de HPLC-fracties van de stalen werden na droogdampen opnieuw heropgelost in 100 µL LC-MS-eluens en op de C18 kolom gebracht voor LC-MS-analyse of gederiviseerd voor GC-MS-analyse, zoals beschreven onder II.2.2.3.3.

II.2.2.3.3. Derivatisatieprocedure

De derivatisatie die de GC-MS-analyse voorafging, gebeurde in 2 stappen, nl. eerst de methylering en dan de heptafluorobutylering.

Methylering met TMCS en CH₃OH: bij het drooggedampt HPLC-residu of het standaardmengsel werd 100 µL CH₃OH en 15 µL TMCS gepipetteerd. De vials werden gesloten en verwarmd tot 60°C gedurende 1 h. Na afkoeling werd de overmaat derivatisatiereagens drooggedampt onder een stikstofstroom bij 50°C.

Heptafluorobutylering: Na droogdampen van het methyleringsreagens werd 30 µL acetonitrile en 30 µL HFBA toegevoegd. Na sluiten van de vials en mengen, werden ze gedurende 1 h bij 60°C verwarmd. Na afkoeling werd het derivatisatiereagens drooggedampt onder een stikstofstroom bij kamertemperatuur, gevolgd door nog bijkomend 20 seconden

droogdampen bij 60°C. Het residu werd heropgelost in 15 µL cyclohexaan en enkele µL werden geïnjecteerd voor GC-MS-analyse.

II.2.2.4. Bepaling van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure

II.2.2.4.1. Specificiteit en meten zonder storing van andere jodothyronines

De staalvoorbereidingsprocedure voor zowel de LC- als GC-MS-meetprocedure werd getest op de afwezigheid van T4, rT3 en T2.

II.2.2.4.2. Detectielimiet

De detectielimiet bij een signaal-tot-ruis- (S/N) verhouding van 3 werd bepaald door injectie op de HPLC-kolom van dalende concentraties T3-standaard. De S/N-verhouding gedurende kwantificatie werd bepaald aan de hand van een serumstaal dat volledig door analyse was gegaan.

II.2.2.4.3. Precisie

Voor de ID-LC-MS/MS- en ID-GC-MS-meetprocedure werd de precisie afgeleid uit de resultaten van de analyse van 3 controlestalen in triplicaat op 3 verschillende dagen. Additioneel werd de precisie van de GC-MS-meetprocedure afgeleid door 10 verschillende serumstalen te meten in duplicaat op 3 verschillende dagen. Ten slotte werd de ontwikkelde meetprocedure toegepast voor de certificatie van een panel van 30 serumstalen. Die werden bepaald in duplicaat gedurende 2 dagen. Uit deze bepalingen werd telkens de totale variatiecoëfficiënt (VC, %) berekend. Deze VC werd getoetst tegen de precisievereisten vooropgesteld voor een kandidaat referentiemeetprocedure voor T4 door een Europese werkgroep (25).

II.2.2.4.4. Nauwkeurigheid/Juistheid

Onderzoek naar de conversie van T4 naar T3

De mogelijke conversie van endogeen T4 naar T3 werd onderzocht met 0.05 M Na₂HPO₄-bufferoplossingen (waaraan een gekende hoeveelheid T3/¹³C₉-T3 en ongeveer 150 ng T4 werd toegevoegd) en met serumstalen. Aan de serumstalen die endogeen T4 en T3 bevatten, werd eveneens 150 ng T4 toegevoegd. Nota: deze T4-oplossing werd vooraf met HPLC van eventueel aanwezig T3 gezuiverd. De metingen werden uitgevoerd in triplicaat, op 3 verschillende dagen, met de GC-MS-meetprocedure.

Om de nauwkeurigheid/juistheid van de meetprocedure te bepalen, werden exact gekende hoeveelheden T3-standaard, respectievelijk 0.519, 1.559 en 8.110 ng, toegevoegd aan 1 mL bufferoplossing 0.05 M Na₂HPO₄ (pH 11.6) aangezien we niet over T3-vrij serum beschikten. In deze experimenten werd geen additioneel T4 toegevoegd aangezien uit voorafgaande experimenten bleek dat er in bufferoplossingen steeds omzetting plaatsvindt van T4 naar T3. Nota: deze omzetting was echter niet representatief voor de omzetting in serum. Vervolgens werd IS toegevoegd en de bufferstalen werden geanalyseerd als onbekenden. Deze analyses werden uitgevoerd in triplicaat, op 3 verschillende dagen, met de ID-GC-MS-meetprocedure.

II.2.2.5. Vergelijking van de ID-LC-MS/MS- met de ID-GC-MS-meetprocedure

Om de ID-LC-MS/MS- met de ID-GC-MS-meetprocedure te vergelijken werden 3 niveaus van commercieel verkrijgbare controlestalen in parallel (maar onafhankelijk) op de 2 verschillende systemen geanalyseerd. De metingen werden uitgevoerd in triplicaat op 3 onafhankelijke dagen.

De gelijkwaardigheid van de 2 meetprocedures werd statistisch getest door het uitvoeren van een gepaarde t-test.

II.2.3. Resultaten en discussie

II.2.3.1. Vereisten voor een referentiemeetprocedure

De ID-LC-MS/MS- en ID-GC-MS-meetprocedure werden beiden ontwikkeld en geoptimaliseerd om te voldoen aan de analytische vereisten van een referentiemeetprocedure nl. voldoende gevoeligheid, goede specificiteit, nauwkeurigheid/juistheid en voldoende precisie. Algemeen zijn hiervoor de kalibratie, het gebruik van ID, het meetprotocol, de staalopzuivering en de chromatografische en massaspectrometrische condities heel belangrijk.

II.2.3.1.1. Kalibratie

De bereiding en staalname van de standaardoplossingen voor de kalibratie gebeurden gravimetrisch, waarbij rekening werd gehouden met de dichtheid van het oplosmiddel, uitgaande van voldoende zuiver standaardmateriaal (>99%). Normaliter zou voor een referentiemeetprocedure een internationaal erkende standaard gebruikt moeten worden. Aangezien deze niet voorhanden was, werd een ander standaardmateriaal met hoge zuiverheid gebruikt. Er werden steeds 3 verschillende standaardstockoplossingen gemaakt. Deze werden vóór gebruik met ID-GC-MS of ID-LC-MS t.o.v. elkaar gecontroleerd (n=6 van elke standaardoplossing). De onderlinge afwijking van de standaarden mocht maximum 1% bedragen. Daarna werden alle standaardoplossingen in bruine flesjes afgevuld en bewaard bij -20°C. Elk flesje werd verworpen nadat het maximaal 5 keer geopend werd.

II.2.3.1.2. Isotoopdilutie

Een belangrijk aspect met betrekking tot kalibratie is de keuze van een geschikte IS. In de kwantitatieve MS is de intensiteit van het signaal niet alleen afhankelijk van de hoeveelheid van de component aanwezig in het staal maar eveneens van een aantal instrumentele variabelen (bvb. ionisatierendement). Het is echter moeilijk om deze instrumentele parameters gedurende de volledige analyse constant te houden. Daarom wordt bij kwantitatieve MS de ionenstroom van de component die men wenst te bepalen, relatief gemeten t.o.v. deze geproduceerd door een IS, die vóór de meting aan het te analyseren staal werd toegevoegd. Deze IS compenseert in ideale omstandigheden ook voor elk verlies tijdens de staal-

voorbereiding, verlies door adsorptiefenomenen of onvolledige derivatisatie. Dit wijst er op dat de IS in grote mate bepalend is voor de precisie en nauwkeurigheid van de methode. Voor een referentiemeetprocedure wordt de voorkeur gegeven aan het gebruik van een met stabiele isotopen gemerkte IS met een relatieve molecuulmassa die minstens 3 massa-eenheden hoger ligt. Deze IS heeft nagenoeg identieke fysicochemische eigenschappen als de ongemerkte component. Wij hebben ID uitgevoerd met isotopisch gemerkt T3, nl. $^{13}\text{C}_9\text{-T3}$. De hoeveelheid IS werd gravimetrisch aan de stalen en standaarden toegevoegd. Aangezien de resultaten werden berekend door gebruik te maken van éénpunskalibratie (24), werd zoveel mogelijk gestreefd om een MS-ratio van 1:1 te verkrijgen. Daarbij werd rekening gehouden met de kleine hoeveelheid niet-gemerkte T3 die in de IS-oplossing aanwezig was (nl. 0.08%). Gezien de hoge graad van markeren van de IS met het ^{13}C -isotoop, was er geen aandeel van T3 op de m/z -waarde van $^{13}\text{C}_9\text{-T3}$.

II.2.3.1.3. Meetprotocol

Het meetprotocol was zodanig dat steeds begonnen werd met 3 injecties van kalibratoren gevolgd door 4 serumstalen, 3 kalibratoren, enz. Dit afwisselend injecteren van standaarden en onbekenden werd gedaan om fouten, door eventuele drift van het toestel, op te merken en daaruit voortvloeiende fouten te minimaliseren. Ten slotte werden de serumstalen voor de bepaling van de referentiemeetprocedurewaarde in zesvoud gemeten, d.w.z. in duplicaat op 3 verschillende dagen. Elke dag van analyse werden 3 verschillende standaardoplossingen gebruikt.

II.2.3.1.4. Interne kwaliteitscontrole

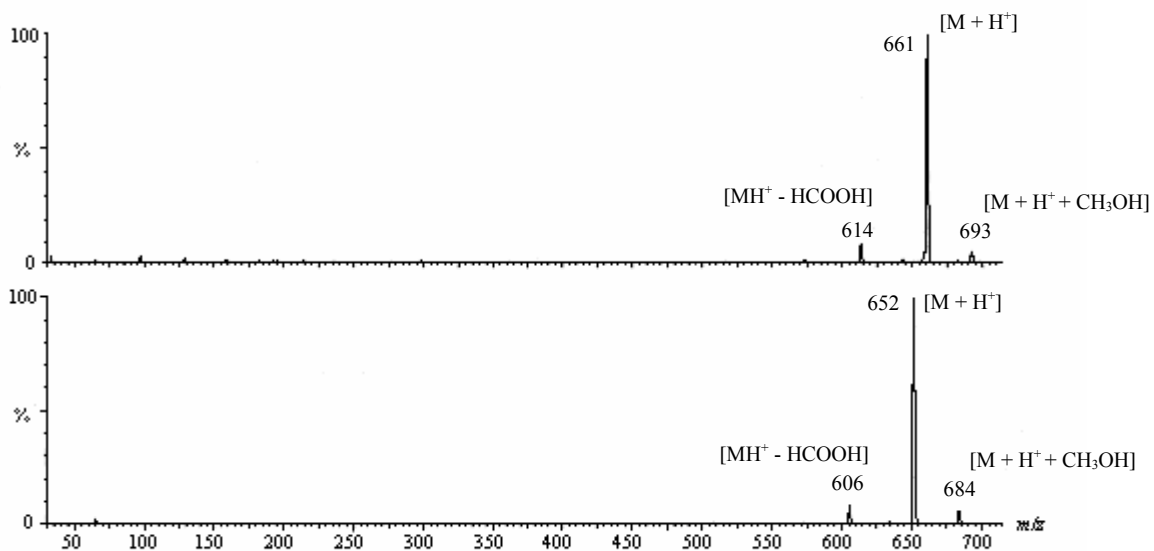
Interne kwaliteitscontrole of IQC is ook een heel belangrijk aspect om de hoge analytische eisen gesteld aan een referentiemeetprocedure, te garanderen. Daarom werd elke meetdag ook een controlestaal meegeanalyseerd in duplicaat. Normaliter is dit een gecertificeerd referentiemateriaal (zie hoofdstuk I.1.) of een ander controlemateriaal dat voordien met verschillende referentiemeetprocedures gemeten werd. Gezien het feit dat zo'n controlemateriaal voor T3 niet beschikbaar was, werd gekozen om een stabiel, gelyofiliseerd serumstaal, nl. "Bio-Rad Lyphochek[®] Immunoassay Plus Control", te gebruiken. Wij bepaalden zelf vooraf de T3-doelwaarde onder rigoureuze meetcondities gedurende 7 dagen. Gebruik makend van dergelijk controlestaal voor alle daaropvolgende metingen, gebruikten

wij als aanvaardbaarheidsregel dat een meetdag pas aanvaard werd wanneer de afwijking tussen het resultaat van 1 der metingen van de IQC en de doelwaarde kleiner was dan 3.5% en het verschil tussen de duplicaten niet meer dan 2.5% bedroeg. Tenslotte dient vermeld te worden dat bij analyse van reële serumstalen volgens bovenvermeld protocol (n=6), er bovenop de IQC-regels, over gewaakt werd dat de VC maximaal 2.0% bedroeg (25).

II.2.3.2. Bespreking van de meetcondities

II.2.3.2.1. MS-condities in de LC-MS-metprocedure

De LC-MS-metingen werden uitgevoerd onder positieve electrospray ionisatie in de MRM-modus. De instelling van de conespanning (30 V) werd zo gekozen dat de kans op “in-source” fragmentatie beperkt bleef. Collisie geactiveerde dissociatie (CAD) gebeurde onder milde condities (collisie-energie 23 eV) zodat het moederion het voornaamste ion in het spectrum was. Figuur II.7. stelt het spectrum voor waarin naast de pseudomoleculaire ionen m/z 652 (T3) en m/z 661 ($^{13}\text{C}_9$ -T3) ook de $[\text{MH}^+ + \text{CH}_3\text{OH}]$ adducten (methanoladduct) bij m/z 684 en 693 duidelijk zichtbaar zijn. Daarnaast zien we ook 2 fragmenten $[\text{MH}^+ - \text{HCOOH}]$ bij respectievelijk m/z 606 en 614. Als basis voor MRM werden volgende transitie gevolgd: m/z 652 > 606 voor T3 en m/z 661 > 614 voor $^{13}\text{C}_9$ -T3.

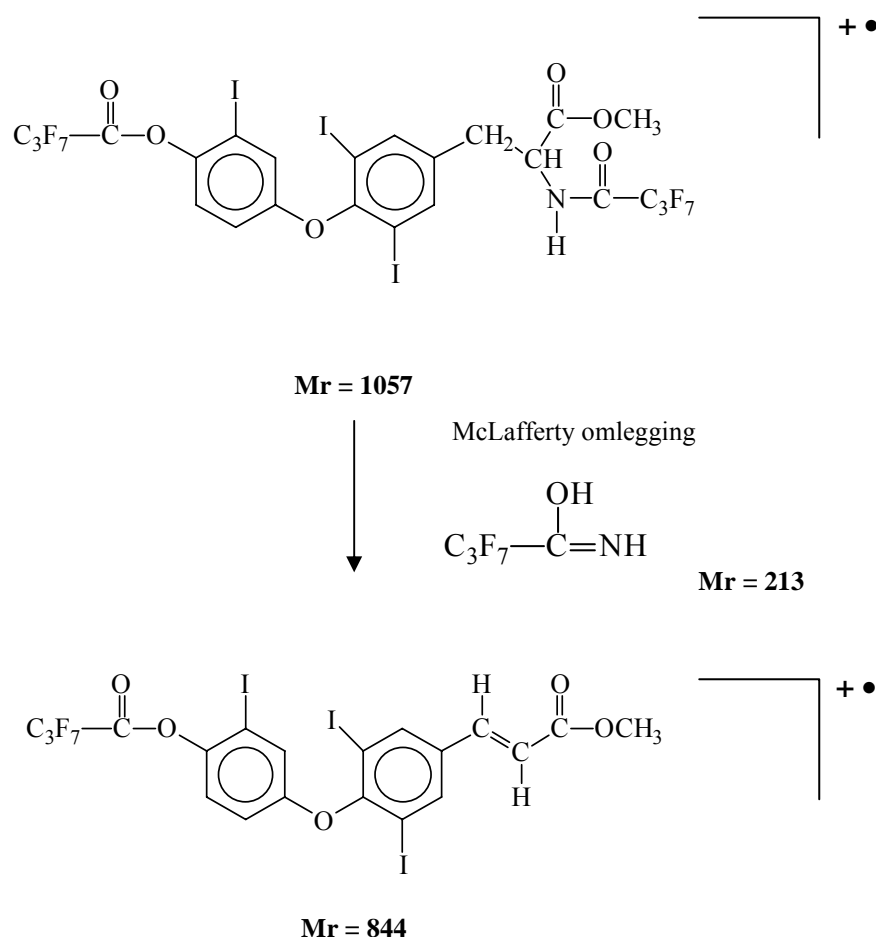


Figuur II.7. Positief electrospray ionisatie massaspectrum van T3 en $^{13}\text{C}_9$ -T3.

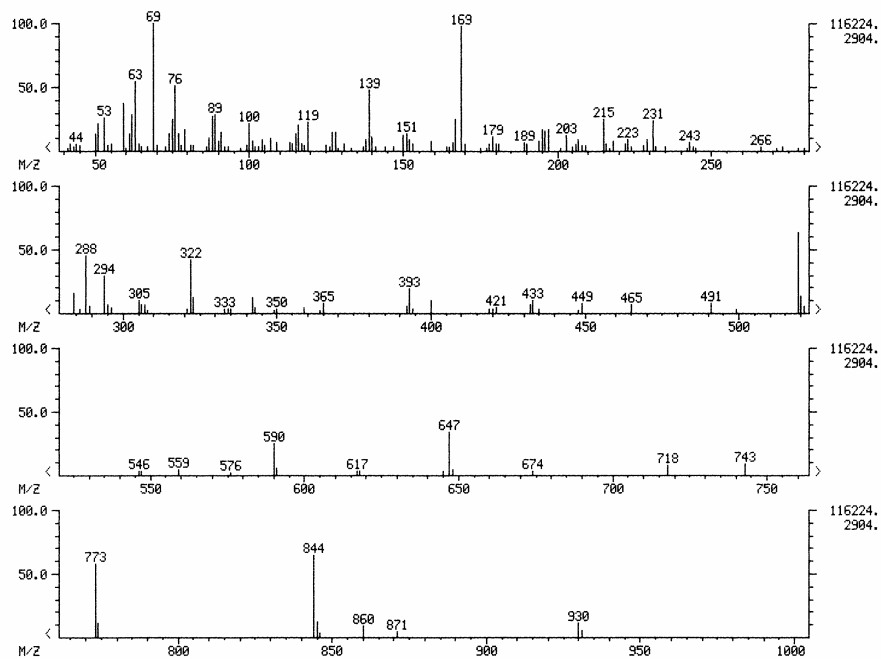
II.2.3.2.2. MS-condities in de GC-MS-meetprocedure

Voor de GC-MS-analyse van T3 en $^{13}\text{C}_9$ -T3 werden de *N,O*-(di-HFB)-methylesters gevormd. De moleculaire ionen bij respectievelijk m/z 1057 en 1066 reikten echter buiten het massabereik (max. 1000 Da) van de INCOS XL MS. Voor kwantificatie in de SIM-modus werd gekozen om het $[\text{M}-213]^+$ of $[\text{M}-\text{C}_3\text{F}_7\text{CONH}_2]^+$ fragment bij m/z 844 (voor T3) en 853 (voor $^{13}\text{C}_9$ -T3) en gevormd via een McLafferty omlegging, te volgen (figuur II.8.). De verkregen elektronimpact (70 eV) massaspectra zoals voorgesteld in figuur II.9. en II.10., komen overeen met deze die eerder gepubliceerd werden door Petersen et al. (20).

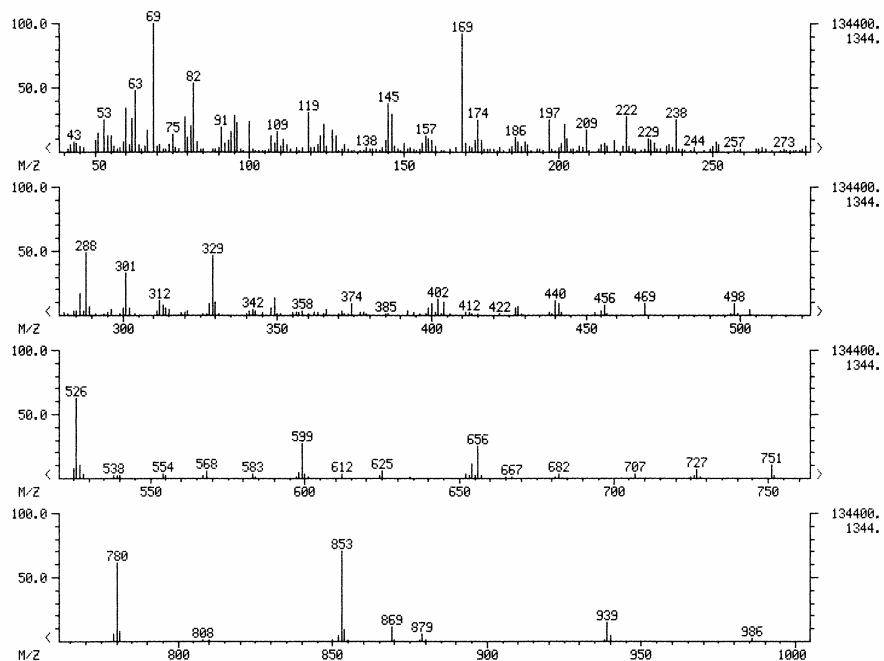
In figuur II.11. worden de voornaamste fragmentionen uit het massaspectrum van het *N,O*-(di-HFB)-methylester van T3 verklaard.



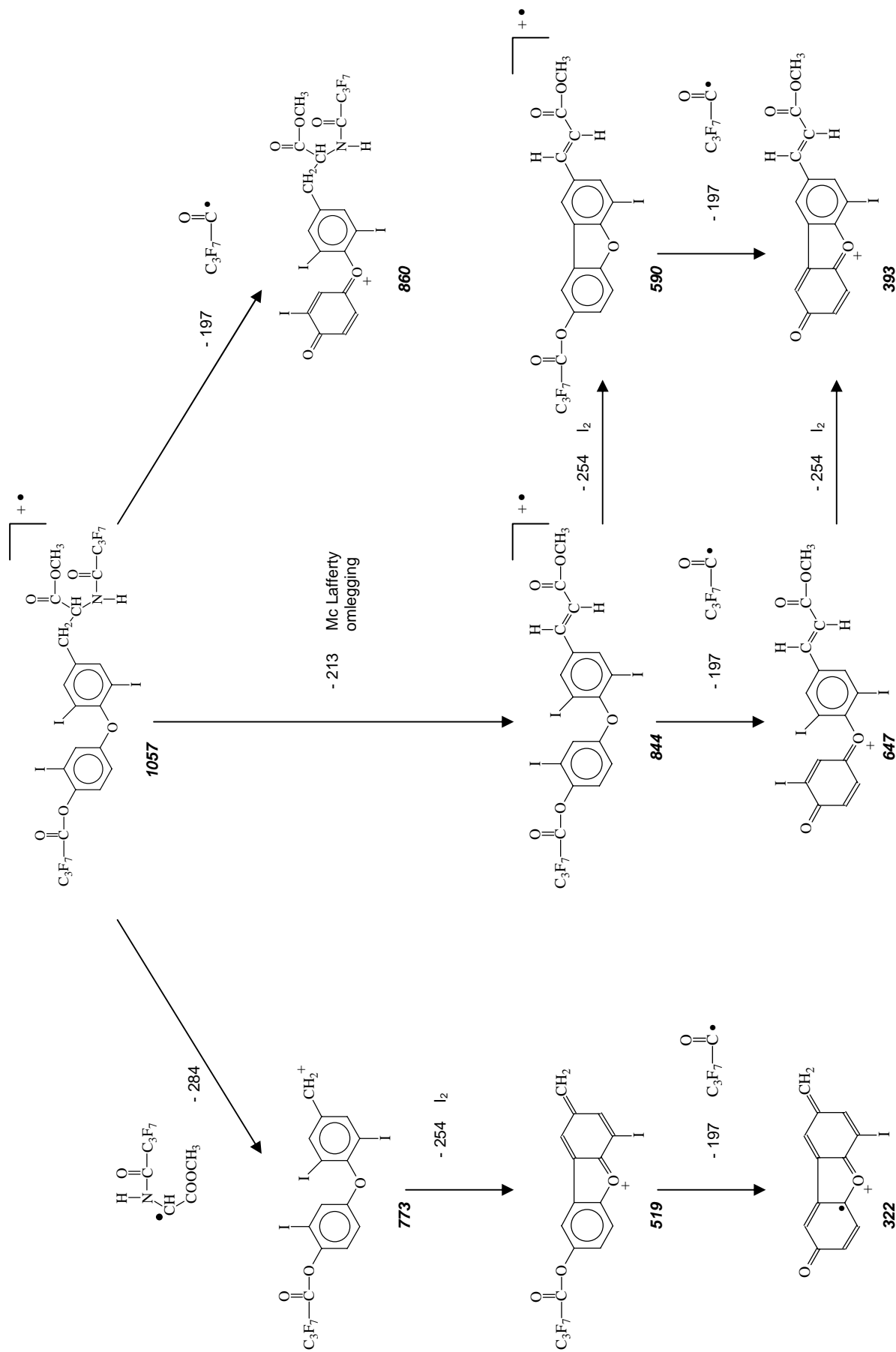
Figuur II.8. Voorstelling van het $[\text{M}-213]^+$ of $[\text{M}-\text{C}_3\text{F}_7\text{CONH}_2]^+$ fragment bij m/z 844 dat via een McLafferty omlegging wordt gevormd.



Figuur II.9. Electron impact mass spectrum van het *N,O*-(di-HFB)-methylesterderivaat van T3 (m/z 844). Nota: het molecuulair ion m/z 1057 viel buiten het massabereik van de INCOS XL MS.



Figuur II.10. Electron impact mass spectrum van het *N,O*-(di-HFB)-methylesterderivaat van $^{13}\text{C}_9$ -T3 (m/z 853). Nota: het molecuulair ion m/z 1066 viel buiten het massabereik van de gebruikte MS.



Figuur II.11. Voorstelling van de voornaamste fragmenten in het massaspectrum van het *N,O*-(di-HFB)-methyl ester van T3.

II.2.3.3. Bespreking van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure

II.2.3.3.1. Specificiteit en meten zonder storing van andere jodothyronines

Voor de GC- en LC-MS-meetprocedure werd de specificiteit van de meting voor het grootste deel verzekerd door het theoretisch meetprincipe. Inderdaad, MS laat monitoren van de doelsubstanties, in casu T3 en $^{13}\text{C}_9\text{-T3}$, al dan niet gederivatiseerd, bij specifieke m/z -waarden toe. Zoals voordien beschreven, werden in de GC-MS-meetprocedure de ionen bij m/z 844 van het *N,O*-(di-HFB)-methylester van T3 (en m/z 853 voor het $^{13}\text{C}_9\text{-T3}$ -derivaat) gemeten. Dit zijn m/z -waarden in een relatief hoog massabereik, tenminste voor kleine organische moleculen, wat de selectiviteit van de meting ten goede kwam.

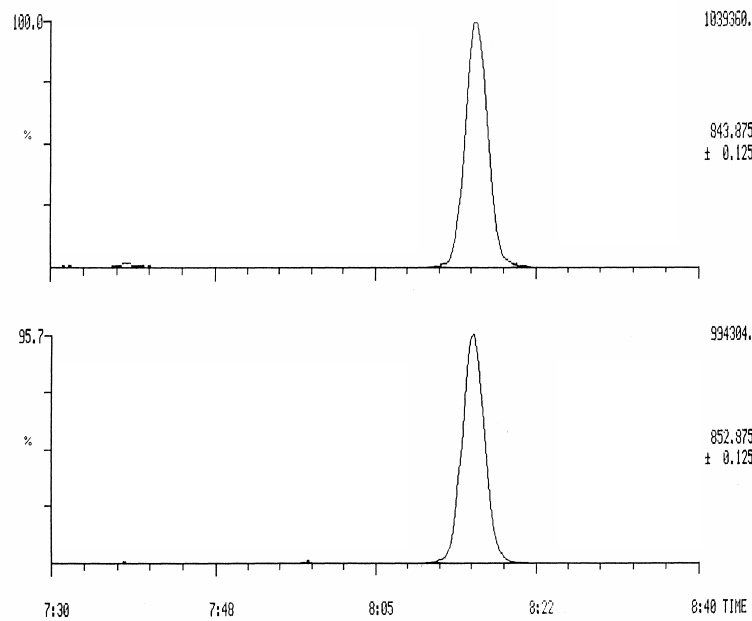
Voor de LC-MS-meetprocedure werd MS-detectie uitgevoerd in de MRM-modus wat op zich een hogere selectiviteit dan SIM verzekert. De ionen m/z 652>606 werden geselecteerd om de selectieve ionentransitie van T3 naar $[\text{MH}^+\text{-HCOOH}]$ te monitoren (en m/z 661>614 voor $^{13}\text{C}_9\text{-T3}$).

Niettegenstaande de aldus gewaarborgde specificiteit van de MS-detectie, vonden wij het toch nodig er bij de staalopzuivering voor te zorgen dat T3 van T4, rT3 en andere jodothyronines zoals T2 werd gescheiden. Aanwezigheid van T4 en rT3 in het extractieresidu zou, zoals voordien uitgelegd, reële meetfouten veroorzaken, wat in principe door de specificiteit van de massaspectrometrische detectie uitgesloten is. Strict genomen diende het effect van de aanwezigheid van T2 niet onderzocht te worden. De reden waarom het toch werd ingesloten, lag in het feit dat ook immunosystemen op storing door T2 worden getest.

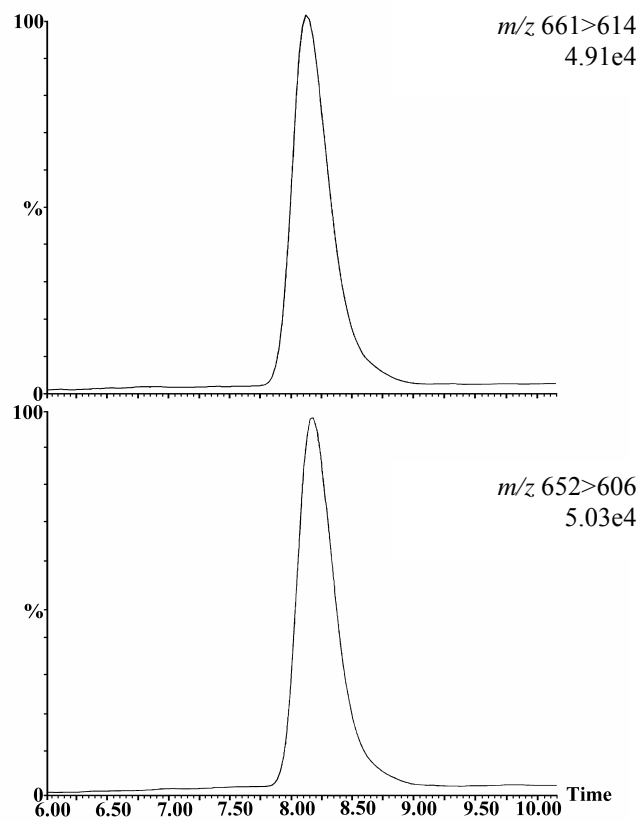
Zoals hoger beschreven, bevatte de staalvoorbereiding een HPLC-opzuiveringsstap. De HPLC-condities werden inderdaad zodanig gekozen dat T3 gescheiden werd van T4, rT3 en T2. De retentietijden, zoals vooraf bepaald, waren respectievelijk ~3.6 min voor T2, ~6.5 min voor T3, ~10.5 min voor rT3 en ~11.5 min voor T4, wat een voldoende scheiding tussen de componenten aantoont. Door de HPLC-fractie tussen 6 en 9 min te collecteren, kon dus de afwezigheid van T4, rT3 en T2 in het collectaat gewaarborgd worden.

Voor de analyse van serumstalen met ID-GC-MS en ID-LC-MS/MS werden telkens interferentievrije chromatogrammen verkregen. Figuur II.12 stelt een representatief ionenchromatogram voor, verkregen na ID-GC-MS-analyse van een serumstaal dat ~1 ng/mL T3 bevatte. In figuur II.13 wordt een representatief ionenchromatogram voorgesteld, verkregen na ID-LC-MS/MS-analyse van een serumstaal dat ~0.6 ng/mL T3 bevatte. Deze chromato-

grammen zijn op hun beurt een indirect bewijs van de specificiteit van de meetprocedure zonder storing van andere endogene substanties.



Figuur II.12. Representatief ionenchromatogram bij m/z 844 en 853 zoals verkregen na ID-GC-MS-analyse van een serumstaal dat ongeveer ~ 1 ng/mL T3 bevatte.



Figuur II.13. Representatief ionenchromatogram bij m/z 661>614 en m/z 652>606 zoals verkregen na ID-LC-MS/MS-analyse van een serumstaal dat ongeveer ~ 0.6 ng/mL T3 bevatte.

II.2.3.3.2. Detectielimiet

De detectielimiet werd getest met zuivere standaarden en lag, bij een S/N-verhouding van 3, op 18 pg voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure en op 100 pg voor de ID-GC-MS-meetprocedure. Deze limiet is ruimschoots voldoende aangezien de serum T3-concentratie ~1 ng/mL bedraagt.

Voor kwantificatie met ID-LC-MS/MS werd ongeveer 215 pg T3 geïnjecteerd, wat een S/N-verhouding van ~50 gaf. Voor ID-GC-MS-analyse werd ongeveer 900 pg T3 geïnjecteerd, wat resulteerde in een S/N-verhouding van ~275. Deze S/N-verhoudingen verzekerden ons een betrouwbare kwantificatie (na integratie) van de GC- en LC-MS-chromatogrammen.

II.2.3.3.3. Precisie

De precisie, uitgedrukt als imprecisie, voor de ID-LC-MS/MS- en ID-GC-MS-meetprocedure werd afgeleid uit de resultaten na analyse van 3 serumstalen in triplicaat op 3 verschillende dagen (n=9) zoals weergegeven in tabel II.5. en II.6. (zie verder II.2.3.4, zoals gebruikt voor de vergelijking van de ID-LC-MS/MS- en ID-GC-MS-meetprocedure).

Voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure varieerde de imprecisie (uitgedrukt als totale VC, %) voor de 3 serumstalen tussen 0.7 en 1.0%, voor de ID-GC-MS-meetprocedure tussen 0.8 en 1.1%.

Additioneel werd de imprecisie van de ID-GC-MS-meetprocedure bepaald aan de hand van de resultaten van 10 serumstalen (met T3-concentratie tussen ~0.6 en 7.3 ng/mL) na analyse in duplicaat op 3 verschillende dagen. De resultaten worden voorgesteld in tabel II.2.

In tabel II.3. worden de resultaten en geassocieerde imprecisie voorgesteld van 30 serumstalen (met T3-concentratie tussen ~0.6 en 9.1 ng/mL) na ID-GC-MS-analyse in duplicaat op 2 verschillende dagen (n=4).

Tabel II.2. Imprecisie van de ID-GC-MS-metresultaten voor de bepaling van T3 in 10 serumstalen (n=6).

Staal	Gemiddelde (ng/mL)	VC (%) (n=6)
1	0.5763	1.0
2	0.6880	1.3
3	0.9960	1.3
4	0.9907	1.1
5	0.9785	0.9
6	1.251	0.3
7	2.823	1.3
8	4.609	1.5
9	5.994	1.1
10	7.343	0.8

Uit tabel II.2. volgt dat de VC voor de 6 metingen van de serumstalen met ID-GC-MS tussen 0.3% en 1.5% ligt.

Tenslotte werd de meetprocedure toegepast voor de certificatie van 30 serumstalen (SysRef panel, Scantibodies, Verenigde Staten). Deze stalen zouden gebruikt worden voor de standaardisatie van immunotestsysteem voor T3. De resultaten in tabel II.3. geven een maximale VC van 1.7% weer voor 4 metingen. Op die manier konden wij besluiten dat de imprecisie van onze meetprocedure voldeed aan de vereisten van een VC<2.0% bij (n=6), zoals voorgesteld door een Europese werkgroep voor een kandidaat referentiemeetprocedure voor T4 (25).

Tabel II.3. Imprecisie van de ID-GC-MS-metresultaten voor de bepaling van T3 in 30 serumstalen (n=4).

Staal	Gemiddelde (ng/mL)	VC (%) (n=4)
1	0.7927	1.7
2	0.6838	1.0
3	0.8653	0.6
4	0.8127	1.6
5	1.056	1.0
6	1.022	1.2
7	1.299	0.9
8	1.271	1.7
9	1.698	1.2
10	1.146	1.6
11	0.9281	1.0

12	1.126	1.6
13	1.019	1.4
14	1.575	0.9
15	1.003	1.7
16	1.350	1.7
17	1.360	0.8
18	0.7634	1.1
19	0.8603	1.5
20	1.056	1.0
21	1.252	1.2
22	0.9256	1.8
23	0.6045	1.0
24	1.096	0.5
25	1.234	1.7
26	0.6503	0.8
27	0.9953	0.8
28	1.031	1.1
29	0.8382	1.2
30	1.120	1.3

II.2.3.3.4. Nauwkeurigheid/Juistheid

Onderzoek naar de conversie van T4 naar T3

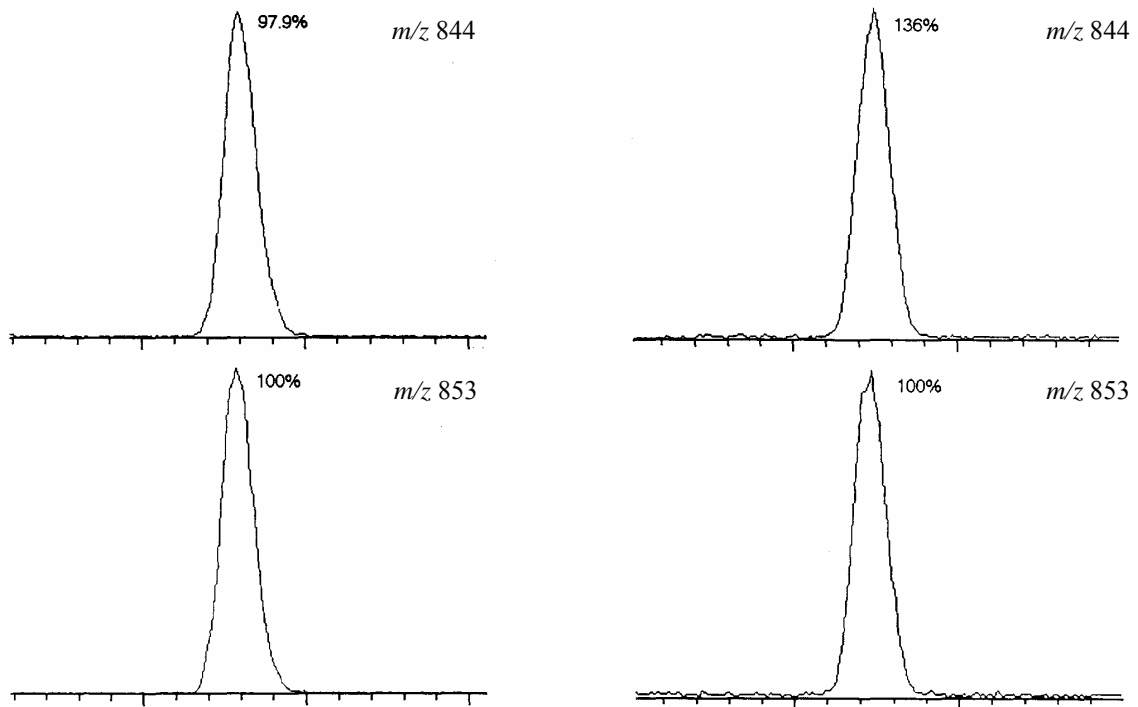
Nauwkeurige meetresultaten zijn een basisvereiste voor een referentiemeetprocedure. Naast de reeds beschreven voorzorgen in dit verband, inherent aan een referentiemeetprocedure (bvb. qua kalibratie, ID, gravimetrische controle van belangrijke volumetrische stappen, specificiteit van detectie enz....), was het voor een referentiemeetprocedure voor serum T3 ook van cruciaal belang de mogelijke conversie van endogeen T4 naar T3 te controleren. Inderdaad, deze conversie kan gebeuren door chemische afbraak of degradatie onder invloed van het licht gedurende extractie of derivatisatie in de GC-MS-analyse.

Om fotodegradatie zoveel mogelijk tegen te gaan, werd de extractie uitgevoerd in door aluminiumfolie omwikkelde vials, om afscherming van het UV-licht te verzekeren. Tijdens deze extractieprocedure was het zeker dat T4 meegeëxtraheerd werd uit het serum. Om een mogelijke omzetting te vermijden gedurende het vervolg van de analyse, werd T3, zoals reeds hoger vermeld, geïsoleerd uit het extractieresidu door een HPLC-opzuiveringsstap.

Om nu de omzetting in het analysegedeelte vóór de HPLC-fractionatie te controleren, werd eerst met bufferoplossingen gewerkt. Inderdaad, aan een oplossing bestaande uit 0.05 M Na₂HPO₄ (pH 11.6) werden gekende hoeveelheden T3 en T4 toegevoegd (ongeveer 150 ng T4 per mL bufferoplossing). Daarenboven werd deze T4-oplossing, die gebruikt werd voor de toevoeging, vooraf door HPLC gezuiverd van mogelijks aanwezig T3. Deze bufferoplossingen werden zoals stalen geanalyseerd.

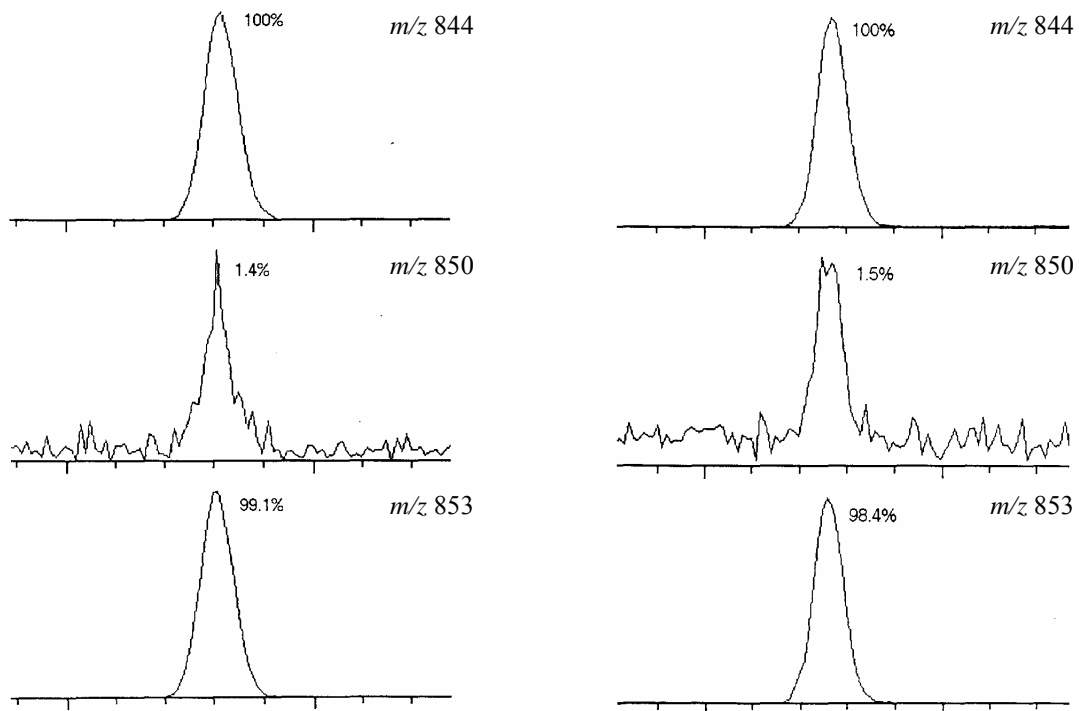
De terugvindingspercentages uit dit experiment varieerden tussen 105 en 160% (n=9). Dit wees er duidelijk op dat de genomen maatregelen onvoldoende waren om de conversie van T4 naar T3 in bufferoplossingen tegen te gaan (figuur II.14.).

Daarom beslisten wij de conversie ook in serumstalen, die endogeen T3 en T4 bevatten, uit te testen. Ondanks toevoeging van een extra hoeveelheid T4 (ongeveer 150 ng per mL serum) werden toch steeds reproduceerbare resultaten voor T3 verkregen. De VC, voor triplicaat analyse op 3 verschillende dagen, was kleiner dan 2%. Dit wees er op, naar onze mening, dat de serummatrix waarschijnlijk een beschermende werking heeft tegenover de omzetting van T4. Het was weliswaar niet mogelijk deze hypothese te bewijzen daar we niet beschikten over T3-vrij serum. Daarom beslisten wij de controle op conversie als vast onderdeel in onze referentiemeetprocedure in te bouwen. Aan elk staal werd dus isotopisch gemerkt T4, namelijk ¹³C₆-T4 (150 ng per serumstaal), toegevoegd als marker. We gingen er van uit dat ¹³C₆-T4 zich op een identieke manier zou gedragen als het endogene T4 aanwezig in het serumstaal. De mogelijke conversie van ¹³C₆-T4 naar ¹³C₆-T3 werd dan ook telkens massaspectrometrisch gevolgd (*m/z* 658>612 voor ID-LC-MS/MS en *m/z* 850 voor ID-GC-MS). Uiteraard was het nodig de ¹³C₆-T4-oplossing voorafgaandelijk aan HPLC te onderwerpen om eventueel aanwezig ¹³C₆-T3 te verwijderen. Er werd geen enkele maal conversie naar T3 vastgesteld, wat volgens ons op een indirecte manier bovengemaakte hypothese van een beschermend effect door de serummatrix ondersteunde.



Figuur II.14. GC-MS-ionenchromatogrammen voor het T3 (m/z 844) en $^{13}\text{C}_9$ -T3 derivaat (m/z 853) om de degradatie van T4 naar T3 in een behandeld fosfaatbufferstaal voor te stellen.
Links: Een behandeld bufferstaal (3 mL) waaraan ongeveer 3 ng T3 en een gelijke hoeveelheid IS, maar geen T4 werd aan toegevoegd. De isotoopratio bedroeg: 0.979:1.
Rechts: een identisch bufferstaal waaraan 150 ng T4 werd toegevoegd. De isotoopratio bedroeg 1.36:1.

In figuur II.15. is het GC-MS-ionenchromatogram voorgesteld van een behandeld serumstaal (1 mL) waaraan 150 ng $^{13}\text{C}_6$ -T4 werd toegevoegd. Het signaal voor het ion m/z 850 heeft dezelfde grootte als in een kalibratiemengsel waaraan geen $^{13}\text{C}_6$ -T4 werd toegevoegd. Het signaal dat toch zichtbaar is bij m/z 850 is afkomstig van de IS $^{13}\text{C}_9$ -T3, die als onzuiverheid een bepaalde hoeveelheid $^{13}\text{C}_6$ -T3 bevatte (~1.5%). Gezien dit feit was het noodzakelijk de ratio $^{13}\text{C}_6$ -T3/ $^{13}\text{C}_9$ -T3, zoals gemeten in de kalibratiemengsels, als referentie te nemen om de conversie in serumstalen te beoordelen.



Figuur II.15. GC-MS-ionenchromatogram waarin de afwezigheid van T4-afkomstig T3 wordt voorgesteld in een behandeld serumstaal.
Links: T3/¹³C₉-T3 kalibratiemengsel zonder toevoeging van ¹³C₆-T4. Het signaal bij m/z 850 stelt de hoeveelheid ¹³C₆-T3 voor aanwezig als onzuiverheid in de IS.
Rechts: Een behandeld serumstaal waaraan naast ¹³C₉-T3 IS ook ongeveer 150 ng ¹³C₆-T4 werd toegevoegd. Het signaal verkregen bij m/z 850 heeft dezelfde verhouding t.o.v. dit bij m/z 853, zoals verkregen in het kalibratiemengsel.

Nauwkeurigheid/Juistheid

Nadat we konden bewijzen dat de conversie van T4 naar T3 niet bestaande was of ten minste te controleren was, vonden wij het zinvol over te stappen naar de gebruikelijke procedure om de nauwkeurigheid/juistheid van een referentiemeetprocedure te testen, met name via analyse van gecertificeerde referentiecontrolematerialen. Helaas waren die momenteel niet beschikbaar voor T3 (nota: zoals in de inleiding tot dit hoofdstuk vermeld, gewoonweg omdat er nog geen referentiemeetprocedure beschikbaar was) en kon de nauwkeurigheid/juistheid op die manier niet getest worden. Nota: in het kader van een Europees project, dat de volgende 2 jaren in ons laboratorium loopt i.v.m. de ontwikkeling van referentiemeetprocedures voor thyroïdhormonen, wordt momenteel gewerkt aan de certificatie van controlematerialen in een interlaboratoriastudie.

De nauwkeurigheid/juistheid van de meetprocedure werd bepaald door aan bufferoplossingen, aangezien we niet over T3-vrij serum beschikten, T3 toe te voegen. De analyses werden met ID-LC-MS/MS uitgevoerd. De confidentielimieten (CI) waren steeds vrij smal (max. $\pm 1.5\%$) en omsloten elk de doelwaarde (=100% terugvinding), wat wijst op een hoge nauwkeurigheid/juistheid (tabel II.4.). De nauwkeurigheid/juistheid voor de ID-GC-MS-meetprocedure werd indirect afgeleid door de vergelijking met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure (zie II.2.3.4.).

Tabel II.4. Bepaling van de nauwkeurigheid/juistheid van de ID-LC-MS/MS-meetprocedure voor T3.

T3-concentratie (ng/mL)	Juistheid \pm 95% CI (%)	n
0.519	99.7 \pm 1.2	9
1.559	100.5 \pm 1.1	9
8.110	101.2 \pm 1.5	9

De juistheid konden we ook afleiden uit de afwijking van de analyseresultaten van de dagelijkse IQC bij de analyse van 30 serumstalen t.o.v. de toegewezen doelwaarde. Deze bedroeg in het gemiddeld 0.64%. Dit wees op een hoge juistheid en hiermee werd voldaan aan de eisen, gesteld door een Europese werkgroep voor een referentiemeetprocedure voor T4, nl. een maximale systematische afwijking van 0.9%.

II.2.3.4. Vergelijking van de ID-LC-MS/MS- met de ID-GC-MS-meetprocedure

De ID-LC-MS/MS- en de ID-GC-MS-meetprocedure werden met elkaar vergeleken door 3 niveaus van commercieel verkrijgbare gelyofiliseerde serumstalen op beide instrumenten in parallel, maar totaal onafhankelijk, te bepalen. Tabellen II.5. en II.6. geven een overzicht van de verkregen resultaten.

Tabel II.5. Overzicht van de resultaten, per dag, voor de onafhankelijke meting van T3 in 3 gelyofiliseerde serumstalen met ID-LC-MS/MS.

Staal		A	B	C	Gemiddelde	SD	VC
		(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(%)
1	Dag 1	0.6450	0.6465	0.6470	0.6462	0.0010	0.16
	Dag 2	0.6304	0.6361	0.6328	0.6331	0.0029	0.46
	Dag 3	0.6392	0.6441	0.6343	0.6392	0.0049	0.77
	<i>“Overall” gemiddelde:</i>				<i>0.6395</i>		
2	Dag 1	1.110	1.125	1.121	1.119	0.0078	0.69
	Dag 2	1.113	1.139	1.143	1.132	0.0163	1.44
	Dag 3	1.129	1.127	1.126	1.127	0.0015	0.14
	<i>“Overall” gemiddelde:</i>				<i>1.126</i>		
3	Dag 1	2.452	2.432	2.436	2.440	0.0106	0.43
	Dag 2	2.462	2.429	2.407	2.433	0.0277	1.14
	Dag 3	2.456	2.433	2.433	2.441	0.0133	0.54
	<i>“Overall” gemiddelde:</i>				<i>2.438</i>		

Tabel II.6. Overzicht van de resultaten, per dag, voor de onafhankelijke meting van T3 in 3 gelyofiliseerde serumstalen met ID-GC-MS.

Staal		A	B	C	Gemiddelde	SD	VC
		(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(%)
1	Dag 1	0.6353	0.6451	0.6369	0.6391	0.0053	0.82
	Dag 2	0.6404	0.6483	0.6358	0.6415	0.0063	0.99
	Dag 3	0.6280	0.6254	0.6329	0.6288	0.0038	0.61
	<i>“Overall” gemiddelde:</i>				<i>0.6365</i>		
2	Dag 1	1.140	1.150	1.136	1.142	0.0072	0.63
	Dag 2	1.122	1.125	1.108	1.118	0.0091	0.81
	Dag 3	1.125	1.123	1.132	1.127	0.0047	0.42
	<i>“Overall” gemiddelde:</i>				<i>1.129</i>		
3	Dag 1	2.456	2.426	2.445	2.442	0.0152	0.62
	Dag 2	2.421	2.395	2.403	2.406	0.0133	0.55
	Dag 3	2.413	2.430	2.434	2.426	0.0112	0.46
	<i>“Overall” gemiddelde:</i>				<i>2.425</i>		

Tabel II.7. Samenvatting van de resultaten voor de onafhankelijke meting van T3 in 3 gelyofiliseerde serumstalen met ID-LC-MS/MS (A) en ID-GC-MS (B).

Staal	T3-concentratie				
	ID-LC-MS/MS (A)		ID-GC-MS (B)		(B-A) (%)
	Gemiddelde (ng/mL)	VC (%)	Gemiddelde (ng/mL)	VC (%)	
1	0.6395	1.0	0.6365	1.0	- 0.47
2	1.126	1.0	1.129	1.1	+ 0.26
3	2.438	0.7	2.425	0.8	- 0.54

Uit de samenvatting van de resultaten in tabel II.7. blijkt dat beide meetprocedures maximaal 0.54% van elkaar afwijken. Hieruit kunnen we reeds besluiten dat er een sterke gelijkwaardigheid van de ID-LC-MS/MS- en ID-GC-MS-meetprocedure is. Om de gelijkwaardigheid van beide meetprocedures ook statistisch aan te tonen, werd een gepaarde t-test voor het gemiddelde uitgevoerd met een significantieniveau van $\alpha = 5\%$.

Volgende waarden voor t_{exp} werden verkregen:

$$\text{Staal 1: } |t_{\text{exp}}| = 0.88$$

$$\text{Staal 2: } |t_{\text{exp}}| = 0.46$$

$$\text{Staal 3: } |t_{\text{exp}}| = 1.91$$

Bij 8 vrijheidsgraden bedraagt t_{krit} voor een tweezijdige t-test 2.306. Bij de 3 concentratieniveaus is telkens $|t_{\text{exp}}| < t_{\text{krit}}$. Hieruit konden we besluiten dat beide meetprocedures gelijkwaardig zijn. Bijgevolg kunnen beide voorgesteld worden als een kandidaat referentiemeetprocedure voor de bepaling van serum T3.

II.2.4. Besluit

Uit de resultaten van het onderzoek naar de analytische karakteristieken van de ontwikkelde meetprocedure kunnen wij besluiten dat we er in geslaagd zijn om zowel een ID-LC-MS/MS- als een ID-GC-MS-meetprocedure voor de bepaling van T3 in serum met voldoende gevoeligheid, specificiteit, precisie en nauwkeurigheid/juistheid te ontwikkelen. Daarbij werd mogelijke conversie van T4 naar T3 nauwlettend gecontroleerd. Deze meetprocedures bezitten bovendien de analytische eigenschappen, overeenkomstig de vereisten gesteld door een Europese werkgroep, om voorgesteld te worden als kandidaat referentiemeetprocedures voor toepassingen in de klinische chemie. Nochtans dient opgemerkt te worden dat, om als volwaardige referentiemeetprocedures te kunnen doorgaan, er nood is aan een internationaal aanvaarde primaire kalibrator en een gecertificeerd referentiemateriaal. Bovendien dienen de referentiemeetprocedures gevalideerd te worden door vergelijking in een interlaboratoriastudie met andere referentiemeetprocedures of dezelfde meetprocedures maar uitgevoerd in een ander laboratorium. Momenteel wordt aan deze ontbrekende elementen in het kader van een Europees project gewerkt.

Opmerking: De ontwikkeling van deze meetprocedure werden gepubliceerd in:

- Thienpont LM, Fierens C, De Leenheer AP, Przywara L. Isotope dilution-gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of triiodo-L-thyronine in serum. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999;13:1924-31.

II.3. Vrij thyroxine (FT4)

II.3.1. Inleiding

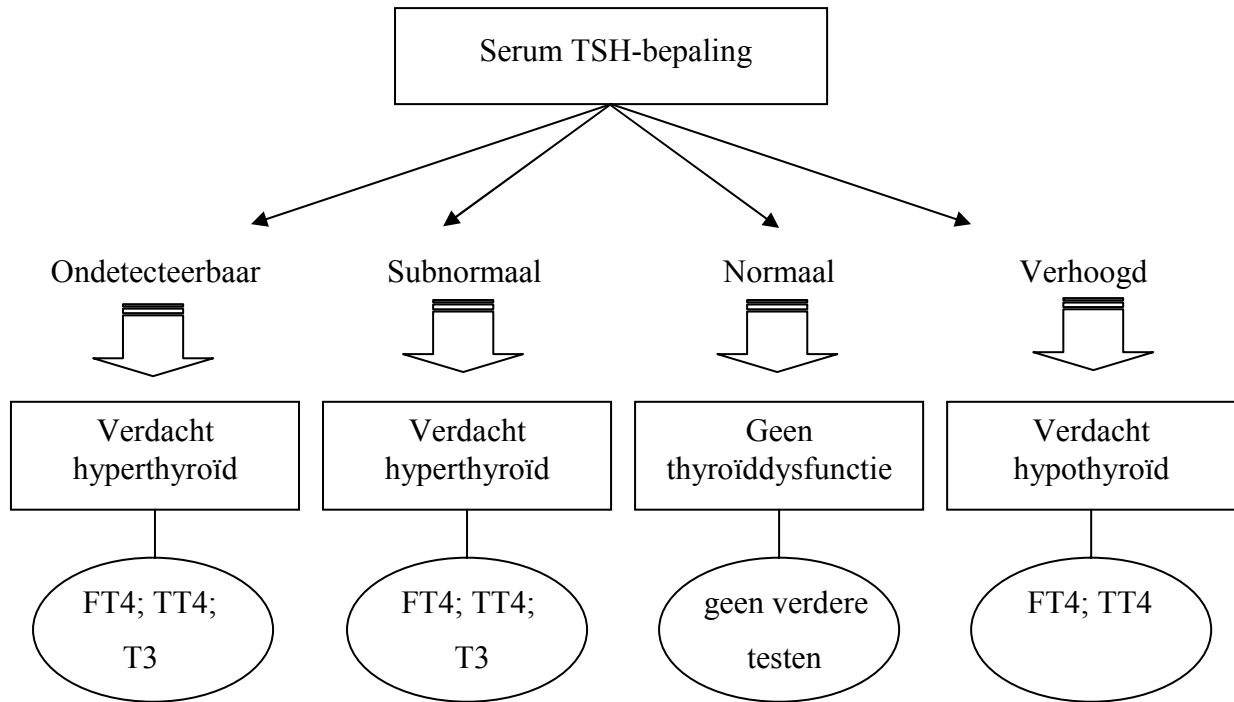
II.3.1.1. De pathofysiologie en klinische bepaling van FT4

T4 is het voornaamste secretieproduct van de schildklier. In tegenstelling tot T3 is al het T4 in de circulatie uit de schildklier afkomstig. In de circulatie is het meeste T4 (~99.98%) niet-covalent gebonden op plasmaproteïnen zoals het TBG (60-75%), transthyretine/thyroxine binding prealbumine (TTR)(15-30%) en albumine (~10%) (3, 26). De gemiddelde T4-concentratie in serum bedraagt ~103.2 nmol/L (80 ng/mL) waarvan slechts ~19 pmol/L (15 pg/mL) niet-proteïnegebonden is (2).

Net als voor de bepaling van T3 heeft de ontwikkeling van de RIA-testsystemen in de vroege jaren '70 een enorme verbetering in zowel specificiteit als sensitiviteit van de T4-bepalingen teweeggebracht. Tegenwoordig is het voor de bepaling van hormonen, die in het bloed voorkomen onder een vrije of proteïnegebonden vorm, zelfs een trend om de vrije fractie te bepalen, veeleer dan de totale hormoonconcentratie. Dit volgt uit de hypothese dat de fysiologische activiteit van de hormonen het best weergegeven wordt door de vrije concentratie (27, 28). Dit concept volgt vooral uit de waarneming dat, bij personen met abnormale serum bindingsproteïneconcentraties en daarbij ook abnormale totaal hormoonconcentraties, de algemene fysiologische effecten van het hormoon nauw overeenkomen met de concentratie van de vrije fractie. Een gewijzigde binding van de schildklierhormonen aan de proteïnen kan optreden in geval van zwangerschap, bij chirurgische ingreep, levercirrhose, trauma, nefrotisch syndroom,.....(2). De bepaling van het vrije hormoon is echter enkel representatief voor de fysiologische toestand wanneer de uitgevoerde testen de *in-vivo* vrij/gebonden balans in evenwicht houden.

Bij een vermoeden van een aandoening van de schildklier wordt in de eerste plaats de TSH-concentratie bepaald. In sommige gevallen kan de TSH-bepaling soms misleidende resultaten geven. Bijvoorbeeld bij patiënten met centraal hypothyroïdisme of bij sommige primair hypothyroïde patiënten met nog een bijkomende ernstige niet-thyroïdale ziekte worden normale tot lage TSH-waarden waargenomen i.p.v. verhoogde waarden. Andere subnormale TSH-concentraties kunnen gevonden worden indien de patiënt lijdt aan aandoeningen aan de hypofyse of de hypothalamus, in het eerste trimester van de zwangerschap of bij gebruik van geneesmiddelen zoals dopamine, glucocorticoïden,..... Om

tot een juiste diagnose te komen is het volgens de “American Thyroid Association” aangeraden om naast de TSH-bepaling, in een bijkomende test, de bepaling van FT4 (of TT4) uit te voeren (figuur II.16.) (5).



Figuur II.16. Diagnoseschema voor de bepaling van thyroïdaandoeningen.

II.3.1.2. Bestaande bepalingprocedures voor FT4

In klinische laboratoria wordt de voorkeur gegeven aan de bepaling van de vrije hormoonconcentratie in aanwezigheid van het proteïnegebonden hormoon (dus zonder voorafgaandelijke fysische scheiding). Hiervoor worden meestal indirecte immunologische meetprocedures, zoals immuno-extractiemeetprocedures, gebruikt (29, 30). In werkelijkheid zijn al deze meetprocedures, in tegenstelling tot wat de producenten beweren, tot op zekere hoogte afhankelijk van de bindingsproteïneconcentratie (31).

In tabel II.8. wordt een overzicht gegeven van de verschillende bepalingprocedures voor FT4.

Tabel II.8. Overzicht van de verschillende bepalingprocedures voor FT4.

	Meetprocedure	Principe
D I R E C T	Absolute meetprocedures <i>Gebruiken gravimetrische standaarden</i>	Fysische scheiding door evenwichts-dialyse, ultrafiltratie of gelfiltratie van het vrije en gebonden hormoon, gevolgd door een RIA-bepaling van T4 in de geïsoleerde vrije fractie.
	Index-meetprocedures <i>Gebruiken empirische standaardisatie</i>	Mathematische correctie voor de totaal hormoonconcentratie (FT4-Index).
I N D I R E C T	Immunologische meetprocedures <i>Gebruiken kalibratoren met waarden bepaald door een absolute meetprocedure</i>	a) Eénstaps- of analoogmeetprocedure Een gemerkt hormoonanaloog treedt in competitie met het FT4 in het serum, om te binden aan een kleine hoeveelheid anti-T4 antilichaam
		b) Twee-staps- of immuno-extractiemeetprocedure Serum wordt geïncubeerd met een anti-T4 antilichaam gebonden op een vaste fase. Na de wasstap worden de niet-bezette antilichaamsbindingsplaatsen gekwantificeerd met gemerkt T4.
		c) Gemerkt antilichaam meetprocedure Het FT4 treedt in competitie met het T4 gebonden op de vaste fase voor een beperkte hoeveelheid gemerkt antilichaam.

De huidige routinemeetprocedures om het vrij hormoon te bepalen, vervullen niet in alle omstandigheden de wens om het evenwicht niet te verstoren. Vooral de testen die gebruik maken van T4-analogen falen hierin, want het is gebleken dat deze analogen deelnemen in het evenwicht vrij/gebonden. Zo is het ook gekend dat bij de immuno-extractiemeetprocedures de antilichamen kunnen binden aan de vrije fractie en hierdoor kunnen hormonen losgemaakt worden van de proteïnen om het evenwicht terug op te bouwen (32 - 34).

Door de snelle groei in de ontwikkeling van de verschillende routinesystemen, die op deze principes gebaseerd waren, nam de bepaling van FT4 enorm toe. Helaas, tot op heden is er nog geen eensgezindheid over de analytische vereisten, zoals een goede kalibratie of validatie voor deze meetprocedures. Bijgevolg werd er, door het toenemend gebruik van deze meetprocedures, een controverse ontwikkeld over de validiteit van de metingen en dit leidde er zelfs toe dat een aantal clinici teruggrepen naar de conventionele meetprocedures voor de bepaling van de TT4-concentratie (31, 35, 36). Dit bewijst de hoge nood die er bestaat voor de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor FT4.

II.3.1.3. Vereisten voor een referentiemeetprocedure voor FT4

II.3.1.3.1. Scheiding tussen de vrije en proteïnegebonden fractie

In de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor FT4 houdt de bepaling van FT4 twee essentiële elementen in, nl. de fysische scheiding tussen de geringe hoeveelheid vrij hormoon en de dominerende hoeveelheid proteïnegebonden hormoon, gevolgd door de kwantificatie van de vrije fractie. Daarbij is het essentieel voor de klinische validiteit van de resultaten dat de scheidingsstap uitgevoerd wordt met behoud van het *in-vivo* evenwicht. Onder de analytische technieken die hiervoor in aanmerking komen, zoals gelfiltratie of scheiding door een membraan zoals evenwichtsdialyse (ED) en ultrafiltratie (UF), genieten de laatste 2 (ED en UF) de voorkeur om het *in-vivo* evenwicht zo goed als mogelijk te bewaren, tenminste wanneer de scheiding uitgevoerd wordt onder zorgvuldig gecontroleerde omstandigheden. De pH, de duur van het scheidingsproces, de temperatuur, de verdunning van het staal en een verandering in ionische samenstelling van de serummatrix spelen namelijk een enorm belangrijke rol in het al dan niet behouden van het *in-vivo* evenwicht (37-39).

Liewendahl et al. (34) heeft een vergelijking gemaakt tussen UF en ED. Dit werd vergeleken met de theoretisch bepaalde vrije fractie. Deze laatste werd berekend aan de hand

van de associatieconstanten en de concentraties van TBG, zoals beschikbaar in de literatuur. Bij een normale TBG-concentratie stelde Liewendahl vast dat de FT4-concentratie voor een gezond referentiepanel, gevonden na UF (~24.2 pmol/L), dichter aanleunde bij de theoretisch berekende concentratie (~22.5 pmol/L) dan bij de concentratie gevonden na ED (~15.1 pmol/L). Ook andere groepen hebben UF en ED vergeleken. Hun resultaten worden voorgesteld in onderstaande tabel.

Tabel II.10. Vergelijking van de FT4-concentraties bij euthyroïde personen na ultrafiltratie en dialyse.

	<i>Ultrafiltratie</i>			<i>Evenwichtsdialyse</i>			Ref
	FT4 concentratie (pg/mL)	SD (pg/mL)	n	FT4 concentratie (pg/mL)	SD (pg/mL)	n	
1	19.6	6.5	10	13	3	5	39
2	15	5	5	19.9	3.6	10	40
3	19.3	4.9	49	21	4.5	49	41
4	19.74 ¹	6.06	17	11.7	2.87	26	42
	21.52 ²	5.51	16				42
5	18.8	5.36	36	11.5	2.7	36	43
6	20.9	7.2	21	24.0	9.8	21	44

¹ Ultrafiltratie uitgevoerd met ultrafilters

² Ultrafiltratie uitgevoerd in dialysezakken

Uit tabel II.10. volgt dat opmerkelijke verschillen waar te nemen zijn tussen UF en ED. Aangezien echter geen gecertificeerde referentiematerialen voor FT4 bestaan, kunnen de vaststellingen van Liewendahl et al. zeker niet bevestigd worden, dus ook voor bovenstaande tabel kan niet besloten worden of UF nauwkeuriger is dan ED. Daarenboven zijn er nog andere effecten zoals proteïnelekkage, adsorptie aan het membraan en het Donnanefect die in beschouwing dienen genomen te worden bij UF. Daar waar de invloed van de eerste 2 kan nagegaan en gecontroleerd worden, maakt het Donnanefect UF tot een kwetsbare techniek. Het Donnanefect kan namelijk het behoud van het vrij/gebonden evenwicht verstoren en wordt verklaard door een ongelijke distributie van de ionen tussen de proteïnen in het retentaat en het filtraat. Het Donnanefect is afhankelijk van de UF-fractie. Bij een UF-fractie van >30% zou het leiden tot een ongelijke verdeling van het vrije hormoon in het ultrafiltraat en het retentaat (45, 46).

II.3.1.3.2. Analytische bepalingprocedure

Na de afzondering van de vrije fractie houdt de tweede stap in een referentiemeetprocedure een analytische meetprocedure in, om met voldoende gevoeligheid de concentratie van het vrij hormoon in een proteïnevrije omgeving te meten. Omdat het resultaat zou kunnen uitgedrukt worden als *FT4-concentratie in serum*, dient ook rekening gehouden te worden met het proteïneverdringingseffect (factor ~ 0.94) in serum. Bovendien is het een vereiste dat de meetprocedure zeer specifiek is, zodat een interferentievrije bepaling van T4 uitgevoerd kan worden. Verder dient de kalibratie uitgevoerd te worden met een primaire kalibrator met een gekende zuiverheid waarmee standaardoplossingen op gravimetrische basis bereid worden. Interne standaardisatie wordt bij voorkeur uitgevoerd met een isotopisch gemerkte IS en als IQC wordt best een gecertificeerd controlemateriaal aangewend.

II.3.1.4. Objectieven

Het was onze bedoeling over te gaan naar de bepaling van analyten die in lage concentraties in serum voorkomen. Er werd geopteerd voor FT4 aangezien de bepaling van thyroïdhormonen een belangrijk aandeel van de bepalingen in het klinische labo vormt en er tot op heden voor de bepaling van FT4 nog geen referentiemeetprocedure ontwikkeld werd. Deze experimenten maakten, zoals vermeld in hoofdstuk I.2., deel uit van een haalbaarheidsonderzoek als basis voor een Europees project i.v.m. de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor FT4. Het definitieve project wordt het onderwerp van een volgende doctoraatsthesis.

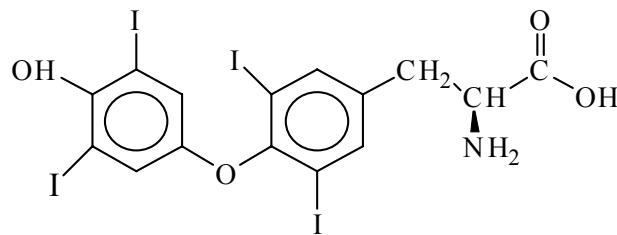
In de ontwikkelingsfase van deze studie zou vooral aandacht besteed worden aan de mogelijkheden om de vrije fractie fysisch van de gebonden hormoonfractie te scheiden. Hiervoor zouden zowel UF als ED in aanmerking genomen kunnen worden. Gezien de enorme tijds winst en eenvoudigere uitvoerbaarheid van UF t.o.v. ED werd echter gekozen om de mogelijkheden van UF als scheidingsprocedure te evalueren. (Nota: uiteraard zal de evaluatie van ED deel uitmaken van het Europees project). De toepassing van UF voor de bepaling van de vrije fractie van de thyroïdhormonen werd reeds door verschillende auteurs beschreven (39-44). Bij de selectie van de ultrafilters zou vooral aandacht besteed worden aan de keuze van het juiste membraanmateriaal. Vervolgens zouden enkele kritische punten van

het ultrafiltratieproces, zoals de adsorptie van T4 aan het membraan en de proteïnelekkage, kort geëvalueerd worden.

Voor de massaspectrometrische detectie zou uitgegaan worden van de bestaande T4-referentiemeetprocedure met ID-GC-MS en ID-LC-MS/MS (21, 22). Gezien de merkelijk lagere FT4-concentraties in serum (slechts 0.02% T4 is niet-proteïnegebonden) zou vooral aandacht besteed worden aan het feit of het bepalen van zo'n lage hormoonconcentraties met onze huidige GC- en LC-apparatuur wel realiseerbaar is en wat de mogelijkheden zijn om de gevoeligheid van de huidige ID-GC-MS- en ID-LC-MS/MS-meetprocedure te verhogen.

II.3.1.5. Fysicochemische eigenschappen van thyroxine

L-Thyroxine ($C_{15}H_{11}I_4NO_4$) of β [4-(3,5-dijodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodofenyl]-L-alanine (figuur II.17.) heeft een Mr 776.87 en is onoplosbaar in water, alcohol en andere veel gebruikte organische solventen, maar in de aanwezigheid van minerale zuren of alkaliën is het wel oplosbaar in alcohol. Het is eveneens oplosbaar in oplossingen van alkalische hydroxiden en in hete alkalische carbonaatoplossingen (2). Het smeltpunt bedraagt 223°C en T4 heeft in het UV-spectrum een absorptiemaximum tussen 260 en 280 nm. De L-vorm is fysiologisch tweemaal zo actief als het racemisch product. De D-vorm daarentegen heeft heel weinig activiteit.



Figuur II.17. De structuurformule van 3,5,3',5'-L-tetraiodothyronine (T4)

II.3.2. Experimenteel gedeelte

II.3.2.1. Standaarden, reagentia, ultrafilters en sera

Het primair standaardmateriaal L-thyroxine of (β - [4-(3,5-dijodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodofenyl]-L-alanine) was afkomstig van Aldrich (Milwaukee, WI, Verenigde Staten) en had een zuiverheid van >99%. Als IS werd $^{13}\text{C}_9$ -thyroxine, aangekocht bij de “Service de Chimie et Biochimie Appliquées de la Faculté Polytechnique, Université de Mons, Hainaut”, gebruikt.

De filters voor UF waren van het type Vivaspin (Vivascience, Lincoln, Groot-Brittannië), gekenmerkt door een verticaal georiënteerd membraan, en van het type Centricon (Millipore, MA, Verenigde Staten) met een horizontaal gemonteerd membraan. Het membraanmateriaal bestond uit geregenereerde cellulose (RC), polyethersulfon (PES) of celluloseetriacetaat (CTA) en de cut-off waarde varieerde tussen 5 en 30 kDa, naargelang de beschikbaarheid (tabel II.9.).

Tabel II.9. Overzicht van de geteste types ultrafilters, membranen en cut-off waarden.

Merksnaam	Membraan	Cut-off (kDa)
Vivaspin	Geregenereerde cellulose (RC)	10
Vivaspin	Geregenereerde cellulose (RC)	30
Vivaspin	Polyethersulfon (PES)	5
Vivaspin	Polyethersulfon (PES)	10
Vivaspin	Celluloseetriacetaat (CTA)	5
Vivaspin	Celluloseetriacetaat (CTA)	10
Centricon	Geregenereerde cellulose (RC)	10
Centricon	Geregenereerde cellulose (RC)	30

De proteïnelekkage van de filters werd nagegaan met de Coomassie[®] Blue test (Pierce, Rockford, IL, Verenigde Staten). Voor de opzuivering van de serumstalen met vaste fase-extractie (SPE) werd gebruik gemaakt van Oasis[®] HLB-extractiekolommen (Waters, MA, Verenigde Staten).

Alle andere gebruikte chemicaliën hadden de “pro analysi” zuiverheidsgraad en waren van Merck (Darmstadt, Duitsland), behalve methanol en acetonitrile, die “super purity” solventen van Romil Chemicals (Shepsed, Groot-Brittannië) waren. De verschillende serumstalen waren afkomstig van gezonde vrijwilligers en werden ter beschikking gesteld door het Oost-Vlaams Bloedcentrum (Gent).

II.3.2.2. Apparatuur

UF werd uitgevoerd met een Biofuge Primo R (Heraeus, Hanau, Duitsland) centrifuge. De spectrofotometrische bepaling van de proteïnelekage werd uitgevoerd met een Ultrospec 2000 UV/VIS spectrofotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, Groot-Brittannië).

De pH werd bepaald met een AVL 988-4 meetsysteem (AVL List GmbH, Graz, Oostenrijk).

LC-MS-analyse:

De LC-MS-analysen werden uitgevoerd met een Micromass VG Quattro II “triple stage” massaspectrometer zoals beschreven onder II.2.2.2. Chromatografie werd uitgevoerd op een C18 Nucleosil kolom afkomstig van SGE (Melbourne, Australië) met een lengte van 150 mm, i.d. van 1 mm, een partikelgrootte van 5 μm en een poriëngrootte van 300 Å. In de experimenten om de gevoeligheid te verbeteren werd gebruik gemaakt van een 150 mm capillaire C18-kolom (LC Packings, Dionex, San Fransisco, CA, Verenigde Staten) met een i.d. van 300 μm , een partikelgrootte van 3 μm en een poriëngrootte van 300 Å.

De LC-MS-analysen werden als volgt uitgevoerd: het SPE-eluaat werd ingedampt tot 30 μL , hieraan werd 15 μL water toegevoegd en 45 μL werd geïnjecteerd op de C18-kolom die isocratisch met $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (65:35:0.03, v/v) werd geëluëerd met een flow van 0.1 mL/min. De massaspectrometrische bepalingen gebeurden onder negatieve ESI in de MRM-modus. Volgende transities werden geselecteerd om in de MRM-modus te monitoren; $[\text{M}-\text{H}]^-$ naar $[\text{I}]^-$ bij m/z 776>127 voor T4 en m/z 785>127 voor $^{13}\text{C}_9$ -T4. Bij opname in de scanmodus werd gescand van m/z 50 tot 800 in 2.0 s. De scantijd voor de metingen in de MRM-modus was 0.4 s zodat minstens 15 keer onder de LC-piek gescand werd. Als collisiegas werd argon gebruikt met een druk van 3×10^{-3} mbar en de collisie-energie werd geoptimaliseerd op 55 eV. De spanning op de cone bedroeg 25 V en de brontemperatuur werd ingesteld op 175°C.

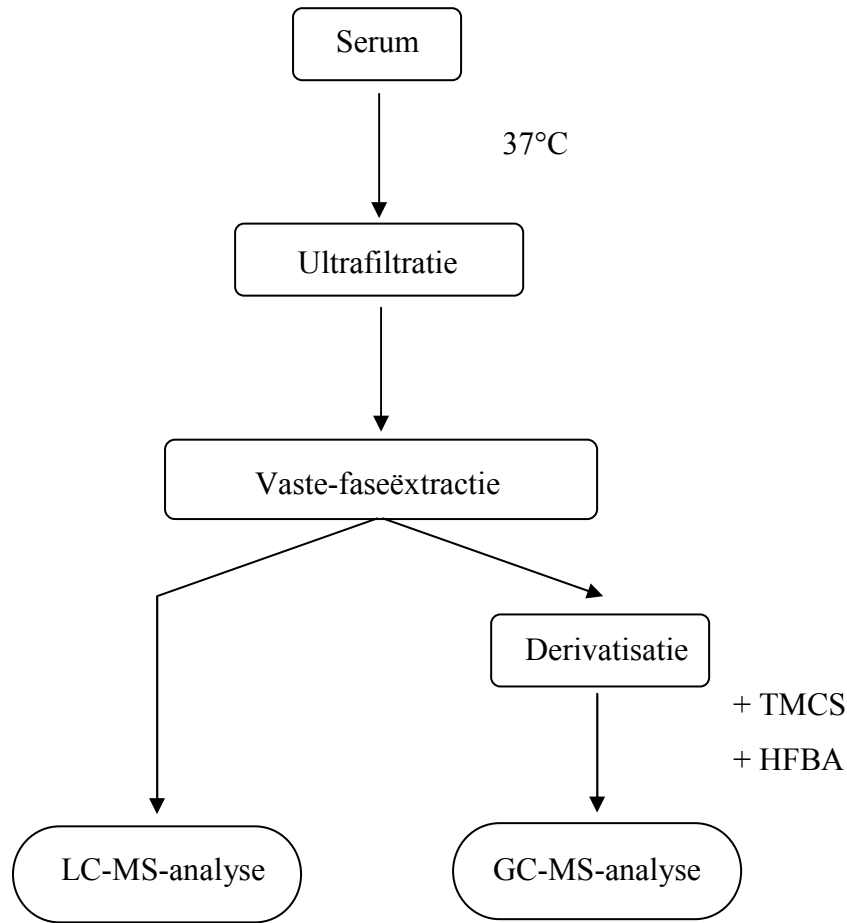
GC-MS-analyse:

De GC-MS-analysen werden uitgevoerd met een Finnigan MAT Incos XL massaspectrometer zoals beschreven onder II.2.2.2. De GC-kolom was een 12 m x 0.18 mm i.d. DB-1, d.i. methylsilicone, “fused” silica kolom met een filmdikte van 0.18 μm , afkomstig van J&W Scientific (Folsom, CA, Verenigde Staten). Deze capillaire kolom was rechtstreeks met de massaspectrometer gekoppeld.

Een GC-MS-analyse werd als volgt uitgevoerd: het residu na derivatisatie werd heropgelost in 15 μL cyclohexaan en 5 μL werd geïnjecteerd in het PTV-injectiesysteem bij “purge on” en 70°C; na 0.3 min schakelde de injector naar de “purge off”, en werd hij opgewarmd tot 280°C met een snelheid van 12°C/s; na 1 min bij 280°C en “purge off” werd de injector terug omgeschakeld naar de “purge on” en gekoeld tot de starttemperatuur. Het GC-temperatuursprogramma was als volgt: de starttemperatuur was 150°C (behouden gedurende 1.3 min); zij werd opgedreven tegen 20°C/min tot 300°C. Deze temperatuur werd gedurende 3 min behouden. De temperatuur van de “transfer body” en “nozzle” waren 310 en 300°C respectievelijk. MS gebeurde steeds onder EI (70 eV) ionisatie. T4 en $^{13}\text{C}_9\text{-T4}$ elueerden na ~13 min. In de SIM-modus mat de massaspectrometer bij m/z 970.0 - 970.25 en 979.0 – 979.25 voor de fragmenten van de T4- en $^{13}\text{C}_9\text{-T4}$ -derivaten respectievelijk. De scantijden waren 0.16 s zodat minstens 15 keer onder de GC-piek gescand werd.

II.3.2.3. Analyseprocedure voor serum FT4

De analyseprocedure voor de bepaling van serum FT4 wordt schematisch voorgesteld in figuur II.18. Ze bestond uit UF, om de vrije van de gebonden fractie te scheiden, gevolgd door een opzuiveringsstap met SPE. Wanneer de stalen gemeten werden via GC-MS volgde nog een derivatisatiestap.



Figuur II.18. Schematische voorstelling van de analyseprocedure voor serum FT4.

II.3.2.3.1. Ultrafiltratie

Alvorens UF uit te voeren, werden de serumstalen gedurende 30 min op 37°C gebracht om het thermodynamisch *in-vivo* evenwicht zo goed mogelijk te evenaren. Vervolgens was het belangrijk dat de ultrafiltratietijd zo kort mogelijk gehouden werd om het evenwicht vrij/gebonden minimaal te verstoren. Een volume serum (~8 mL) werd gepipetteerd in 4 verschillende ultrafilters. De ultrafiltratietijd om ~700 µL ultrafiltraat uit 2 mL serum te verkrijgen en de centrifugale kracht die de filters kunnen verdragen, zijn afhankelijk van het type filter. Ultrafilters met een verticaal georiënteerd membraan kunnen hogere snelheden aan en hebben bovendien een groter contactoppervlak. Hierdoor zijn voor dit type filters kortere filtratietijden vereist dan voor deze met een horizontaal georiënteerd membraan om uiteindelijk hetzelfde volume ultrafiltraat te verkrijgen. Om die reden was het mogelijk om het serum gedurende slechts 15 min op 7000 x *g* te filteren in de Vivaspin filters, dit in

tegenstelling tot de Centricon filters, die 45 min op 2500 x g nodig hadden voor filtratie van het hetzelfde volume serum. Uiteindelijk werd voor de 4 ultrafilters een gezamenlijk volume van ~3 mL ultrafiltraat verkregen. Hieraan werd onmiddellijk na UF een geschikte hoeveelheid IS gravimetrisch toegevoegd om uiteindelijk een 1:1 isotoopratio te verkrijgen gedurende de MS-metingen.

II.3.2.3.1.1. pH-variantie gedurende ultrafiltratie

De pH-variantie gedurende UF werd gevolgd door de pH van het serum te bepalen onmiddellijk vóór en onmiddellijk na UF. Tevens werd ook de pH van het ultrafiltraat bepaald.

II.3.2.3.1.2. Adsorptie aan de filter

De mogelijke adsorptie van T4 aan het membraan en de wanden van de verschillende filters werd nagegaan op de volgende manier: aan 2 mL 0.9% NaCl-oplossing werd 500 pg T4 toegevoegd. Dit werd gefiltreerd gedurende 45 min op 2500 x g (Centricon) of 15 min op 7000 x g (Vivaspin). Aan dit ultrafiltraat werd 500 pg IS toegevoegd, gevolgd door SPE. De verkregen MS-ratio werd vergeleken met de ratio die verkregen werd wanneer 2 mL 0.9% NaCl-oplossing, waaraan 500 pg T4 en 500 pg IS werd toegevoegd, rechtstreeks over de vaste fase werd geëxtraheerd zonder voorafgaande UF.

II.3.2.3.1.3. Proteïnelekkage

De ultrafilters die de minste adsorptie vertoonden, werden vervolgens getest op lekkage van proteïnen. Hiervoor werd de “Coomassie[®] Briljant Blue” kit voor totaal proteïne kwantificatie van Pierce (Rockford, IL, Verenigde Staten) gebruikt.

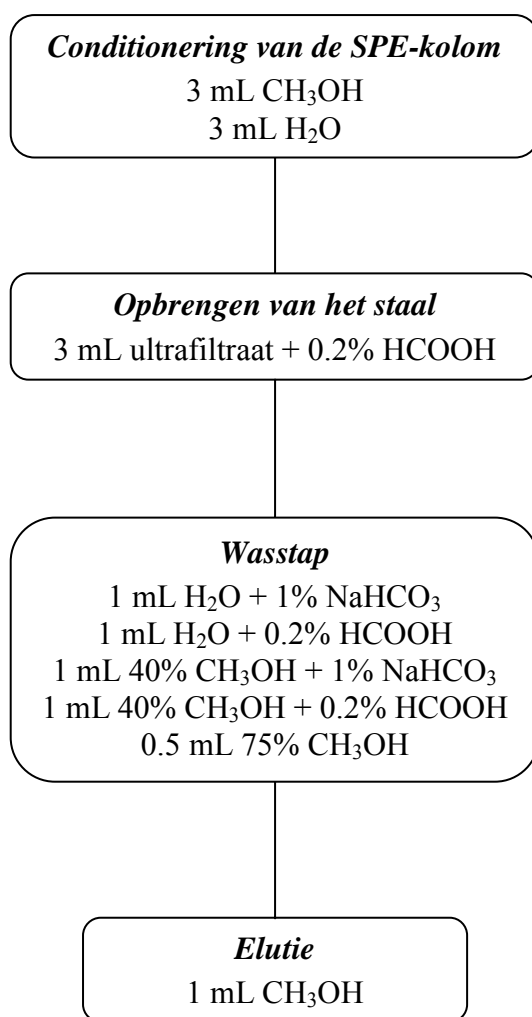
Een HEPES-bufferoplossing (of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethaansulfonzuur) werd gefiltreerd om een pseudo-ultrafiltraat te verkrijgen dat gebruikt kon worden als blanco en ter verdunning van de standaardoplossingen. Vervolgens werd 5% BSA toegevoegd aan de HEPES-buffer en opnieuw werd UF uitgevoerd. Aan 500 µL ultrafiltraat (of blanco) werd 500 µL Coomassiereagens toegevoegd. Dit werd goed gemengd in een cuvet. De adsorptie werd spectrofotometrisch bij 595 nm bepaald. De hoeveelheid albumine in het filtraat werd bepaald en vergeleken met de blanco.

II.3.2.3.2. Vaste-faseextractie (SPE)

II.3.2.3.2.1. Extractieprocedure

Het ultrafiltraat werd verder opgezuiverd door gebruik te maken van SPE. De gebruikte Oasis[®] HLB extractiekolommen hadden een volume van 3 mL en bevatten 60 mg polymeer “reversed phase” materiaal. De gebruikte opzuiveringsprocedure wordt voorgesteld in figuur II.19.

Voor ID-LC-MS/MS-analyse werd het eluaat ingedampt onder een stikstofstroom bij 50°C tot een resterend volume van ~30 µL. Hieraan werd 15 µL water toegevoegd en 45 µL werd geïnjecteerd. Voor ID-GC-MS-analyse werden de eluaten volledig drooggedampt en ge-derivatiseerd zoals beschreven onder II.2.2.3.3.



Figuur II.19. Schematische voorstelling van de opzuiveringsprocedure met een Oasis[®] HLB 3 mL.

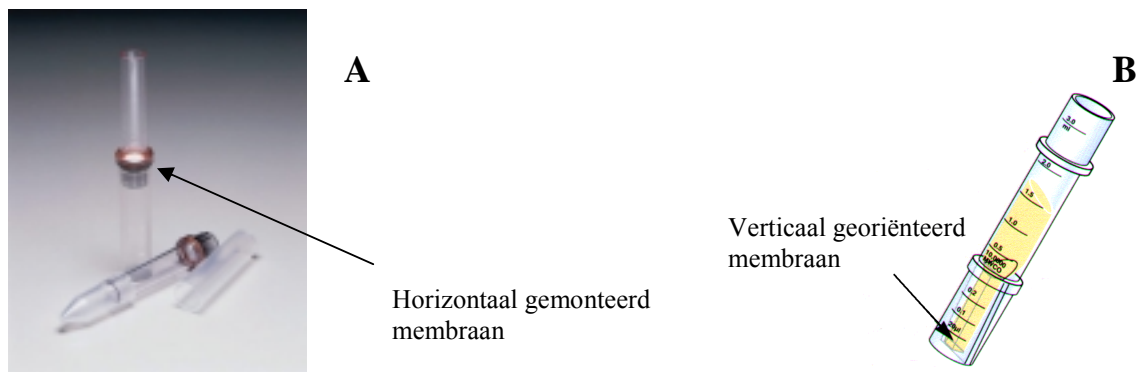
II.3.2.3.2.2. Terugvinding van SPE

De terugvinding van de SPE-procedure werd nagegaan op de volgende manier: een welbepaalde hoeveelheid ultrafiltraat (~6 mL) werd opgesplitst in 2 gelijke porties. Aan de ene portie (~3 mL) werd 200 µL IS-oplossing ¹³C₉-T4 toegevoegd om een 1:1 MS-ratio te verkrijgen. Vervolgens werd SPE uitgevoerd. Aan de andere portie werd de IS, ook 200 µL, pas toegevoegd aan het eluaat na SPE. De terugvinding van de SPE werd bepaald door de verkregen MS-ratio's te vergelijken.

II.3.3. Resultaten en discussie

II.3.3.1. Evaluatie van ultrafiltratie als scheidingsprocedure

Tegenwoordig zijn er 2 types van ultrafilters beschikbaar om UF uit te voeren (figuur II.20.). Ten eerste is er de klassieke filter (type Centricon) met een horizontaal gemonteerd membraan uit RC (figuur. II.20.A). Ten tweede bestaan er nu de nieuw ontwikkelde ultrafilters met een verticaal georiënteerd membraan (type Vivaspin) die beschikbaar zijn in 3 soorten membraanmateriaal, nl. RC, PES, of CTA (figuur II.20.B).



Figuur II.20.A & B. Voorstelling van (A) de klassieke ultrafilter en (B) de nieuw ontwikkelde ultrafilter met een verticaal georiënteerd membraan.

Het grote voordeel van deze nieuwe filters t.o.v. de klassieke filters is het vergrote contactoppervlak waardoor een kortere filtratietijd vereist is voor filtratie van hetzelfde volume serum (ook “fast-flow” filters genoemd). Wat de filtratietijden betreft, werden tussen filters met cut-off waarden van 5, 10 en 30 K geen grote verschillen waargenomen. Wel was er een opmerkelijk tijdsinst, nl. 15 min i.p.v. 45 min, voor de filters met een verticaal georiënteerd membraan t.o.v. die met een horizontaal membraan, om een ultrafiltratiefractie van 20 à 30% te bereiken. Om de invloed van het Donnanefect zoveel mogelijk te verhinderen, werd er steeds gestreefd naar een UF-fractie van 20 à 30%.

In onze preliminaire experimenten werd vooral nadruk gelegd op de evaluatie van de adsorptie van T4 aan de verschillende types filters en membranen, en op de proteïnelekkage.

II.3.3.1.1. pH-variantie gedurende ultrafiltratie

De verandering van de pH gedurende het ultrafiltratieproces werd nagegaan (n=6) door de pH van het serum te meten vóór en na UF. Bij de start bezat het ontdooid serum reeds een pH die van de fysiologische pH afweek, nl. pH 8 (Nota: dit werd veroorzaakt door het invries- en ontdooiproces). Na UF gedurende 15 min werd opnieuw de pH van het serum en ook van het ultrafiltraat bepaald. We vonden waarden van pH 8.3 en 8.4 respectievelijk. Deze stijging van pH was onder meer te verwachten door het verlies aan CO₂ gedurende het ultrafiltratieproces. Deze experimenten wijzen er inderdaad op dat de pH tijdens UF nauwlettend gecontroleerd moet worden. Een wijziging in pH kan namelijk het *in-vivo* evenwicht verstoren. Bij het begin van de UF zou de pH van het serum met een minimale hoeveelheid buffer (bvb. HEPES-buffer) aangepast moeten worden tot fysiologische pH (7.4). Tijdens de UF zouden de filters afgesloten moeten worden bvb. met parafilm. Enkel op die manier kan een juiste weerspiegeling van het *in-vivo* evenwicht weergegeven worden (33).

II.3.3.1.2. Adsorptie aan de filter

Het feit dat de mogelijkheid bestaat dat een bepaald percentage van de te bepalen component aan het membraan of aan de wanden van het filtercompartiment adsorbeert, is een gekend probleem. In de literatuur wordt meestal rekening gehouden wordt met een adsorptie van 10.3% voor T4 aan het membraan (32). Wij vonden het nuttig om de adsorptie van T4 aan de diverse membraanmaterialen en filters te evalueren aan de hand van terugvindings-experimenten. Nota: in de literatuur werd deze adsorptie bepaald met behulp van radioactief gemerkt T4 (49, 50).

Tijdens de eerste metingen werd gebruik gemaakt van een 0.9% NaCl-oplossing waaraan 500 pg T4 werd toegevoegd. Na UF werd eveneens 500 pg IS toegevoegd opdat een MS-ratio van 1:1 zou verkregen worden. Helaas, onder deze omstandigheden werden echter gigantisch grote verliezen aan T4 door adsorptie aan het membraan vastgesteld (tabel II.10.).

Tabel II.10. Overzicht van het verlies aan T4 door adsorptie aan de verschillende membraanmaterialen zoals getest met een 0.9% NaCl-oplossing (n=4).

Filtertype	Gemiddeld % verlies door adsorptie	n
Vivaspin RC -10 K	85	4
Centricon RC -10 K	85	4
Vivaspin CTA - 5 K	90	4
Vivaspin PES - 5 K	100	4

Nota: Voor elk membraanmateriaal werd de filter met de laagste cut-off waarde getest, omdat aangetoond werd dat de adsorptie onafhankelijk is van de cut-off waarde (48).

Voor de geteste filters stelden we dus een gemiddelde adsorptie van 85 tot 100% vast. Hieruit moesten wij dan ook veronderstellen dat bij UF van 1 mL serum (bevat ~15 pg FT4) alle T4 geadsorbeerd zou worden aan het membraan, m.a.w. via ID-GC-MS-of ID-LC-MS/MS-analyse van het UF zouden we geen signaal meer waarnemen. Dit was duidelijk niet het geval want, na ID-GC-MS-en ID-LC-MS/MS-analyse van 2 mL serum na UF (bevat ~30 pg FT4), zagen wij toch een duidelijk signaal voor T4. Dit zou betekenen dat:

- i) andere componenten, ook in het serum aanwezig, de adsorptie van T4 aan het membraan of de filter tegengingen, of
- ii) er per toeval een lek in het membraan was, waardoor ook proteïnegebonden T4 in het ultrafiltraat terechtgekomen was.

Om de eerste veronderstelling uit te testen werden de experimenten herhaald, maar nu werd gebruik gemaakt van serumultrafiltraat i.p.v. 0.9% NaCl-oplossing, waaraan 500 pg T4 werd toegevoegd (tabel II.11.).

Tabel II.11. Overzicht van het verlies aan T4 door adsorptie aan verschillende membraanmaterialen zoals getest met serumultrafiltraat (n=4).

Filtertype	Gemiddeld % verlies door adsorptie	n
Vivaspin RC – 10 K	30	4
Centricon RC – 10 K	40	4
Vivaspin CTA – 5 K	90	4
Vivaspin PES – 5 K	100	4

Het viel ons onmiddellijk op dat er nu een sterke daling in adsorptie optrad, tenminste bij de filters die een membraan bevatten bestaande uit RC.

Hierdoor werd ons vermoeden, dat in het serum nog andere componenten aanwezig zijn (bvb. vetten, proteïnen,...) die mogelijks de adsorptie van FT4 aan het membraan tegen- gaan, bevestigd. Eventueel bezetten ze zelf de actieve plaatsen op het membraan.

Op die manier vermoeden we dus dat bij gebruik van serum de adsorptie nog kleiner zou zijn en de 10% adsorptie, zoals beschreven in de literatuur, zou benaderen (32). In elk geval konden wij uit deze experimenten de ernst van het adsorptieprobleem bij sommige membraantypes, zoals CTA en PES, duidelijk waarnemen en op die manier kon het verder gebruik van deze filters volledig afgeraden worden. Bovendien moesten wij besluiten dat, idealiter, de adsorptie bepaald wordt met radioactief T4. Deze metingen zullen ook deel uitmaken van het Europees project i.v.m. de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor FT4.

Andere mogelijkheden om het adsorptiefenomeen te verminderen zijn bvb. het toevoegen van een grote overmaat van een component die gelijkend is op T4 bvb. rT3, en zo in competitie gaat treden voor adsorptie aan het membraan of, zoals Holm et al. beschrijft, de filter vooraf spoelen met een 0.2%-albumineoplossing (48).

II.3.3.1.3. Proteïnelekkage

Bij het scheiden van vrij en proteïnegebonden hormoon moet er verzekerd kunnen worden dat er geen lekkage van proteïnen m.a.w. de dragermoleculen (TBG, TTR en albumine) van T4, optreedt. Een mogelijke lekkage zou de concentratie van de vrije hormoon- fractie immers vals positief beïnvloeden.

De lekkage aan proteïnen werd getest op de filters die een membraan bevatten bestaande uit RC, aangezien die de minste adsorptie vertoonden, zoals bleek uit II.3.3.1.2 (nl. Centricon 30K en 10K en Vivaspin 10K en 30K). Nota: de andere filters werden niet getest wegens hun onbruikbaarheid door een onaanvaardbaar hoge adsorptie van T4.

De lekkage werd getest met de “Coomassie[®] Briljant Blue” kit. Dit is een snelle, gebruiksklare variant van de alomgekende Bradford Coomassie[®] dye binding colorimetrische procedure voor totaal proteïne kwantificatie. Het principe steunt op een kleurreactie tussen het proteïne en het reagens. Het Coomassie[®] reagens is samengesteld uit Coomassie[®] dye, methanol, fosforzuur en oplosmiddelen in water. Wanneer Coomassie[®] proteïnen bindt in

zuur milieu treedt er onmiddellijk een absorptieverschuiving op van 465 nm naar 595 nm met een gelijktijdige kleurverandering van het reagens van groen/bruin naar blauw.

Het microprotocol is werkzaam in een range van 0.5 tot 10 µg/mL. Onze ijklijn werd opgesteld uitgaande van een meegeleverde BSA-standaardoplossing van 2 mg/mL. De meeste proteïnetesten gebruiken immers steeds BSA of een immunoglobuline als standaard waartegen de proteïneconcentratie in het staal bepaald wordt.

Aangezien de 3 bindingsproteïnen ongeveer van een gelijke grootte zijn, nl. albumine (66 kDa), TBG (54 kDa) en TTR (54 kDa), konden we veronderstellen dat de concentraties van deze proteïnen, die in het filtraat teruggevonden zouden worden (= cofiltratie), voor alle 3 gelijkwaardig zouden zijn. In deze preliminaire testen stelden we ons criterium zo in dat we een maximale fout van 5% op de FT4-concentratie door lekkage of cofiltratie van proteïnen toelieten. Bijgevolg bedroeg de maximaal toegelaten hoeveelheid albumine in het ultrafiltraat 0.4 µg/mL. Deze concentratie is echter niet meer bepaalbaar met deze kit. Bovendien is deze 5% ook vrij ruim genomen. Bij de verdere ontwikkeling van de uiteindelijke referentiemeetprocedure zal slechts een maximale fout door lekkage van 2% (of 0.16 µg/mL albumine) aanvaard worden.

Dit experiment, uitgevoerd op bovenvermelde filters, werd uitgevoerd om na te gaan of er geen opmerkelijk grote lekkage van proteïnen optrad. Er werd gebruik gemaakt van HEPES-buffer. Telkens werd er geen verschil in adsorptie waargenomen tussen ultrafiltraat van HEPES-buffer en ultrafiltraat van HEPES-buffer + 5% BSA. Hieruit konden we alvast besluiten dat er geen enorm grote lekkage van proteïnen optrad bij deze filters. Helaas is de Coomassie kit voor ons te ongevoelig voor een correcte bepaling. In de toekomst zal een gevoeliger proteïnebepaling, gebaseerd op een ander meetprincipe, gebruikt moeten worden voor de bepaling van de proteïnen in het ultrafiltraat.

II.3.3.1.4. Aanbevelingen voor het verder gebruik van ultrafiltratie

Ofschoon deze experimenten zeker niet van die aard waren om uitsluitsel te geven, kunnen toch enkele conclusies of aanbevelingen voor verder gebruik van UF meegegeven worden:

- om een pH-variatie, door bvb. een verlies aan CO₂ gedurende het filtratieproces, te vermijden, zou het serumstaal moeten gebufferd worden met een minimale hoeveelheid HEPES-buffer op pH 7.4 (bvb. 50 µL 1 mol/L HEPES-buffer per mL serum) (32).

- er wordt voorkeur gegeven aan het gebruik van filters met een membraan bestaande uit RC (32, 48).
- adsorptie aan het membraan en/of aan de wanden van het filtercompartiment moet grondig bepaald worden. Dit kan het best uitgevoerd worden met radioactief T4 (49, 50).
- om biochemische veranderingen gedurende het ultrafiltratieproces door concentratieveranderingen of het Donnanefect te minimaliseren, zou de ultrafiltratiefractione <30% moeten zijn (41).
- proteïnelekkage moet steeds nagegaan worden met een test die een goede gevoeligheid heeft, zodat albumineconcentraties tot 0.16 µg/mL gedetecteerd kunnen worden (48).

Bovendien zijn er nog een aantal factoren, die in de literatuur beschreven staan, die van belang zijn voor het correct uitvoeren van UF. In dit preliminair onderzoek werden ze soms verwaarloosd, maar in de toekomst zal er zeker rekening mee moeten gehouden worden, zoals:

- vóór UF mag het serum niet (of maximaal ½) verdund worden (47).
- gedurende het hele filtratieproces zou de temperatuur op 37°C behouden moeten blijven om het *in-vivo* evenwicht te bewaren.
- na het vullen van de filter met serum zou de filter met parafilm afgesloten moeten worden om aanconcentratie van het serum door verdamping tegen te gaan.

II.3.3.2. Vaste faseextractie (SPE)

Gezien het gevoeligheidsprobleem bij de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor FT4, realiseerden wij ons dat het misschien belangrijk zou zijn de staalopzuivering, zoals gebruikt voor TT4, te vereenvoudigen (21, 22). Het was immers te verwachten dat minder stappen in de staalopzuivering minder aanleiding tot thermische stress en chemische afbraak zouden geven, hetgeen op zijn beurt zou resulteren in een hogere terugvinding van de analyt. Vanuit die optiek werd verkozen in plaats van de deproteïnisatie en vloeistof-vloeistofextractie, zoals beschreven voor TT4 (21, 22), een SPE-procedure te gebruiken. Hierbij werd voornamelijk gestreefd naar elutie van T4 in zuiver organisch solvent, wat het indamproces bevordert.

II.3.3.2.1. Extractieprocedure

Na het uittesten van verschillende SPE-kolommetjes met C18-RP-materiaal, werden de beste resultaten verkregen na SPE met Oasis[®] HLB extractiekolommen. Deze kolommetjes bevatten 60 mg polymeer, poly(divinylbenzeen-co-N-vinylpyrrolidone), “reversed phase” materiaal. Dit macroporeus copolymeer wordt gekenmerkt door zowel hydrofiele als lipofiele retentie-eigenschappen (nota: HLB is een acroniem voor hydrofiel-lipofiel balans). Hierdoor bezit Oasis[®] 2 unieke eigenschappen: ten eerste blijft het materiaal steeds een bepaalde hoeveelheid water behouden. Dit heeft als voordeel dat tijdens het opzuiveren het sorbent mag drooglopen zonder verlies aan reproduceerbaarheid en terugvinding. Een tweede eigenschap is de mogelijkheid om een breed spectrum aan componenten te weerhouden.

Alvorens de extractie uit te voeren, werd aan het ultrafiltraat 0.2% HCOOH toegevoegd. De wasstap, om de niet gewenste componenten van de kolommetjes te verwijderen, gebeurde zowel met zure als basische oplossingen (zie schematische voorstelling van de opzuivering in figuur II.19.). Het percentage CH₃OH werd geleidelijk opgedreven, waarbij de laatste wasstap met 75% CH₃OH vooral bedoeld was om zoveel mogelijk H₂O uit het sorbentmateriaal te verwijderen, zodat het residueel H₂O in het uiteindelijke eluaat zo laag als mogelijk zou zijn. Grote hoeveelheden residueel H₂O in het eluaat zouden immers het indamproces vertragen, met als gevolg thermische stress op T4 en verminderde stabiliteit van de molecule. De elutie van T4 gebeurde uiteindelijk met 100% CH₃OH. Vervolgens werden de eluaten drooggedampt onder stikstofstroom bij kamertemperatuur.

II.3.3.2.2. Terugvinding van de SPE

De terugvinding van de SPE werd bepaald door de MS-ratio's, verkregen wanneer IS vóór of na de SPE aan het ultrafiltraat werd toegevoegd, te vergelijken. De gemiddelde terugvindingspercentages (n=15) lagen tussen de 70 en 85%, wat een voldoende terugvinding weerspiegelt.

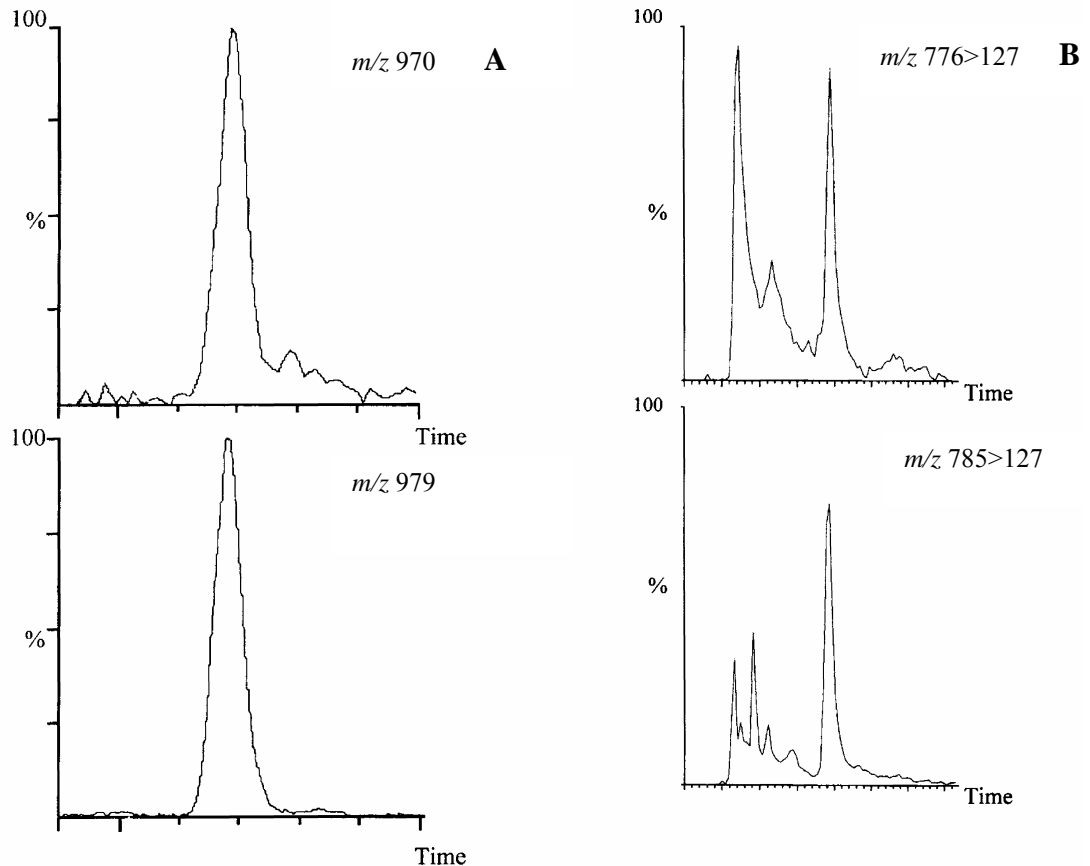
II.3.3.3. Verbeteren van de detectiegevoeligheid

Detectie op basis van ID-MS is nog steeds de procedure bij uitstek voor de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure. Hierdoor viel de keuze op ID-MS voor de directe meting van T4 in het ultrafiltraat. De uitdaging in deze preliminaire experimenten bestond er vooral in de lage concentraties FT4 (~19 pmol/L of 15 pg/mL bij euthyroïde patiënten) in serum met voldoende gevoeligheid te detecteren.

Allereerst werd de gevoeligheid van de MS-detectie nagegaan door de detectielimiet, bij een S/N-verhouding van 3, voor zuivere standaardoplossingen te bepalen. Zowel voor ID-GC-MS als voor ID-LC-MS/MS werd een detectielimiet van 3 tot 6 pg bereikt. Met deze detectielimiet is het dus mogelijk om de T4-concentratie in ~3 mL ultrafiltraat (bevat ~45 pg T4), afkomstig van ~8 mL serum, met voldoende gevoeligheid te bepalen.

Voor de ID-GC-MS-analysen was het enkel mogelijk deze detectielimiet te bereiken door gebruik te maken van een 'korte' kolom (12 m) met een dunne filmdikte (0.18 µm) en na het verhogen van de opbrengst van de derivatisatie van T4 tot het *N,O*-(di-HFB)-methylester. Dit werd bereikt door het toevoegen van 20 ng androstaan. We vermoeden dat de aanwezigheid van androstaan een beschermende werking uitoefent tijdens het derivatisatieproces.

Figuur II.21. stelt een ID-GC-MS- en ID-LC-MS/MS-chromatogram voor van een serumstaal (~8 mL) met een FT4-concentratie van ~11 pg/mL. Voor het ID-GC-MS-chromatogram werd ~11 pg T4 op de kolom gebracht terwijl voor de ID-LC-MS/MS-analyse ~33 pg T4 op de kolom gebracht werd. Nota: in dit geval werd, om gevoeligheidsredenen, een hoeveelheid IS aan het staal toegevoegd zodat een isotoopratio van 1:3 verkregen werd.



Figuur II.21. ID-GC-MS- (links) en ID-LC-MS/MS-ionenchromatogrammen (rechts) van een serumstaal met een FT4-concentratie van ~11 pg/mL waaraan IS werd toegevoegd zodat een isotoopratio van 1:3 verkregen werd.

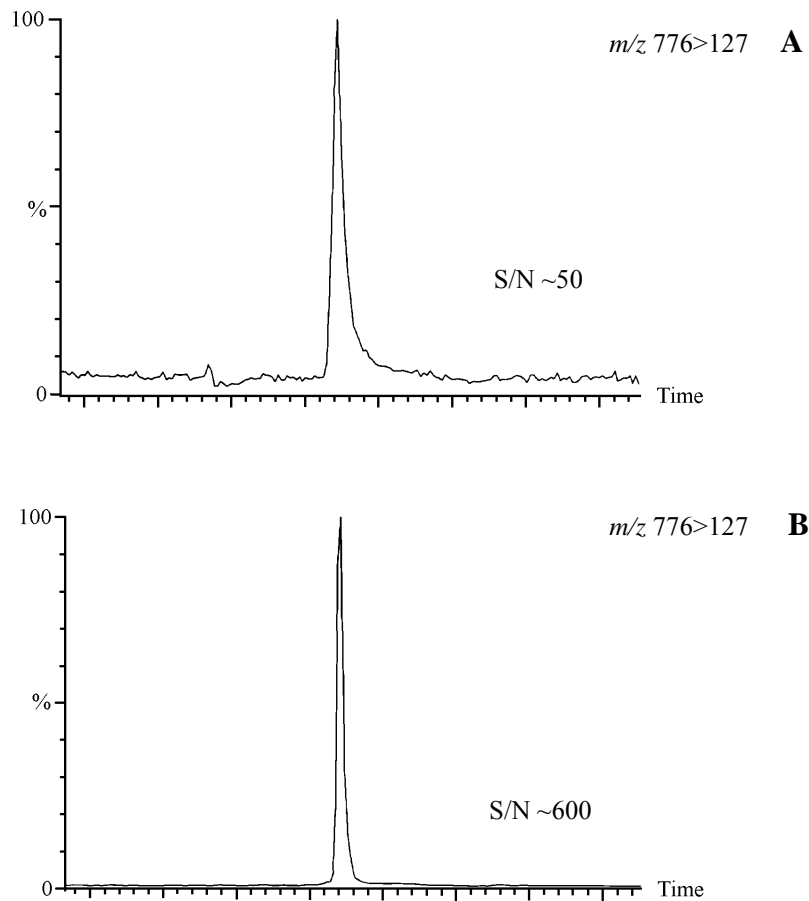
Uit figuur II.21. (rechts) is duidelijk zichtbaar dat de ID-LC-MS/MS-gevoeligheid en chromatografische resolutie nog grondig verbeterd moesten worden.

In een later stadium van deze thesis werd het effect van miniaturisatie nagegaan. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een 150 mm capillaire C18-kolom (LC Packings, Dionex, San Fransisco, CA, Verenigde Staten) met een i.d. van 300 μm . Het gebruik van deze kolommen vereist echter ook aangepaste flows, nl. ~ 4 à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Aangezien de laagst mogelijke constant reproduceerbare flow, uitvoerbaar met onze Kontron HPLC, 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ is, werd een Accurate[®] (LC-packings, Dionex, San Fransisco, CA, Verenigde Staten) tussen de HPLC-pomp en injector geplaatst. Deze Accurate[®] biedt de mogelijkheid, door middel van een splitventiel, een inkomende flow van 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ te reduceren tot een uitgaande flow van 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Daarenboven werd, om nog betere gevoeligheid te verkrijgen, overgegaan naar gradiëntelutie i.p.v. isocratische elutie. Het eluens A bestond uit 100% H₂O + 0.03% HCOOH en

eluens B bestond uit 100% CH₃CN + 0.03% HCOOH. Er werd gestart bij 10% eluens B, vervolgens werd in 4 min naar 75% eluens B gegaan, dit werd gedurende 1 min aangehouden en daarna werd in 0.1 min teruggekeerd naar 10% eluens B zodat reëquilibratie van de kolom kon plaatsvinden. Door het aanbrengen van deze wijzigingen steeg de S/N-verhouding van ~50 voor de injectie van 50 pg zuivere T4-standaard in de oorspronkelijke, isocratische meetprocedure met de 150 x 1 mm kolom (figuur II.22.A) naar een S/N ~600 bij gradiëntelutie op een capillaire (300 µm i.d.) kolom (figuur II.22.B).

Deze enorme verbetering in behaalde gevoeligheid opent veel perspectieven voor de verdere ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor FT4 met ID-LC-MS/MS.



Figuur II. 22.A & B. ID-LC-MS-ionenchromatogram van 50 pg T4 na (A) isocratische elutie op een 150 x 1 mm i.d. C18-kolom en (B) gradiëntelutie op een 150 x 300 µm i.d. C18-kolom.

II.3.4. Besluit

Als aanloop tot de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van FT4 hebben we in onze preliminaire experimenten de mogelijkheid van het gebruik van UF als scheidingsprocedure voor de vrije van de gebonden hormoonfractie, in combinatie met ID-MS (GC- of LC-inlet), aangetoond. Voor beide technieken hebben wij de detectiegevoeligheid voldoende kunnen verbeteren zodat te verwachten is dat het in de toekomst mogelijk zal zijn stalen met goede S/N-verhouding te meten.

De meest kritische stap in de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure zal het op punt stellen zijn van een gecontroleerde ultrafiltratieprocedure, zodat het vrije van het gebonden T4 gescheiden kan worden zonder verstoring van het *in-vivo* evenwicht. Hierbij zijn het behoud van een constante pH en temperatuur (37°C) gedurende het filtratieproces en korte ultrafiltratietijden heel cruciaal. Verder zal de mogelijkheid op lekkage van proteïnen en adsorptie van T4 aan het membraan en filtercompartiment nauwlettend gevolgd moeten worden.

Voor de opzuivering van het ultrafiltraat werd een SPE-procedure ontwikkeld. Deze opzuiveringsprocedure is eenvoudiger, laat toe meerdere stalen tegelijkertijd op te zuiveren en vereist minder stappen dan vloeistof-vloeistofextractie, hetgeen resulteert in een hogere terugvinding van de analyt.

Opmerking: De ontwikkeling van deze meetprocedure werden gepubliceerd in:

- Fierens C, Thienpont LM, De Leenheer AP. Towards an isotope dilution mass spectrometry method for serum free thyroxine (FT4). *Immunoanal. Biol. Spéc.* 2000;15:311-7.

REFERENTIES

- (1) Burrow GN, Fisher DA, Larsen PR. Maternal and fetal thyroid function. *N. Engl. J. Med.* 1994;331:1072-8.
- (2) Whitley RJ, Meikle AW, Watts NB. Endocrinology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994:1698-1738.
- (3) Braverman LE, Utiger RD, eds. *The Thyroid. A fundamental and Clinical Text*. 9th ed. New York: J.B. Lippincott Co, 2000.
- (4) Klee GG. Clinical usage recommendations and analytic performance goals for total and free triiodothyronine measurements. *Clin. Chem.* 1996;42:155-9.
- (5) Surks MI, Shopra IJ, Mariash CN, et al. American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. *J. Am. Med. Assoc.* 1990;263:1529-32.
- (6) Ramsden DB. Thyroid hormones. In: Lawson AM, ed. *Mass Spectrometry*. Berlin: W. de Gruyter: 1989;609-45.
- (7) Alexander NL, Scheig R. Gas chromatography of the trimethylsilyl derivatives of iodotyrosines and iodothyronines. *Anal. Biochem.* 1968;22:187-94.
- (8) Lawson AM, Ramsden DB, Raw PJ, Hoffenberg R. Mass spectrometric studies of thyroxine and related compounds. Trimethylsilyl derivatives. *Biomed. Mass Spec.* 1975;1:374-80.
- (9) Manius GJ, Fallon P, Tscherne R. Identification and determination of thyroxine using gas liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1978;87:496-505.
- (10) Hoffenberg R, Lawson AM, Ramsden DB, Raw PJ. In: Frigerio A, Castagnoli N, eds. *Mass spectrometry in biochemistry and medicine*. New York: Raven Press 1977;303-312.

- (11) Doctor R, Hennemann G. Estimation of thyroid hormones by gas-liquid chromatography. *Clin. Chem. Acta* 1971;34:297-303.
- (12) Leclercq PA, Desiderio DM. A laboratory procedure for the acetylation and permethylation of oligopeptides on the microgram scale. *Anal. Lett.* 1971;4:304-16.
- (13) Zimmerer RO, Grady LT. GLC of sodium thyroxine. *J. Pharm. Sci.* 1971;60:493-5.
- (14) Crossley DN, Ramsden DB. Serum tetraiodothyroacetate (T4A) levels in normal healthy euthyroid individuals determined by gas chromatography-mass fragmentography (GC-MF). *Clin. Chem. Acta* 1979;94:267-72.
- (15) Husek P. Derivatisation of amino acids with 1,3-dichlorotetrafluoroacetone and its use in gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1974;91:475-81.
- (16) Willetts P, Crossley DN, Ramsden DB, Hoffenberg R. The role of thyronine in thyroid hormone metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1979;49:658-60.
- (17) Willetts P. Gas chromatographic-mass fragmentographic measurement of thyronine in human urine. Ph.D. Thesis, University of Birmingham.
- (18) Davis LG, Sass NL, Manna B, Nasynowitz ML. Gas-liquid chromatographic determination of mono- and diiodothyrosines in serum. *Clin. Chem.* 1979;25:218-20.
- (19) Moller B, Bjorkhem J, Falk O, Lanto O, Larsson A. Identification of thyroxine in human breast milk by gas chromatography mass spectrometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983;56:30-4.
- (20) Petersen VA, Vouros P. Analysis of thyroid hormones as their heptafluorobutryl methylester derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1977;49:1304-11.

- (21) De Brabandere VI, Hou P, Stöckl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. Isotope dilution-liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of serum thyroxine as a potential reference method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998;12:1099-103.
- (22) Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Development of a new method for the determination of thyroxine in serum based on isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 1994;23:475-82.
- (23) De Brabandere VI, Stöckl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. On the use of trimethylchlorosilane in methanol for methylation of thyroxine prior to perfluoroacylation and isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1998;33:1032.
- (24) Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, De Leenheer AP. Calibration for isotope dilution mass spectrometry – Description of an alternative to the bracketing procedure. *J. Mass Spectrom.* 1996;31:1119-1125.
- (25) Thienpont LM, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricos C, Siekmann L, Stöckl D. Analytical quality specifications for reference methods and operating specifications for networks of reference laboratories. [Discussion paper from the members of the External Quality Assessment (EQA) Working Group B on target values in EQAS]. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1995;33:949-57.
- (26) Robbins J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. 1996:96-110.
- (27) Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr. Rev.* 1990;11:5-46.
- (28) Ekins R. The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clin. Chem.* 1992;38:1289-93.
- (29) Ekins R. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin. Chem.* 1998;44:2015-30.

- (30) Ekins R. The science of free hormone measurement. Proc UK NEQUAS Meeting. 1998;3:35-59.
- (31) Wang R, Nelson JC, Weiss RM, and Wilcox RB. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. Thyroid 2000; 10:31-9.
- (32) Tikanoja S. Ultrafiltration devices tested for use in a free thyroxine assay validated by comparison with equilibrium dialysis. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1990;50:663-9.
- (33) Ekins R. Validity of analog free thyroxine immunoassays. Clin. Chem. 1987;33:2137-44.
- (34) Liewendahl K. Thyroid function tests: performance and limitations of current methodologies (editorial review). Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1992;52:435-45.
- (35) Chopra IJ, Van Herle AJ, Chua Teco GN, and Nguyen AH. Serum free thyroxine in thyroidal and non-thyroidal illnesses: a comparison of measurements made by radioimmunoassay, equilibrium dialysis and free thyroxine index. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1980;51:135-43.
- (36) De Groot LJ. Dangerous dogmas in Medicine: the nonthyroidal illness syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999;84:151-64.
- (37) Chopra IJ. Simultaneous measurement of free thyroxine and free 3,5,3'-triiodothyronine in undiluted serum by direct equilibrium dialysis/radioimmunoassay: evidence that free triiodothyronine and free thyroxine are in many patients with the low triiodothyronine syndrome. Thyroid 1998;8:249-57.
- (38) Olsen T. Free T4, free T3 and free reverse T3 in dialysates of serum. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1979;39:53-9.

- (39) Weeke J, Boye N, Orskov H. Ultrafiltration method for direct radioimmunoassay measurement of free thyroxine and free triiodothyronine in serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1986;46:381-9.
- (40) Sophianopoulos J, Jerkunica I, Lee CN, Sgoutas D. An improved ultrafiltration method for free thyroxine and triiodothyronine in serum. *Clin. Chem.* 1980;26:159-62.
- (41) Shannon N, Woolf PD. Determination of free thyroxine in serum by ultrafiltration: validation of a method and preliminary results. *Clin. Chem.* 1984;30:1770-3.
- (42) Wang YS, Hershman JM, Pekary E. Improved ultrafiltration method for simultaneous measurement of free thyroxine and free triiodothyronine in serum. *Clin. Chem.* 1995; 31:517-22.
- (43) Lee LA, Mooney RA, Woolf PD. Clinical utility of measuring free thyroxine and free triiodothyronine in serum of critically ill patients by ultrafiltration. *Clin. Chem.* 1986; 32:797-800.
- (44) Tikanoja SH, Liewendahl BK. New ultrafiltration method for free thyroxine compared with equilibrium dialysis in patients with thyroid dysfunction and nonthyroidal illness. *Clin. Chem.* 1990;36:800-4.
- (45) Fogh-Andersen N, Bjerrum PJ, Siggaard-Andersen O. Ionic binding, net charge, and Donnan effect of human serum albumin as a function of pH. *Clin. Chem.* 1993;39:48-52.
- (46) Thode J, Fogh-Andersen N, Siggaard-Andersen M, Siggaard-Andersen O. Donnan effect or protein interference in ionised calcium measurements. *Ann.Clin. Biochem.* 1983;20:271-3.
- (47) Nelson JC, Weiss RM. The effects of serum dilution on free thyroxine (T4) concentration in the low T4 syndrome of nonthyroidal illness? *J. Endocrinol. Metab.* 1985; 61:239-46.

- (48) Holm SS, Andreasen L, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Influence of adsorption and deproteination on potential free thyroxine reference methods. *Clin. Chem.* 2002; 48:108-14.
- (49) Lee ND, Pileggi VJ. Measurement of "free" thyroxine in serum. *Clin. Chem.* 1971; 17:166-73.
- (50) Nelson JC, Tomei RT. Direct determination of free thyroxine in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay. *Clin. Chem.* 1988;34:1737-44.

HOOFDSTUK III

ONTWIKKELING VAN LC-MS-MEETPROCEDURES VOOR DE BEPALING VAN PEPTIDEN EN PROTEÏNEN

III.1. Inleiding

Vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie (LC-MS) is geschikt gebleken voor verschillende toepassingen in de proteïneanalyse. Door de ontwikkeling van “matrix-assisted laser desorption”-ionisatie massaspectrometrie (MALDI-MS) (1, 2) en ESI-MS (3, 4) werden nieuwe mogelijkheden verwezenlijkt voor de analyse van proteïnen. In beide technieken worden ionen in de gasfase geproduceerd, gevolgd door massaspectrometrische analyse. Deze technieken worden vooral toegepast in proteïne karakterisatie zoals de bepaling van het moleculair gewicht, de aminozuursequentie, de tertiaire en quaternaire conformatie,... (5, 6). ESI-MS en MALDI-MS verschillen onderling in een aantal aspecten, zoals bvb. de complexiteit van het verkregen massaspectrum. Bij MALDI-MS worden hoofdzakelijk enkelvoudig geladen ionen gevormd, die leiden tot eenvoudige massaspectra. Dit maakt MALDI-MS heel aantrekkelijk voor de kwantitatieve bepaling van proteïnen of voor de bepaling van verschillende proteïnen in eenvoudige matrices (5). Aangezien MALDI-MS momenteel niet geschikt is om “online” te koppelen aan vloeistofchromatografie (LC), kan het niet toegepast worden voor analyse van complexe biologische matrices. In tegenstelling tot MALDI-MS wordt ESI-MS wel gemakkelijk gekoppeld aan LC. Bij ESI-MS daarentegen worden complexe massaspectra verkregen door de verdeling van ionen met een verschillende lading.

III.1.1. Overzicht van de referentiemeetprocedures voor de bepaling van proteïnen

Door de continue technologische ontwikkelingen in de LC-MS-techniek is LC-MS een algemene techniek geworden in de peptiden- en proteïneanalyse (7-17). Niettegenstaande dit, zijn publicaties over de toepassing van LC-MS in de kwantitatieve analyse van diagnostisch belangrijke polypeptiden/proteïnes in lichaamsvloeistoffen nog steeds heel schaars. Boven-

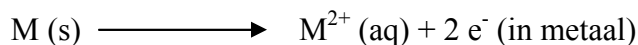
dien wordt er niet steeds gebruik gemaakt van isotoopdilutie. In de 11 gevonden publicaties over LC-MS-analyse van peptiden en proteïnen werd er slechts driemaal gebruik gemaakt van ID. Eén van de redenen waarom ID-LC-MS voor de kwantitatieve analyse van peptiden en proteïnen tot op heden zo weinig gebruikt wordt, hangt samen met het feit dat speciale inspanningen vereist zijn om stabiele isotopisch gemerkte polypeptiden te synthetiseren bvb. het opzuiveren van deze componenten is niet eenvoudig. Dit resulteert in een extreem hoge kostprijs bij de aankoop van een isotopisch gemerkte IS. Zoals reeds in I.2 vermeld, lossen sommige dit probleem op door gebruik te maken van een homoloog (17) of een diastereomeer (15) als IS.

Alvorens over te gaan naar de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van C-peptide in urine (zie hoofdstuk IV), vonden wij het belangrijk eerst voldoende aandacht te besteden aan de typische kenmerken van de detectie op basis van ESI-MS (zie III.2.), de chromatografie en staalopzuivering van peptiden en proteïnen (zie III.3.) en tot slot de stabiliteit van peptiden en proteïnen in oplossing (zie III.4.). Dit waren nl. stuk voor stuk facetten van de ESI-LC-MS-techniek die van groot belang zijn voor het welslagen van de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor C-peptide in urine.

III.2. Detectie van peptiden en proteïnen met electrospray ionisatie massaspectrometrie (ESI-MS)

III.2.1. Kenmerken van massaspectra in ESI

Bij ESI wordt de analyt in oplossing (water of organisch oplosmiddel) verstoven doorheen een “stainless steel” capillair (75 – 150 μm i.d.) met een snelheid van 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ tot 1 mL/min . Op de tip van het capillair, dat zich in de ionenbron onder atmosferische druk bevindt, wordt een hoog elektrische potentiaal (3 tot 4 kV) aangebracht. Vervolgens wordt het staal gedispergeerd in een aërosol van hoog geladen druppeltjes. Dit proces wordt bevorderd door een coaxiaal ingebracht “nebulizing” gas (bvb. stikstof) dat rond het capillair stroomt. De druppeltjes verminderen in grootte door verdamping van het solvent gedurende hun transport in de ionenbron, waardoorheen een warme stroom stikstof of “drying” gas vloeit. De ladingen in de druppeltjes komen dicht bij elkaar en op een bepaald punt zijn de repulsiekrachten groter dan de oppervlaktespanning die de druppels bijeenhoudt (Rayleigh limiet). Hierdoor exploderen zij (Coulomb explosie) in kleinere druppeltjes, waarbij heel kleine, hoog geladen druppeltjes ontstaan. Afhankelijk van de polariteit (+ of -) van het capillair kunnen zowel positieve als negatieve ionen gegenereerd worden. Vervolgens ondergaan deze ionen een elektroforetische beweging in antwoord op het opgelegde elektrisch veld, dat ontstaat door het potentiaalverschil van ~ 3 kV tussen het zeer smalle spraycapillair of de “needle” en de omliggende “counter” elektrode (figuur III.1.). In de positieve ionenmodus worden positief geladen druppels gevormd terwijl, om de ladingsbalans in evenwicht te houden, een oxidatiereactie optreedt aan het capillair:



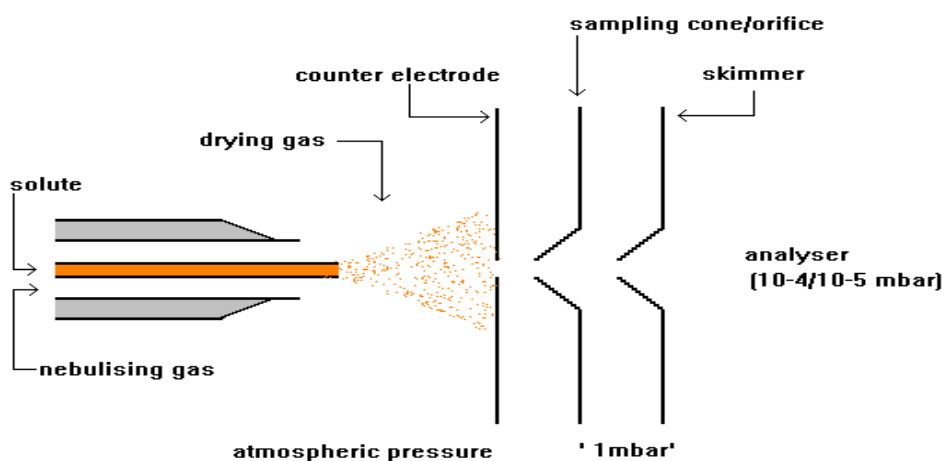
ofwel worden negatieve ionen verwijderd uit de oplossing door elektrochemische reactie:



In de negatieve modus worden reductiereacties waargenomen aan het capillair (18, 19).

De gevormde anionen migreren in de positieve ionenmodus in de richting van het metalen ESI-capillair, terwijl de kationen zich in de richting van de “counter” elektrode begeven. In de negatieve modus is deze beweging uiteraard omgekeerd.

ESI is algemeen gekend als een zachte ionisatiemodus, die bvb. kan gebruikt worden om het moleculair gewicht te bepalen van analyten die normaal buiten het massabereik van quadrupool instrumenten zouden vallen. Voor sterk geprotoneerde analyten van de vorm $[M + nH]^{n+}$ worden ionen met een massa-over-lading (m/z -waarde) overeenkomstig met $(M + n)/n$ gevormd.

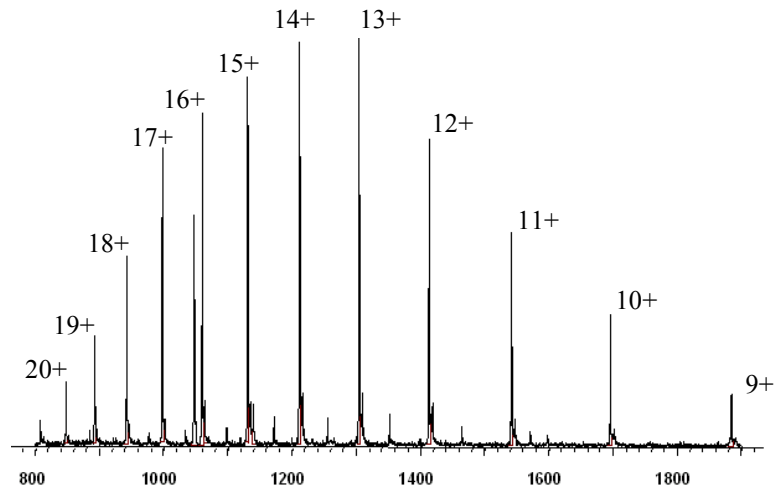


Figuur III.1. Voorstelling van de werking van electrospray ionisatie.

Kleine organische moleculen verschijnen als monogeprotoneerde (of gedeprotoneerde) moleculen in het ESI spectrum, terwijl grotere moleculen, die meerdere basische (zure) zijden bevatten, aanleiding geven tot veelvuldig geprotoneerde (gedeprotoneerde) moleculen. Dit fenomeen, om ionen met meerdere ladingen te vormen, is uniek aan de ESI techniek. In praktisch alle massaspectra van hoog geladen deeltjes wordt een verdeling van ladingen opgemerkt. Op die manier verkrijgt men voor peptiden en proteïnen een verdeling van ionen in het spectrum in de typische envelopvorm (figuur III.2.). De vorm en de verdeling van de envelop langs de m/z -as is afhankelijk van heel wat factoren, zoals het gehalte aan organisch solvent (20), de pH (21, 25), de spanning op de “cone” (21-24) of het type gebruikt zuur of base in het eluens (26, 27).

Verder kunnen we in het algemeen vaststellen dat, door de aanwezigheid van de multipel geladen ionen in de typische envelopvorm, de kwantitatieve bepaling bemoeilijkt wordt. Zo neemt voor proteïnen de ladingsverdeling bijna op een lineaire manier toe met het moleculair gewicht. Dus, hoe groter het proteïne, hoe kleiner het massaverschil (m/z -eenheden) tussen 2 opeenvolgende pieken (x_1 en x_2). Uit $x_1 = (M + n)/n$ en $x_2 = (M + n + 1)/(n + 1)$ kunnen we het aantal ladingen (n) bepalen als $n = (x_2 - 1)/(x_1 - x_2)$.

De selectiviteit van de massaspectrometrische bepaling daalt dus met een stijgend moleculair gewicht van de proteïne. Om de selectiviteit te verhogen, wordt bijgevolg de envelop van ionen vaak in de richting van het hoge massabereik gemoduleerd (zie verder III.2.4.).



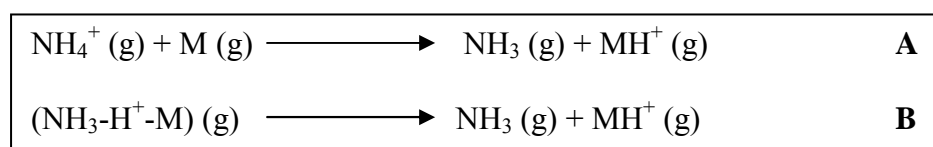
Figuur III.2. Het typisch envelopspectrum van myoglobine (Mr 16951.5), gegenereerd met ESI+.

III.2.1.1. De “wrong-way-round” electrospray ionisatiemodus (WWR)

Positieve ionen ontstaan meestal door de additie van verschillende protonen, alkali kationen (bvb. Na^+ -adducten) of ammoniumionen. Door het omkeren van de polariteit van het elektrisch veld worden negatieve ionen gevormd door de abstractie van protonen of de additie van verschillende anionen. Er wordt aangenomen dat de protonatie voor positieve ionen optreedt aan de basische aminozuurresiduen en de basische functie in het algemeen, zoals: arginine, lysine, histidine en de NH_2 -terminus. Deprotonatie treedt op aan de zure residuen en de zure functie in het algemeen, zoals: aspartaanzuur, glutaminezuur, (tyrosine) en de COOH -terminus. In de negatieve modus kan ook ‘overcharging’ optreden wanneer de hydroxylgroepen van serine en threonine ook gedeprotoneerd worden.

Eind de jaren '90 werd een duidelijke contradictie van dit alles waargenomen door Kelly et al. (28). Zij zagen in de *positieve* ionisatiemodus een envelop van ionen overeenkomend met multipel geprotoneerd myoglobine, afkomstig van initieel *basisch* eluens (pH 10). Dit werd de zogenaamde “wrong-way-round” (w) ionisatiemodus genoemd. In deze modus worden positieve ESI spectra gegenereerd uit basische sprayoplossingen (wESI+) en negatieve ESI spectra uit zure sprayoplossingen (wESI-) (29-32).

Wanneer de geprotoneerde (of gedeprotoneerde) proteïnen niet in voldoende hoge concentraties aanwezig zijn, zoals in sterk basische (zure) oplossingen, dan treedt de ionisatie bij wESI hoofdzakelijk op onder invloed van het elektrisch veld. Op die manier stelt het elektrisch veld een speciaal type van elektrolytische cel voor, die de vereiste ionen opwekt door elektrolyse van het solvent (33). Hoe deze ionen juist gevormd worden, wordt nog steeds onderzocht. Men veronderstelde dat er voor wESI+ gasfase protontransferreacties (figuur III.3.A) of collisioneel geïnduceerde dissociaties (figuur III.3.B) optreden wanneer kleine stikstofhoudende basen zoals NH₄OH of TEA aan het eluens werden toegevoegd (29).



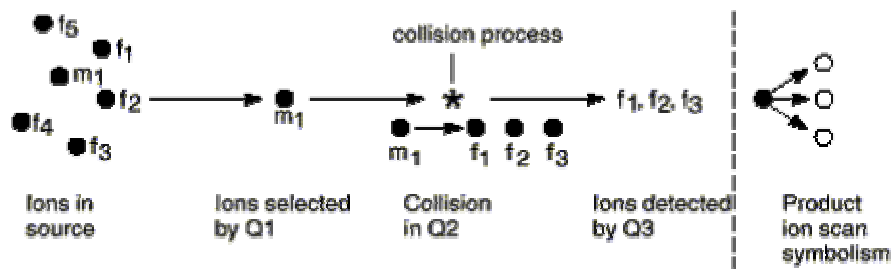
Figuur III.3.A & B. Reactievergelijking van gasfase protontransferreacties (A) of collisioneel geïnduceerde dissociatie (B) met NH₄⁺.

Le Blanc et al. veronderstelde dat het amine en proteïne eerst zullen associëren en later in de gasfase terug dissociëren, met als gevolg dat er een verdeling van de beschikbare lading optreedt tussen het proteïne en de stikstofhoudende base (30). Stalen met een lagere protonaffiniteit dan NH₄OH of TEA verliezen daardoor een proton en worden geneutraliseerd of vormen adducten.

Later werden door Mansoori (31) et al. geprotoneerde moleculen, verkregen van sterke basische oplossingen, vastgesteld in het ESI spectrum. Deze keer werd een elektrolyt, die niet beschouwd kan worden als een protondonor, bvb. tetramethylammoniumhydroxide (TMA-OH), gebruikt om de pH van de oplossing te doen stijgen. Volgend mechanisme werd nu verondersteld: na het toevoegen van de elektrolyt zou een complex ontstaan tussen de analytmolecule, het TMA-kation en het solvent (water). Het TMA-kation wordt verondersteld de dissociatie van water en dus de vorming van [kation + hydroxide] te induceren. Dit gaat gepaard met de vrijstelling van een proton. Dit vrijgestelde proton (afkomstig van het solvent) kan zich dan hechten aan de analytmolecule met vorming van gasfase geprotoneerde moleculen. Op die manier kunnen dus indirect protonen vrijgesteld worden uit het solvent en dit kan een verklaring bieden voor het voorkomen van multipel geprotoneerde moleculen uit sterk basische oplosmiddelen waar de initiële solventprotonatie verwaarloosbaar is. Wat er precies gebeurt bij wESI- is nog niet in detail gekend. Vermoedelijk treden analoge reacties op met basische gasfase bestanddelen zoals OH⁻. Wij vonden het alleszins de moeite om de invloed van deze effecten op de ladingsverdeling van peptiden/proteïnen van naderbij te bekijken (zie verder III.2.4.2.).

II.2.2. Collisie geactiveerde dissociatie

Wanneer men over een triple quadrupool massaspectrometer beschikt, heeft men de mogelijkheid collisie geactiveerde dissociatie (CAD) uit te voeren. Bij CAD worden in de eerste quadrupool (Q1) de precursorionen met de geschikte m/z -waarde, die in de ionenbron van de massaspectrometer gegenereerd werden, geselecteerd en gefocuseerd in de collisioneel (Q2). Hier botsen ze met een inert gas, bvb. argon, waarmee de cel gevuld is. Door de botsingen wordt een deel van de kinetische energie van de ionen omgezet in vibrationele energie. Hierdoor ontstaat een onstabiele geëxciteerde toestand, waarna de ionen fragmenteren. De m/z -waarden van deze fragmentionen worden dan geselecteerd in de derde quadrupool (Q3) (figuur III.4.).



Figuur III.4. Schematische voorstelling van collisie geactiveerde dissociatie van ionen. In Q1 worden de ionen geselecteerd (hier enkel m_1^+). Door botsing met argonmoleculen worden deze ionen in Q2 gedissocieerd tot fragmentionen (f_1^+ , f_2^+ , f_3^+) die gedetecteerd worden in Q3.

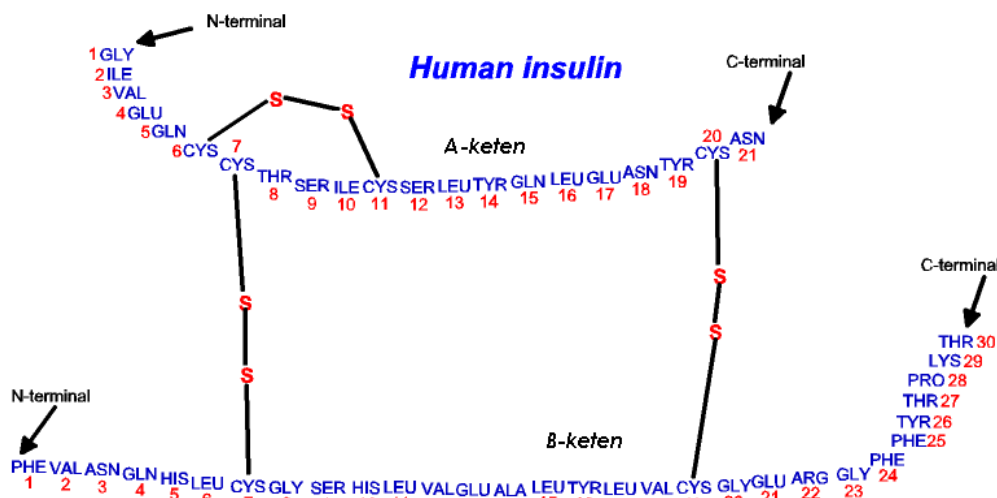
Wanneer lage collisie-energieën (CAD-l) gebruikt worden (10-35 eV), ontstaan sequentie-specifieke fragmenten, die gebruikt kunnen worden voor de structurele opheldering van proteïnen (34, 35). Intense fragmentionen ontstaan meestal door verlies van neutrale fragmenten. Bij hogere collisie-energieën (CAD-h, >80 eV) verkrijgt men meestal enkel informatie over de types aminozuren die aanwezig zijn in het proteïne (36). Bij CAD-l ontstaan fragmenten vooral door splitsing aan de peptidenbindingen, bij CAD-h daarentegen kan zelfs afsplitsing van de zijketens van de aminozuren optreden. Voor de kwantitatieve bepaling van peptiden en proteïnen kan zowel CAD-l als CAD-h aangewend worden (III.2.6.).

Daar waar tandem massaspectrometrie (of CAD) een veelgebruikte techniek is voor peptiden- en proteïneanalyse, moet de kennis van de mogelijkheden van ladingsvermindering met de ESI instrumenten die deze CAD mogelijkheid niet bezitten, nog verder uitgebreid worden. Op een heel eenvoudige manier kan ladingsvermindering verkregen worden door enkel massaspectrometrische parameters, bvb. de spanning van de cone, te optimaliseren (21-

24). Verder is de ladingsverdeling ook afhankelijk van de samenstelling van de spray-oplossing zoals de pH, het percentage organisch solvent en het type van gebruikt zuur of base. Hoewel al deze mogelijke technieken om ladingsvermindering te verkrijgen toepasbaar zijn op standaard ESI instrumenten, heeft recent onderzoek zich toegespitst op de ontwikkeling van instrumenten speciaal ontworpen voor ladingsvermindering, bvb. na reactie met tegengesteld geladen ionen gegenereerd door “dual-source” instrumenten (37-39) of “ion-trap” instrumenten (40-43), of door het toevoegen van ladingsverminderingkamers na de ESI bron (44, 45). Een negatief gevolg van deze gewilde ladingsvermindering is het feit dat de gegenereerde ionen van de proteïnen soms buiten het bereik van een standaard quadrupool instrument (m/z -limiet 3000 à 4000) kunnen vallen. Bijgevolg zijn voor zo’n ladingsverminderingstoepassingen “time-of-flight” instrumenten meer aangewezen.

III.2.3. Doelstelling van de experimenten

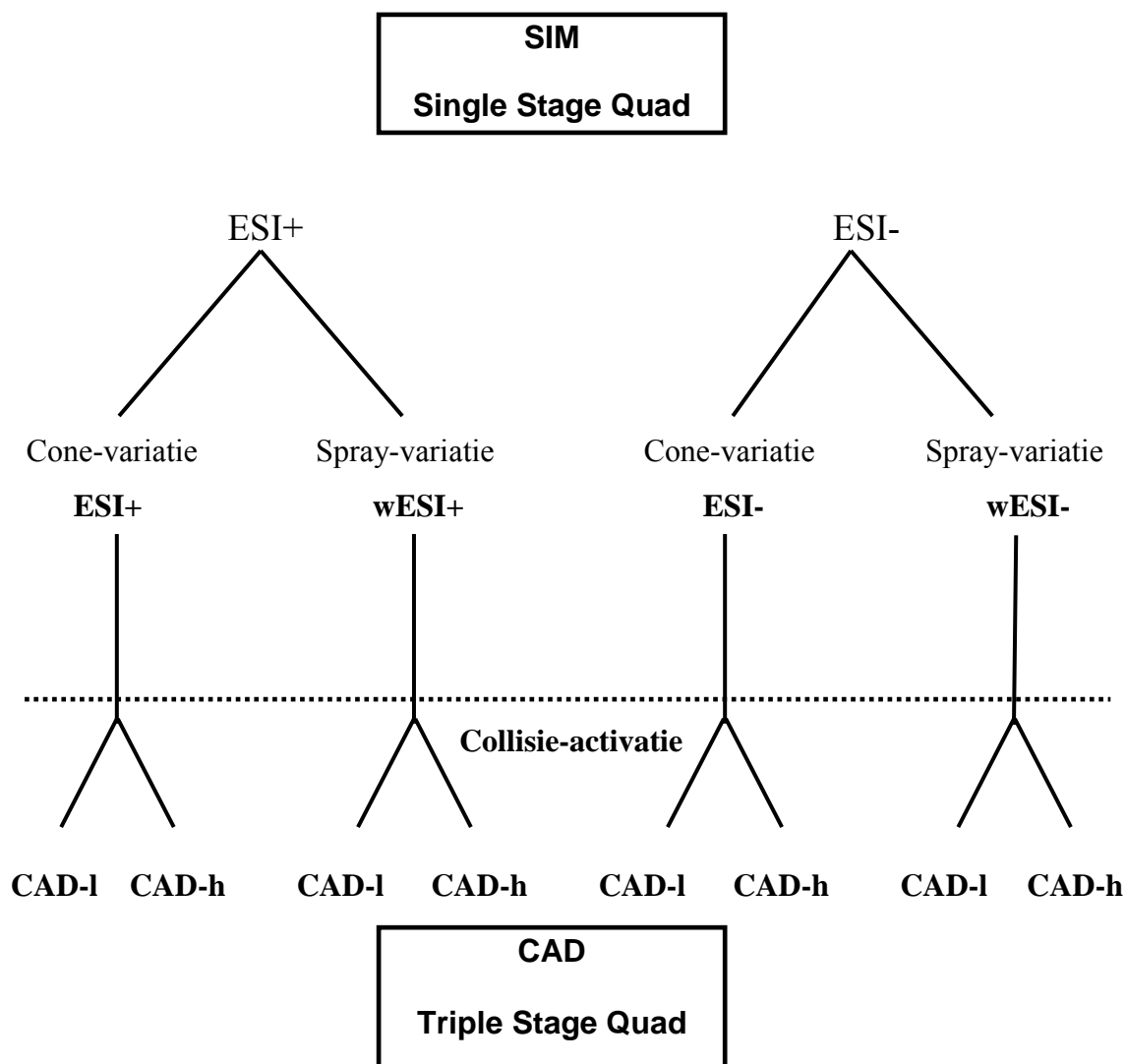
Het was ons objectief alle mogelijke strategieën voor optimalisatie van de sensitiviteit en de selectiviteit van peptiden/proteïnen in ESI-MS met ons instrument te onderzoeken. Hiervoor werd insuline als modelproteïne gebruikt. Insuline is relatief goedkoop en vrij gemakkelijk te verkrijgen. Het is een middelgroot proteïne met een Mr 5807.6. Insuline is samengesteld uit 2 ketens van aminozuren; de 21 aminozuren tellende A-keten en de 30 aminozuren tellende B-keten. Ze zijn beiden door 2 zwavelbruggen met elkaar verbonden, nl. een zwavelbrug tussen het aminozuur op positie B7 en A7 en één tussen posities B19 en A20. Daarnaast is er nog een derde zwavelbrug tussen het aminozuur op positie A6 en A11 aanwezig in de A-keten (figuur III.5).



Figuur III.5. Aminozuursequentie van insuline, afkomstig van de mens.

Wanneer we alle mogelijkheden van ons instrument, een VG Quattro II triple stage massaspectrometer uitgerust met een standaard ESI probe en interface, nagingen om de ladingsverdeling van de ‘ionenenvelop’ van insuline te optimaliseren naar beste S/N-verhouding, verkregen we in totaal 12 verschillende operatiemodi: in de positieve en negatieve SIM-modus konden we de spanning van de cone en samenstelling van spray variëren (wESI), wat 4 verschillende operatiemogelijkheden opleverde. In elk van deze modi kon nog eens CAD-l en CAD-h uitgevoerd worden, wat ons nog eens 4 x 2 extra mogelijkheden bood. Een schematisch overzicht van de 12 verschillende operatiemogelijkheden wordt in figuur III.6. weergegeven.

Nota: ladingsvermindering kon ook verkregen worden door gasfasetransferreacties, maar dit was hier niet van toepassing.



Figuur III.6. Overzicht van de 12 verschillende operatiemogelijkheden van onze VG Quattro II MS voor de optimalisatie van de S/N- verhouding van insulinstandaarden.

III.2.4. Experimenteel gedeelte

Insuline werd aangekocht bij Sigma (St. Louis, MO, Verenigde Staten) en opgelost in ultrapuur water (18.2 mΩ) bereid met een Elga Maxima systeem (Elga, Ltd., Bucks, Groot-Brittannië). Het werd gebruikt zonder verder op te zuiveren. Deze oplossing van insuline (10 μL, ~2 μM in water) werd rechtstreeks in de ESI-MS via de “autosampler” geïnjecteerd met een flow van 100 μL/min. De massaspectrometrische instellingen voor onze metingen worden voorgesteld in tabel III.1.

Tabel III.1. Overzicht van de massaspectrometrische instellingen voor de verschillende ionisatiemodi.

	ESI+	ESI-	wESI+	wESI-
Brontemperatuur	125°C	125°C	125°C	125°C
Spanning op het capillair	+3kV	-3kV	+3.5kV	-3kV
Skimmer lens offset	0V	0V	15V	0V

De MS-spectra werden opgenomen door te scannen over een range van m/z 50 tot m/z 4000, waarbij een scantijd van 0.10 s werd aangehouden. Er werd gebruik gemaakt van verschillende sprayoplossingen, zoals vermeld in tabel III.2., om de verschillende ionisatiemogelijkheden na te gaan.

Tabel III.2. Overzicht van de samenstelling van de sprayoplossingen met bijhorende pH-waarden voor de verschillende ionisatiemodi.

Ionisatiemodus	Samenstelling sprayoplossing (v/v/v)	pH
ESI+	70/30/0.05 H ₂ O/CH ₃ CN/HCOOH	2.8
ESI-	70/30/0.1 H ₂ O/CH ₃ CN/i-prNH ₂ *	11.6
wESI+	70/30/0.015 H ₂ O/CH ₃ CN/TEA	11.3
wESI-	70/30/0.015 H ₂ O/CH ₃ CN/TFA	2.6

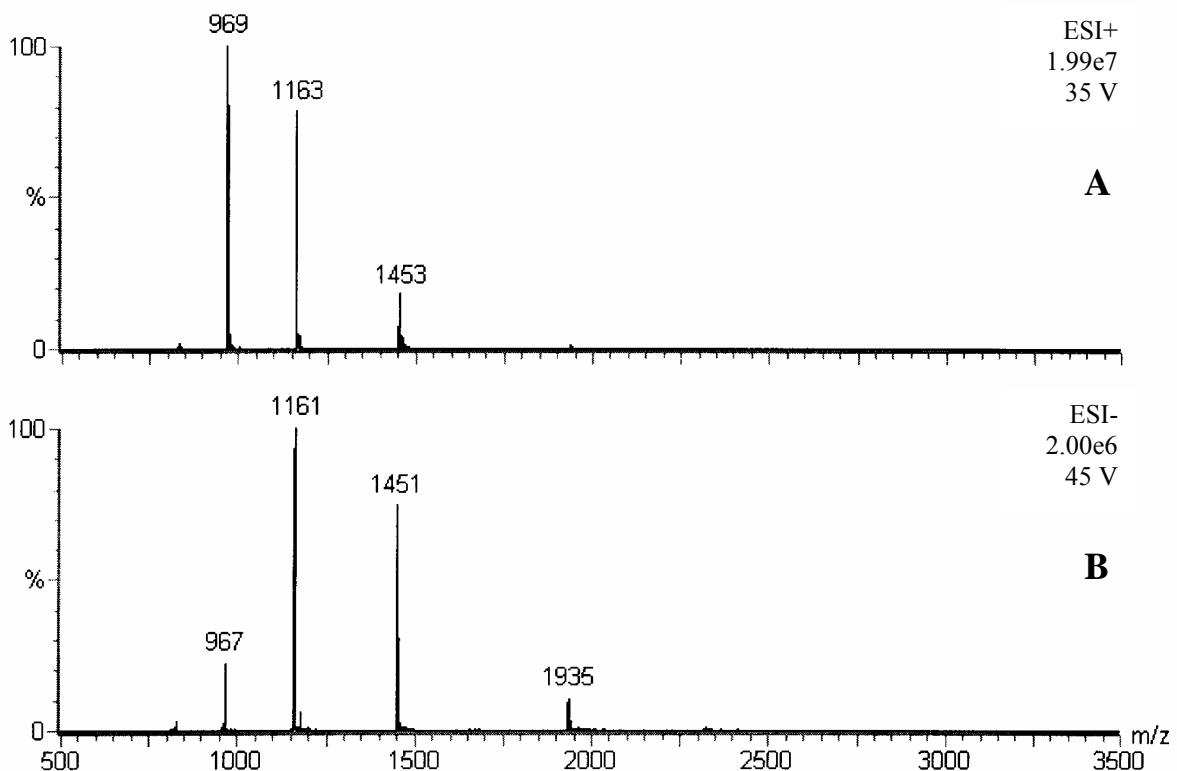
*Nota: i-prNH₂ = isopropylamine

De pH-waarden werden bepaald met een Consort C831 pH meter (Turnhout).

III.2.5. Modulatie van de ladingsverdeling in “single ion monitoring” (SIM)

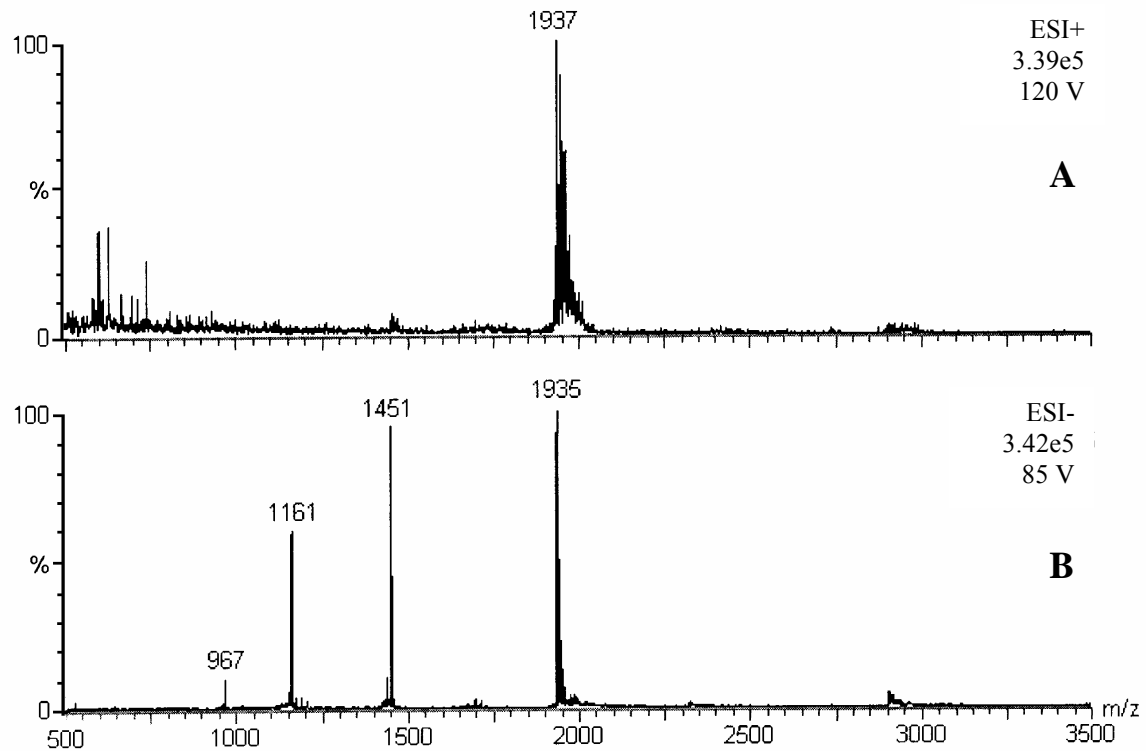
III.2.5.1. Invloed van de “cone”spanning in ESI+ en ESI-

Allereerst gingen we na hoe de ladingen van insuline verschoven konden worden door de spanning op de cone te wijzigen (21-24). De cone is het onderdeel van de MS waar de ionen verzameld worden om de ionenbron (onder atmosferische druk) te verlaten en naar het vacuüm gedeelte van de MS te gaan. Deze invloed op de ladingsverdeling werd nagegaan door de spanning op de cone te variëren van 30 V naar 120 V in stappen van 15 V, voor fijnregulatie werden stappen van 5 V gebruikt. Telkens werd de invloed hiervan vergeleken ten opzichte van het basisspectrum, dat werd opgenomen in zowel de positieve als negatieve ionisatiemodus bij een geoptimaliseerde conespanning voor een maximale totale ionenintensiteit. De conespanningen voor het basisspectrum waren als volgt: een conespanning van +35 V voor ESI+ en -45 V voor ESI- (figuur III.7.A & B).



Figuur III.7.A & B. Basisspectra van insuline bij condities voor maximale totale ionenintensiteit in (A) ESI+ en (B) ESI-.

Wanneer we de spanning op de cone lieten toenemen, zagen we, dat er zowel in ESI+ als ESI- een duidelijke verschuiving van de ladingsverdeling naar hogere massa's optrad. In ESI+ bvb. verschoof de maximale ladingstoestand van lading 6+ (m/z 969) in het basisspectrum naar lading 3+ (m/z 1937) bij cone 120V (vergelijk figuur III.7.A met figuur III.8.A). Dezelfde vaststellingen werd ook door Marie et al. gemaakt, die de invloed van de spanning van de cone op de kationisatie (natrium en cesium) van runderinsuline naging (21).



Figuur III.8.A & B. Weergave van het (A) ESI+ en (B) ESI- massaspectrum van insuline, geoptimaliseerd voor lading 3 onder de condities zoals voorgesteld in tabel III.3. met een \$-teken.

Deze verschuiving naar het hogere massabereik door een hogere conespanning kan als volgt verklaard worden (23):

- i) een hogere spanning op de cone verbetert de focussing van de ionen met een hogere m/z -waarde.
- ii) een gestegen potentiaal bevordert de afsplitsing van protonen van de proteïnen.
- iii) door een gestegen potentiaal zullen ionen, die een hoge lading dragen, gemakkelijker fragmenteren in tegenstelling tot die met een kleinere lading.

Wanneer we de invloed van de conespanning op de S/N-verhouding nagingen in ESI+, merkten we op dat bij stijging en optimalisatie van de conespanning voor lading 3+ (m/z 1937) en 2+ (m/z 2905), de S/N-verhouding voor deze ionen duidelijk verbeterde in vergelijking met de S/N-verhouding voor dezelfde ionen in het basisspectrum. De S/N-verhouding steeg nl. van ~ 400 naar ~ 2800 voor lading 3+ (m/z 1937) en van <3 naar ~ 40 voor lading 2+ (m/z 2905). De beste S/N-verhouding, nl. ~ 20000 werd verkregen in het basisspectrum voor lading 6+ (m/z 969) (tabel III.3.). Figuur III.8.A stelt het massaspectrum voor van insuline opgenomen bij cone 120 V in ESI+. Bovendien worden nu ook meer adductionen opgemerkt die een daling van de S/N-verhouding en een verhoogd risico voor interferentie in de analyse teweegbrengen.

Wat ESI- betreft, gaf een stijging van de conespanning nog een sterkere verbetering van de S/N-verhouding voor de ionen met een lading 4- (m/z 1451) of 3- (m/z 1953) in vergelijking met ESI+. De S/N-verhouding verbeterde respectievelijk van ~ 4500 naar ~ 10500 en van ~ 600 naar ~ 10000 . In tabel III.3. wordt een overzicht gegeven van de S/N-verhoudingen, zoals verkregen door de conespanning te optimaliseren voor elk ion in ESI+ en ESI-.

Tabel III.3. S/N-verhoudingen voor metingen in ESI+ en ESI-, zoals verkregen door de conespanning te optimaliseren voor elk ion.

Modus	Ion (m/z)	Lading	Conespanning (V)	S/N-verhouding	S/N-verhouding (basisspectrum)
ESI+	969	6	35	20000	20000
	1163	5	60	18000	16000
	1453	4	80	8000	4000
	1937	3	120	2800 (§)	400
	2905	2	120	40	<3
ESI-	967	6	45	1800	1800
	1161	5	45	6000	6000
	1451	4	65	10500	4500
	1935	3	85	10000 (§)	600
	2903	2	30-200	<3	<3

(§) condities zoals voorgesteld in figuur III.8.A & B.

In het algemeen stelden we vast, bij de vergelijking van de invloed van de conespanning op de massaspectra in ESI+ en ESI-, dat de totale kwaliteit, bepaald voor de gevoeligheid, fragmentatie en adductvorming, van het ESI- spectrum meer robuust was voor een stijging van de conespanning in vergelijking met het ESI+ spectrum (vergelijk figuur III.7.A & III.8.A met figuur III.7.B & III.8.B).

Een toepassing van de bepaling van insuline met een “single quad” instrument werd beschreven door Kippen et al. (9). De metingen werden uitgevoerd in de ESI+ modus en m/z 1163 of lading 5+ werd geselecteerd om te monitoren.

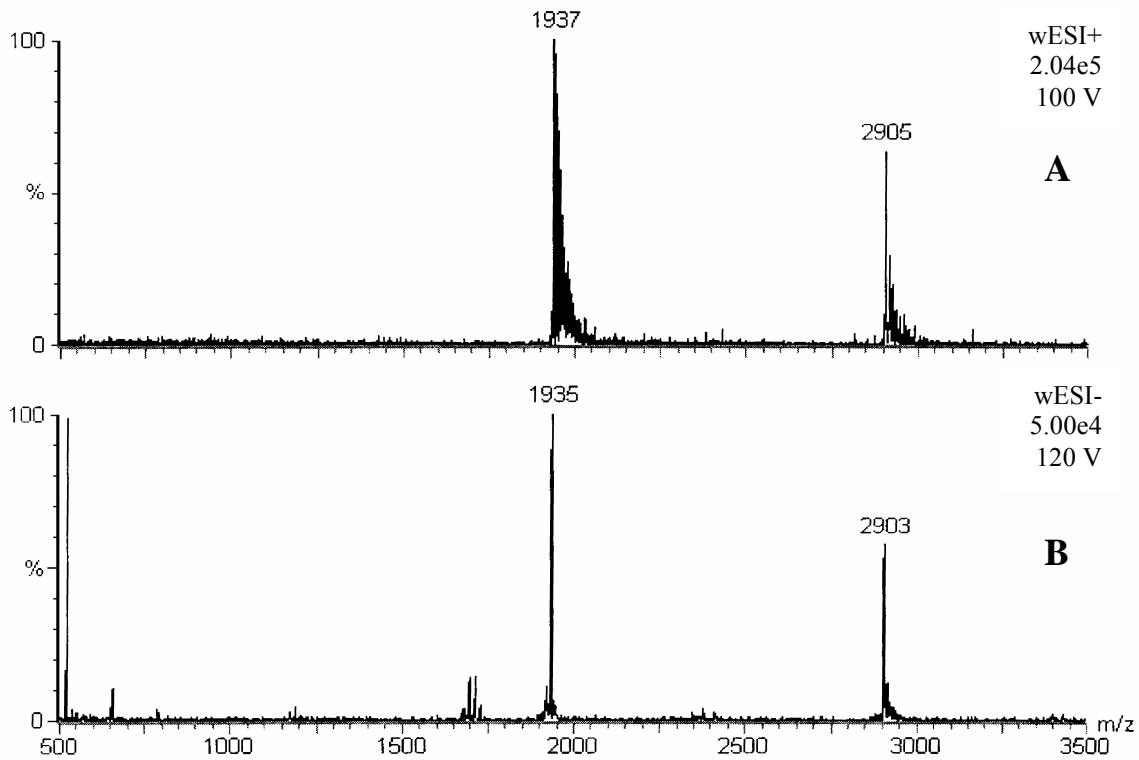
III.2.5.2. Invloed van de samenstelling van de spray (wESI+ en wESI-)

De verschuiving van de ladingen in de richting van de hogere massa's werd nagegaan, gebruik makend van de WWRionisatie. Een eerste belangrijk verschil tussen wESI+/- en ESI+/- was dat het ion met lading 2+/- (m/z 2905/2903) nu voor het eerst wel gegenereerd kon worden met een voldoende intensiteit. Dit wordt voorgesteld in figuur III.9.A & B. De S/N-verhoudingen die verkregen werden voor dit ion waren weliswaar nog steeds veel lager dan deze verkregen voor het ion met lading 3- (m/z 1935) in wESI-. De S/N-verhoudingen bedroegen nl. ~1250 in wESI+ en ~250 in wESI- voor lading 2+/- (m/z 2905/2903), terwijl de S/N-verhouding voor lading 3- (m/z 1935) in wESI- daarentegen ~20000 bedroeg. Hieruit konden we besluiten dat WWRionisatie het meest effectief is voor ladingsvermindering.

Tabel III.4. geeft een overzicht van de verschillende S/N-verhoudingen verkregen in wESI+ en wESI- bij optimale conespanning voor elk ion.

Bij een onderlinge vergelijking van ESI+ en wESI+ merkten we op dat wESI+ iets lagere conespanningen vereiste dan ESI+. Dit resulteerde in een kleiner risico voor ‘in-source’ fragmentatie. Het negatieve aspect van wESI+ t.o.v. ESI+ is de vorming van meer adduct-ionen (vergelijk figuur III.8.A en III.9.A). Wanneer echter SIM-bepalingen dienen uitgevoerd te worden in complexe matrices wordt de voorkeur gegeven de hogere massa's te monitoren, wegens de grotere selectiviteit, en is hier wESI- (bvb. bij m/z 1935) de verkozen modus.

Desalniettemin wordt het aangeraden, bij het ontwikkelen van een kwantitatieve bepalingprocedure, de verschillende modi stapsgewijs te onderzoeken om zo het optimum, met de beste S/N-verhouding, te bereiken.



Figuur III.9.A & B. Weergave van het (A) wESI+ en (B) wESI- massaspectrum van insuline, geoptimaliseerd voor lading 2 onder de condities zoals voorgesteld in tabel III.4. met een \$-teken.

Tabel III.4. S/N-verhoudingen voor metingen bij geoptimaliseerde conespanning voor elk ion zoals verkregen in de WWRionisatiemodus.

Modus	Ion (m/z)	Lading	Conespanning (V)	S/N-verhouding
wESI+	969	6	30-200	<3
	1163	5	30-200	<3
	1453	4	30-200	<3
	1937	3	80	3000
	2905	2	100	1250 (\$)
wESI-	967	6	30-200	<3
	1161	5	30-200	<3
	1451	4	30-200	<3
	1935	3	80	20000
	2903	2	120	250 (\$)

(\$) condities zoals voorgesteld in figuur III.9.A & B.

III.2.6. Optimalisatie voor collisioneel geactiveerde dissociatie (CAD)

Zoals reeds in III.2.2 vermeld, hebben massaspectrometers met een triple stage quadrupool het voordeel dat ze niet enkel in SIM metingen kunnen uitvoeren, maar ook de mogelijkheid hebben CAD uit te voeren. CAD kan uitgevoerd worden gebruik makend van lage of hoge collisioneel-energieën. CAD-h spectra zijn meestal het resultaat van enkelvoudige botsingen tussen de precursorionen en de moleculen van het inerte gas (bvb. argon). De CAD-l spectra daarentegen zijn het resultaat van meerdere botsingen. Bij proteïnen en peptiden treden de splitsingen bij CAD het meest op aan de ‘peptidenbinding’ en dit gaat soms gepaard met een transfer van 1 of 2 waterstoffen om een stabiele ionenstructuur te vormen.

Voor de CAD-l experimenten werd de collisioneel-energie gevarieerd tussen 10 en 35 eV in stappen van 3 eV. De fijnregulatie gebeurde in stappen van 1 eV, want bij CAD-l kunnen verschillen in de grootteorde van 2 eV en 4 eV duidelijke wijzigingen teweegbrengen in het CAD-l spectrum. Voor CAD-h werd de spanning gevarieerd tussen 80 en 200 eV in stappen van 15 eV. De fijnregulatie was niet zo gevoelig en gebeurde in stappen van 5 eV.

III.2.6.1. CAD-“low” experimenten

Voor elk ion stelden we de optimale conespansing in, zoals bepaald in III.2.5.1. en optimaliseerden we de collisioneel-energie (tussen 10 en 35 eV) om de beste S/N-verhouding voor het meest gevoelige dochter- of fragmention te verkrijgen. Dit werd toegepast voor de 4 verschillende operatiemodi, nl. ESI +/- en wESI+/. In tabel III.5. wordt een overzicht gegeven van de S/N-verhoudingen voor de dochterionen van de 5 verschillende precursorionen die verkregen werden na instelling van de optimale spanning van de collisioneel-energie.

Uit tabel III.5. kan afgeleid worden dat de beste S/N-verhoudingen voor de CAD-l instellingen verkregen werden voor de transitie m/z 969>1129 in ESI+, nl. een S/N-verhouding van ~10000, en voor de transitie m/z 1935>1695 in ESI-, nl. een S/N-verhouding van ~4000. In de praktijk is het toch mogelijk dat de voorkeur er naar uit gaat de metingen uit te voeren in ESI-, ondanks de lagere S/N-verhouding, en dit wegens de hogere selectiviteit van het precursorion. Deze selectiviteit kan voor sommige matrices wel noodzakelijk zijn.

We merkten ook op dat de fragmentatie-efficiëntie voor de ladingen 2 en 3 zeer laag was, bvb. voor m/z 1937 en 2905 in ESI+. Dit stemde overeen met de stelling van Loo et al., dat de hogere ladingen (bvb. 5+/- en 6+/-) een verhoogde fragmentatie-efficiëntie vertonen (46, 47). Daarbij hebben de precursorionen met lading 2 en 3 in ESI+/- zelf al een relatief lage

intensiteit. In de wESI+/- modus, die het spectrum verschuift ten voordele van de precursorionen met een kleinere lading, kon enkel voor de transitie m/z 1935>1696 een voldoende hoge S/N- verhouding (~3000) verkregen worden.

Tabel III.5. S/N-verhoudingen voor CAD-I condities bij optimale conespanning voor de 5 precursorionen in de 4 verschillende operatiemodi.

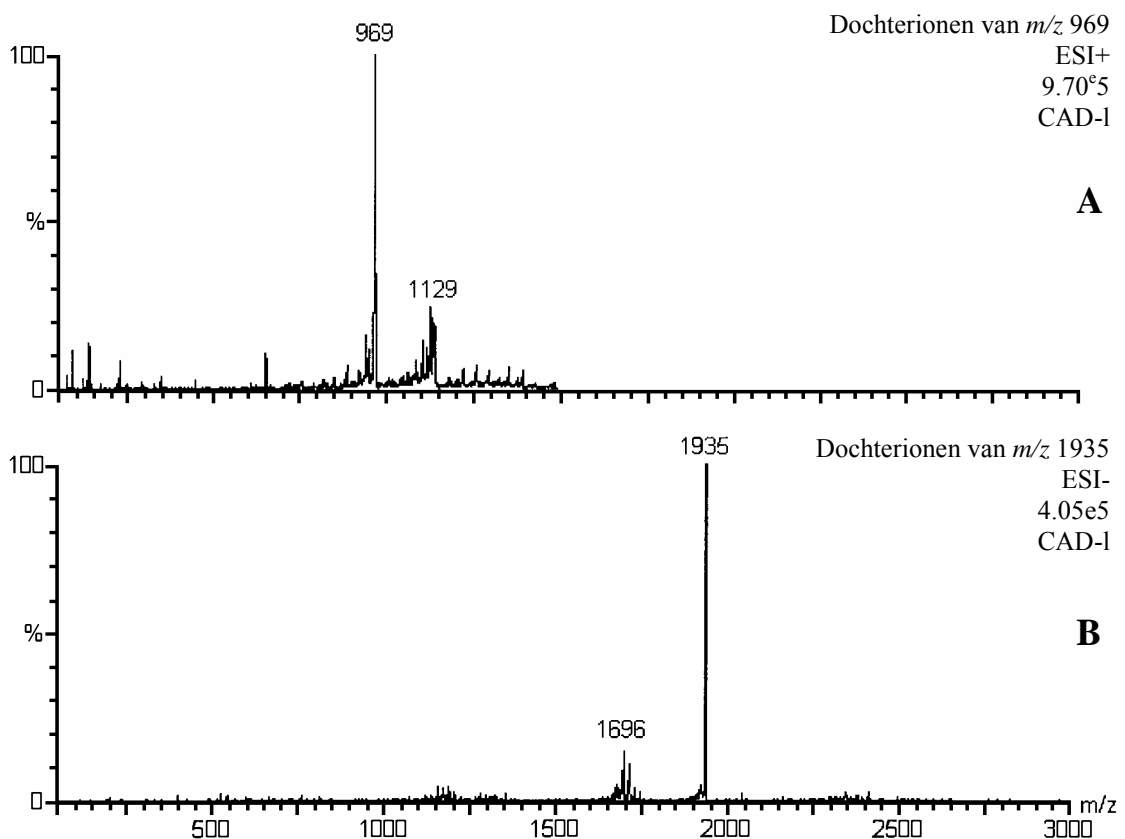
Modus	Precursor-ion (m/z)	Dochterion (m/z)	Collisie-energie (eV)	Conespanning (V)	S/N-verhouding
ESI+	969	1129	22	35	10000 (\$)
	1163	652	21	60	2000
	1453	1808	18	80	2300
	1937	na	na	na	na
	[2905]#	na	na	na	na
ESI-	967	na	na	na	na
	1161	1258	25	45	1400
	1451	1189	20	65	2000
	1935	1696	23	85	4000 (\$)
	[2903]#	na	na	na	na
wESI+	[969]#	na	na	na	na
	[1163]#	na	na	na	na
	[1453]#	na	na	na	na
	1937	na	na	na	na
	2905	2844	28	100	300
wESI-	[967]#	na	na	na	na
	[1161]#	na	na	na	na
	[1451]#	na	na	na	na
	1935	1696	25	80	3000
	2903	3379	25	120	180

onvoldoende gevoeligheid voor het precursorion (zie ook tabel III.3. en III.4.).

(\$) condities zoals voorgesteld in figuur III.10.

na = niet toepasbaar ("not-applicable"); de S/N-verhouding was <3 of er was onvoldoende intensiteit voor het precursorion en/of het dochterion.

Figuur III.10. geeft CAD-1 spectra in ESI+/- weer. Deze werden gekenmerkt door de aanwezigheid van verschillende fragmentionen, die min of meer op een symmetrische wijze rond het precursorion verdeeld waren (46, 47). Het was ook duidelijk zichtbaar dat de intensiteit van de verkregen dochterionen, bij geoptimaliseerde instellingen, in het algemeen slechts 10 à 20% bedroeg van die van de precursorionen. De identificatie van de dochterionen, afkomstig van precursorionen met meerdere ladingen, is helemaal niet eenvoudig (34, 46, 47) en het viel buiten ons objectief om deze te identificeren.



Figuur III.10.A & B. Weergave van de CAD-1 spectra in (A) ESI+ en (B) ESI- onder de condities zoals weergegeven in tabel III.5. met een \$-teken.

III.2.6.2. CAD-“high” experimenten

Opnieuw werd voor elk ion de optimale conespansing ingesteld zoals bepaald in II.2.5.1. Nu werd de collisione-energie voor CAD-h (tussen 80 en 200 eV) geoptimaliseerd om de beste S/N-verhouding voor het meest gevoelige dochterion te verkrijgen. Dit werd eveneens toegepast in de 4 verschillende operatiemodi en de S/N-verhoudingen worden voorgesteld in tabel III.6.

In het algemeen kon men besluiten dat CAD-h efficiënter is dan CAD-l, maar de verkregen fragmentionen (in het massabereik $m/z < 300$) zijn nu meestal aminozuren, dipeptiden of immoniumionen ($H_2N^+=CHR$) die gelijkaardig zijn voor allerlei proteïnen. Hierdoor is CAD-h veel minder specifiek in vergelijking met de fragmenten die verkregen worden bij CAD-l (36).

Tabel III.6. S/N-verhoudingen voor CAD-h condities bij optimale conespanning voor de 5 precursorionen in de 4 verschillende operatiemodi.

Modus	Precursor-ion (m/z)	Dochter-ion (m/z)	Collisie-energie (eV)	Conespanning(V)	S/N-verhouding
ESI+	969	84	150	35	12000
	1163	84	130	60	15000 (§)
	1453	72	130	80	7000
	1937	110	150	120	1400
	[2905]#	na	na	na	na
ESI-	967	73	125	45	30
	1161	127	100	45	1400
	1451	127	100	65	4000 (§)
	1935	255	125	85	4000
	[2903]#	na	na	na	na
wESI+	[969]#	na	na	na	na
	[1163]#	na	na	na	na
	[1453]#	na	na	na	na
	1937	84	150	80	2000
	2905	219	175	100	550
wESI-	[967]#	na	na	na	na
	[1161]#	na	na	na	na
	[1451]#	na	na	na	na
	1935	127	125	80	2200
	2903	223	125	120	600

onvoldoende gevoeligheid voor het precursorion (zie ook tabel III.3. en III.4.).

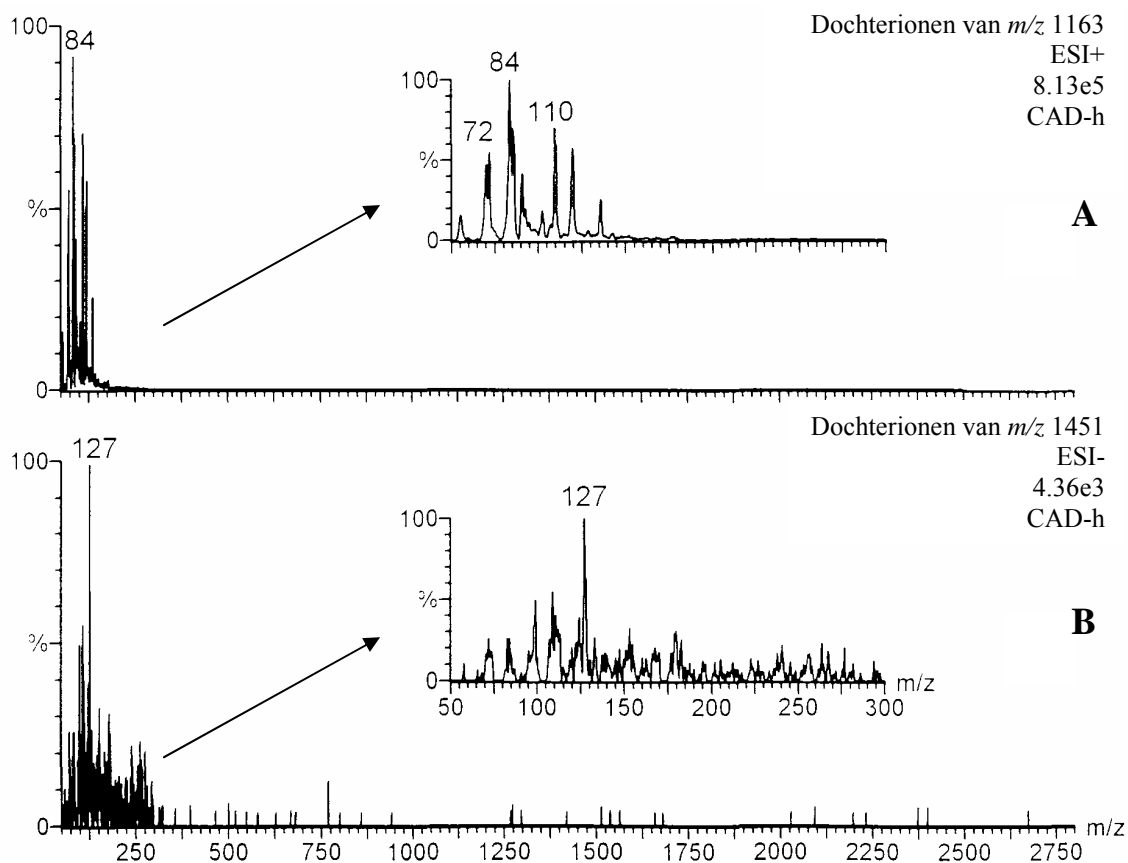
(§) voor respectievelijke spectra: zie figuur III.11.A & B.

na = niet toepasbaar ("not-applicable"); de S/N-verhouding was < 3 of er was onvoldoende intensiteit voor de precursor en/of het dochterion.

Voor CAD-h werden de beste S/N-verhoudingen verkregen in de ESI+ modus voor de transitie m/z 1163>84, nl. S/N ~15000, en in ESI- voor de transitie m/z 1935>255 of m/z 1451>127, nl. S/N ~4000. In CAD-h was het ook mogelijk om spectra te genereren van de ionen met een kleinere lading (nl. 3 of 2), maar de hiervoor verkregen S/N-verhoudingen waren merkkelijk lager dan deze die verkregen werden voor de hogere ladingen.

In figuur III.11.A & B zijn CAD-h spectra voor m/z 1163 en 1451 in ESI+ en ESI- respectievelijk, voorgesteld. Ook hier was het niet ons objectief de fragmentatie in detail na te gaan. Niettegenstaande konden we wel enkele ionen, karakteristiek voor bepaalde aminozuren, onderscheiden. Elk aminozuurresidu leidt nl. tot een diagnostisch belangrijk immoniumion, uitgezonderd de 2 paren leucine en isoleucine, en lysine en glutamine, die immoniumionen produceren met dezelfde massa, nl. m/z 86 en 101 respectievelijk.

In ESI+ vermoeden we dat het ion met m/z 72 het immoniumion van valine is (insuline bevat 4 valines, nl. op posities A₃, B_{2,12,18}) en dat het ion met m/z 110 het immoniumion voor histidine (2 histidines op posities B_{5,10}) is. Het ion met m/z 84 is mogelijks een fragmention van lysine (positie B₂₉), glutaminezuur (positie A_{4,17} en B_{13,21}) of glutamine (positie A_{5,15} en B₄). In ESI- zou het ion met m/z 127 het immoniumion voor arginine kunnen zijn (positie B₂₂).

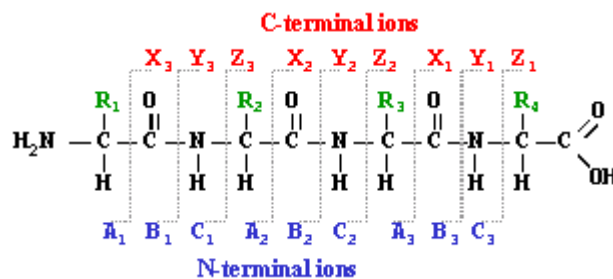


Figuur III.11.A & B. Weergave van de CAD-h spectra in (A) ESI+ en (B) ESI- onder de condities zoals weergegeven in tabel III.6. met een \$-teken.

III.2.6.3. Benaming van de fragmentionen van peptiden en proteïnen

Zoals uit III.2.6. duidelijk werd, kunnen verschillende fragmentionen gevormd worden door het uitvoeren van CAD op peptiden en proteïnen. De types van fragmentionen zijn afhankelijk van verschillende factoren, zoals de primaire sequentie, de hoeveelheid interne energie, de manier waarop de energie geïntroduceerd wordt, de lading die het peptide draagt, enz. De huidige nomenclatuur voor deze fragmentionen werd in 1984 door Roepstorff en Fohlman voor het eerst voorgesteld (48), vervolgens werd die door Johnson et al. in 1987 gewijzigd (49).

De verschillende fragmenten zullen enkel massaspectrometrisch gedetecteerd worden wanneer zij zelf ten minste ook één lading dragen. In figuur III.12. wordt de nomenclatuur voor de verschillende fragmentionen, zoals voorgesteld door Roepstorff en Fohlman, weergegeven.



Figuur III.12. Voorstelling van de nomenclatuur van de verschillende fragmentionen zoals voorgesteld door Roepstorff en Fohlman.

Wanneer de lading zich op het N-terminale fragment bevindt, wordt het ion geclassificeerd als een a_n , b_n of c_n type. Wanneer de lading zich op de C-terminus bevindt, is het ion van het type x_n , y_n of z_n . Het subscriptnummer wijst op het aantal residuen in het fragment (te tellen vanaf de N- of C-terminus, respectievelijk). Het aantal waterstofatomen, die getransfereerd worden naar of afgesplitst worden van het fragment, worden aangeduid met een apostrof rechts of links van de letter, respectievelijk.

Aangezien in hoofdstuk IV een referentiemeetprocedure voor C-peptide (bevat 31 aminozuren, Mr 3020) ontwikkeld zal worden, hebben we hier de gebruikte fragmentionen van C-peptide geïdentificeerd.

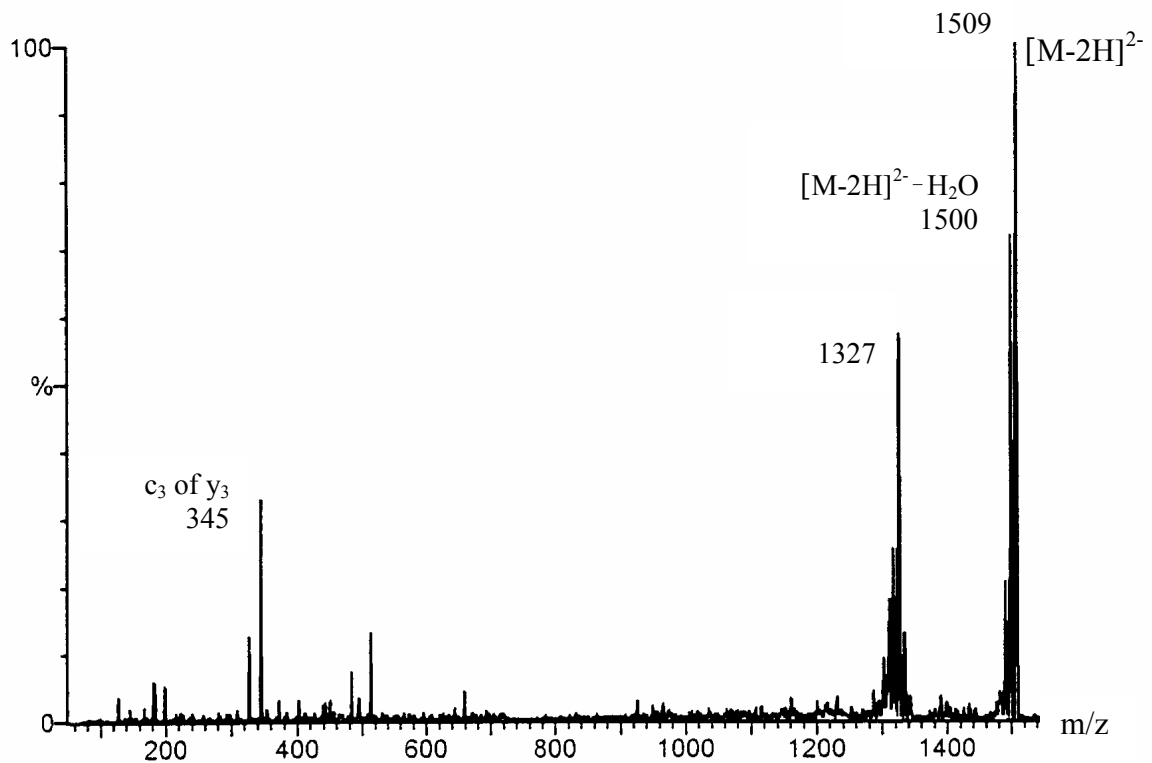
In tabel III.7. wordt een overzicht gegeven van de enkelvoudig negatief geladen fragmentionen van C-peptide. Nota: wegens het te groot worden van de tabel worden de meervoudig geladen fragmentionen niet weergegeven.

Tabel III.7. Overzicht van de enkelvoudig negatief geladen fragmentionen van C-peptide.

m/z	fragment	m/z	fragment	m/z	fragment	m/z	fragment	m/z	fragment
100,11	A ₁	795,85	a ₈ -NH ₃	1364,57	y ₁₄ -H ₂ O	1763,89	b ₁₉	2359,63	x ₂₅
110,11	B ₁ -H ₂ O	800,86	c ₇	1365,55	y ₁₄ -NH ₃	1780,92	c ₁₉	2373,61	b ₂₅
128,12	B ₁	810,95	y ₈ -H ₂ O	1366,56	z ₁₄	1803,05	y ₂₀ -H ₂ O	2390,64	c ₂₅
128,12	Y ₁ -NH ₃	811,93	y ₈ -NH ₃	1367,48	b ₁₃	1804,06	y ₂₀ -NH ₃	2441,73	a ₂₆ -NH ₃
129,13	Z ₁	812,88	a ₈ -NH ₃	1379,49	a ₁₄ -NH ₃	1805,05	z ₂₀	2443,75	y ₂₆ -H ₂ O
145,15	C ₁	812,94	z ₈	1382,58	y ₁₄	1805,92	a ₂₀ -NH ₃	2444,74	y ₂₆ -NH ₃
145,15	y ₁ -NH ₃	822,87	b ₈ -H ₂ O	1384,51	c ₁₃	1821,07	y ₂₀	2445,74	z ₂₆
171,15	x ₁	823,86	b ₈ -NH ₃	1396,52	a ₁₄	1822,95	a ₂₀	2458,76	a ₂₆ -NH ₃
171,19	a ₂	828,96	y ₈	1406,52	b ₁₄ -H ₂ O	1832,85	b ₂₀ -H ₂ O	2461,77	y ₂₆
181,19	b ₂ -H ₂ O	840,89	b ₈	1407,5	b ₁₄ -NH ₃	1833,93	b ₂₀ -NH ₃	2468,76	b ₂₆ -H ₂ O
199,2	b ₂ -H ₂ O	854,96	x ₈	1408,58	x ₁₄	1847,06	x ₂₀	2469,74	b ₂₆ -NH ₃
216,23	c ₂	857,92	c ₈	1421,62	y ₁₅ -H ₂ O	1850,96	b ₂₀	2486,77	b ₂₆
241,28	y ₂ -NH ₃	908,06	y ₉ -H ₂ O	1422,6	y ₁₅ -NH ₃	1868	c ₂₀	2487,76	x ₂₆
242,29	z ₂	909,05	y ₉ -NH ₃	1423,61	z ₁₅	1919,08	a ₂₁ -NH ₃	2503,81	c ₂₆
258,32	y ₂ -NH ₃	923,98	a ₉ -NH ₃	1424,53	b ₁₄	1932,17	y ₂₁ -H ₂ O	2556,91	y ₂₇ -H ₂ O
284,31	x ₂	926,08	y ₉	1436,54	a ₁₅ -NH ₃	1933,15	y ₂₁ -NH ₃	2557,9	y ₂₇ -NH ₃
300,31	a ₃	941,01	a ₉	1439,63	y ₁₅	1934,16	z ₂₁	2558,91	z ₂₇
310,3	b ₃ -H ₂ O	951	b ₉ -H ₂ O	1441,56	c ₁₄	1936,11	a ₂₁	2570,85	a ₂₇ -NH ₃
327,38	y ₃ -H ₂ O	951,99	b ₉ -NH ₃	1453,57	a ₁₅	1946,11	b ₂₁ -H ₂ O	2574,93	y ₂₇
328,32	b ₃ -H ₂ O	952,07	x ₉	1463,57	b ₁₅ -H ₂ O	1947,09	b ₂₁ -NH ₃	2587,88	a ₂₇
328,36	y ₃ -NH ₃	969,02	b ₉	1464,55	b ₁₅ -NH ₃	1950,19	y ₂₁	2597,88	b ₂₇ -H ₂ O
329,37	z ₃	986,05	c ₉	1465,63	x ₁₅	1964,13	b ₂₁	2598,86	b ₂₇ -NH ₃
345,35	c ₃	1023,11	a ₁₀ -NH ₃	1481,58	b ₁₅	1976,18	x ₂₁	2600,92	x ₂₇
345,39	y ₃	1036,2	y ₁₀ -H ₂ O	1498,62	c ₁₅	1981,16	c ₂₁	2615,89	b ₂₇
371,39	x ₃	1037,18	y ₁₀ -NH ₃	1518,74	y ₁₆ -H ₂ O	2031,3	y ₂₂ -H ₂ O	2627,9	a ₂₈ -NH ₃
384,43	y ₄ -H ₂ O	1038,19	z ₁₀	1519,75	y ₁₆ -NH ₃	2032,29	y ₂₂ -NH ₃	2632,92	c ₂₇
385,42	y ₄ -NH ₃	1040,14	a ₁₀	1533,66	a ₁₆ -NH ₃	2033,3	z ₂₂	2644,93	a ₂₈ -NH ₃
386,42	z ₄	1050,14	b ₁₀ -H ₂ O	1536,75	y ₁₆	2047,22	a ₂₂ -NH ₃	2654,93	b₂₈-H₂O
402,45	y ₄	1051,12	b ₁₀ -NH ₃	1550,69	a ₁₆	2049,32	y ₂₂	2655,91	b ₂₈ -NH ₃
415,4	a ₄	1054,21	y ₁₀	1560,69	b ₁₆ -H ₂ O	2064,25	a ₂₂	2672	y ₂₈ -H ₂ O
425,39	b ₄ -H ₂ O	1068,15	b ₁₀	1561,67	b ₁₆ -NH ₃	2074,24	b ₂₂ -H ₂ O	2672,94	b ₂₈
428,44	x ₄	1080,21	x ₁₀	1562,75	x ₁₆	2075,23	b ₂₂ -NH ₃	2672,99	y ₂₈ -NH ₃
443,41	b ₄	1085,18	c ₁₀	1575,79	y ₁₇ -H ₂ O	2075,31	x ₂₂	2673,99	z ₂₈
460,44	c ₄	1149,36	y ₁₁ -H ₂ O	1576,77	y ₁₇ -NH ₃	2092,26	b ₂₂	2689,97	c ₂₈
513,55	y ₅ -H ₂ O	1150,34	y ₁₁ -NH ₃	1577,78	z ₁₇	2109,29	c ₂₂	2690,02	y ₂₈
514,53	y ₅ -NH ₃	1151,35	z ₁₁	1578,7	b ₁₆	2144,33	a ₂₃ -NH ₃	2714,98	a ₂₉ -NH ₃
515,54	z ₅	1152,23	a ₁₁ -NH ₃	1590,71	a ₁₇ -NH ₃	2159,44	y ₂₃ -H ₂ O	2716,01	x ₂₈
528,56	a ₅	1167,37	y ₁₁	1593,8	y ₁₇	2160,42	y ₂₃ -NH ₃	2732,01	a ₂₉
531,56	y ₅	1169,26	a ₁₁	1607,74	a ₁₇	2161,36	a ₂₃ -NH ₃	2742,01	b ₂₉ -H ₂ O
538,55	b ₅ -H ₂ O	1179,25	b ₁₁ -H ₂ O	1617,74	b ₁₇ -H ₂ O	2161,43	z ₂₃	2742,99	b ₂₉ -NH ₃
556,57	b ₅	1180,24	b ₁₁ -NH ₃	1618,72	b ₁₇ -NH ₃	2171,36	b ₂₃ -H ₂ O	2760,02	b ₂₉
557,56	x ₅	1193,37	x ₁₁	1619,8	x ₁₇	2172,34	b ₂₃ -NH ₃	2777,05	c ₂₉
573,6	c ₅	1197,27	b ₁₁	1632,84	y ₁₈ -H ₂ O	2177,45	y ₂₃	2801,12	y ₂₉ -H ₂ O
626,71	y ₆ -H ₂ O	1214,3	c ₁₁	1633,83	y ₁₈ -NH ₃	2189,37	b ₂₃	2802,1	y ₂₉ -NH ₃
627,69	y ₆ -NH ₃	1236,44	y ₁₂ -H ₂ O	1634,83	z ₁₈	2203,44	x ₂₃	2803,11	z ₂₉
628,7	z ₆	1237,42	y ₁₂ -NH ₃	1635,75	b ₁₇	2216,49	y ₂₄ -H ₂ O	2819,13	y ₂₉
639,66	a ₆ -NH ₃	1238,43	z ₁₂	1650,86	y ₁₈	2217,47	y ₂₄ -NH ₃	2828,14	a ₃₀ -NH ₃
644,76	y ₆	1254,45	y ₁₂	1652,79	c ₁₇	2218,48	z ₂₄	2845,13	x ₂₉
656,69	a ₆	1265,39	a ₁₂ -NH ₃	1661,79	a ₁₈ -NH ₃	2234,5	y ₂₄	2845,17	a ₃₀ -NH ₃
666,69	b ₆ -H ₂ O	1280,45	x ₁₂	1676,85	x ₁₈	2257,49	a ₂₄ -NH ₃	2855,17	b ₃₀ -H ₂ O
667,67	b ₆ -NH ₃	1282,42	a ₁₂	1678,82	a ₁₈	2260,5	x ₂₄	2856,15	b ₃₀ -NH ₃
670,72	x ₆	1292,41	b ₁₂ -H ₂ O	1688,82	b ₁₈ -H ₂ O	2274,52	a ₂₄	2872,2	y ₃₀ -H ₂ O
684,7	b ₆	1293,4	b ₁₂ -NH ₃	1689,8	b ₁₈ -NH ₃	2284,52	b ₂₄ -H ₂ O	2873,18	b ₃₀
697,79	y ₇ -H ₂ O	1293,49	y ₁₃ -H ₂ O	1689,89	y ₁₉ -H ₂ O	2285,5	b ₂₄ -NH ₃	2873,18	y ₃₀ -NH ₃
698,77	y ₇ -NH ₃	1294,47	y ₁₂ -NH ₃	1690,88	y ₁₉ -NH ₃	2302,54	b ₂₄	2874,19	z ₃₀
699,78	z ₇	1295,48	z ₁₃	1691,89	z ₁₉	2315,62	y ₂₅ -H ₂ O	2890,21	c ₃₀
701,73	c ₆	1310,43	b ₁₂	1706,83	b ₁₈	2316,61	y ₂₅ -NH ₃	2890,21	y ₃₀
715,8	y ₇	1311,5	y ₁₃ -H ₂ O	1707,91	y ₁₉	2317,61	z ₂₅	2916,21	x ₃₀
738,79	a ₇ -NH ₃	1322,44	a ₁₃ -NH ₃	1718,84	a ₁₉ -NH ₃	2319,57	c ₂₄	2983,3	M-2H ₂ O
741,8	x ₇	1327,46	c₁₂	1723,86	c ₁₈	2328,57	a ₂₅ -NH ₃	3001,31	M-H₂O
755,82	a ₇	1337,5	x ₁₃	1733,9	x ₁₉	2333,64	y ₂₅		
765,82	b ₇ -H ₂ O	1339,47	a ₁₃ -NH ₃	1735,88	a ₁₉	2345,6	a ₂₅		
766,8	b ₇ -NH ₃	1349,47	b ₁₃ -H ₂ O	1745,87	b ₁₉ -H ₂ O	2355,6	b ₂₅ -H ₂ O		

Wanneer we een CAD-massaspectrum van C-peptide in de negatieve ionisatiemodus opnamen met volgende instellingen: collisiegas: 3×10^{-3} mbar, collisie-energie 30 eV, cone-spanning 60 V, spanning op het capillair 3.5 kV en brontemperatuur 175°C, verkregen we een massaspectrum waarin duidelijk 3 fragmentionen geïdentificeerd konden worden, nl. een ion bij m/z 345, m/z 1327 en m/z 1500 (figuur III.13.). Nota: het ion bij m/z 1509.4 is het dubbelgeladen moleculair ion van C-peptide.

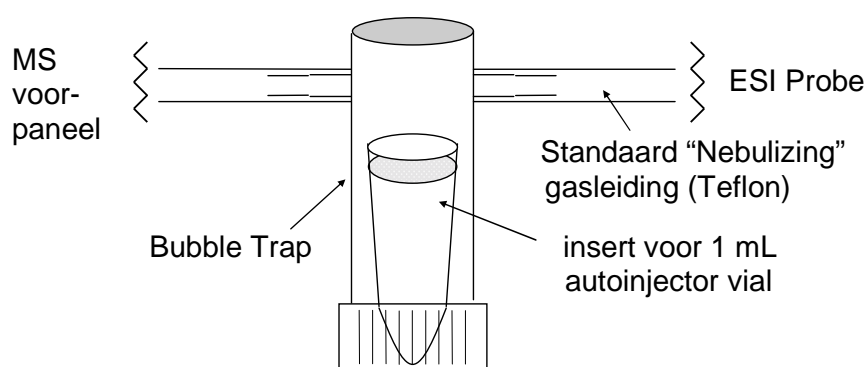
Aan de hand van tabel III.7. konden we deze fragmentionen identificeren als respectievelijk het c_3 - of y_3 -fragment (m/z 345), het c_{12} - of dubbel geladen ($b_{22}-H_2O$) fragment (m/z 1327) en het dubbelgeladen moederion waarvan H_2O werd afgesplitst (m/z 1500) (of eventueel het enkelvoudig geladen c_{15} -fragment m/z 1499). Boven m/z 1510 werden geen betekenisvolle ionen teruggevonden.



Figuur III.13. Collisie geactiveerd massaspectrum in de negatieve ionisatiemodus van het dubbelgeladen moleculair ion van C-peptide (m/z 1509).

III.2.7. Additie van zuren en basen via de gasfase

De verschillende ionisatiemodi (ESI+/- en wESI+/-) vereisen meestal sterk basische (pH>10) of zure (pH<2) sprayoplossingen. Deze worden gewoonlijk gegenereerd door het toevoegen van alkylamines of HCOOH aan een mengsel van H₂O/CH₃CN. Het gebruik van sterk basische oplossingen is echter niet aangeraden voor LC-MS-toepassingen, daar de pH, die de meeste chromatografische silicakolommen kunnen verdragen, beperkt is tot pH 8. Als mogelijke oplossing bestaat de postkolomadditie van deze basen/zuren via bvb. een triaxiale probe. Op die manier kunnen de chromatografische condities van de ionisatie losgekoppeld worden. Daar wij over een VG Quattro II triple stage quadrupool massaspectrometer, uitgerust met een standaard coaxiale probe beschikten en slechts een minimum aan veranderingen aan ons instrument wilden aanbrengen, zochten we naar een andere manier om deze vluchtige basen/zuren via de gasfase in de ionenbron te introduceren. Hiervoor maakten we gebruik van een HPLC “inline bubble trap” (Alltech, IL, Verenigde Staten art. Nr. 01-0221, 1/16”). De “bubble trap” werd vervolgens omgekeerd in de “nebulizing” gasleiding aangebracht op volgende manier, zoals voorgesteld in figuur III.14.



Figuur III.14. Schets van de “bubble trap” in een standaard “nebulizing” gasleiding van onze VG Quattro II massaspectrometer.

De kamer van de “bubble trap” had een schroefdeksel en in de kamer was er voldoende plaats om een glazen “insert” met een volume van ~150 µL, zoals gebruikt in 1 mL autoinjectorvials, te plaatsen. De glazen “insert” werd gevuld met bvb. i-prNH₂ of HCOOH die dan, samen met de normale stroom van het “nebulizing” gas, naar de ionenbron gebracht werd. Na 1 uur was er ongeveer 10 µL van de i-prNH₂ of HCOOH-oplossing verdampt. Wanneer er gebruik gemaakt werd van een flow van 50 µL/min, konden we bijgevolg een gemiddelde concentratie van 0.33% base/zuur verwachten in de sprayoplossing.

Deze mogelijkheid om basen of zuren toe te voegen in de gasfase werd vergeleken met de klassieke manier (nl. basen/zuren in het eluens) voor het opnemen van verschillende massaspectra van insuline. De oplossingen van insuline ($\sim 2 \mu\text{M}$ in water) werden via het Kontron Instruments (Milano, Italië) HPLC-systeem met een flow van $50 \mu\text{L}/\text{min}$ in de massaspectrometer gebracht. De neutrale basissprayoplossing bestond uit 70/30 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (v/v).

In ESI+ werden de spectra gegenereerd onder volgende omstandigheden:

- a) de basissprayoplossing zonder toevoeging van basen/zuren in de trap (figuur III.15.A).
- b) de basissprayoplossing waaraan 1% HCOOH werd toegevoegd en geen basen/zuren in de trap (figuur III.15.B).
- c) de basissprayoplossing en een insert in de trap gevuld met $130 \mu\text{L}$ HCOOH (figuur III.15.C).

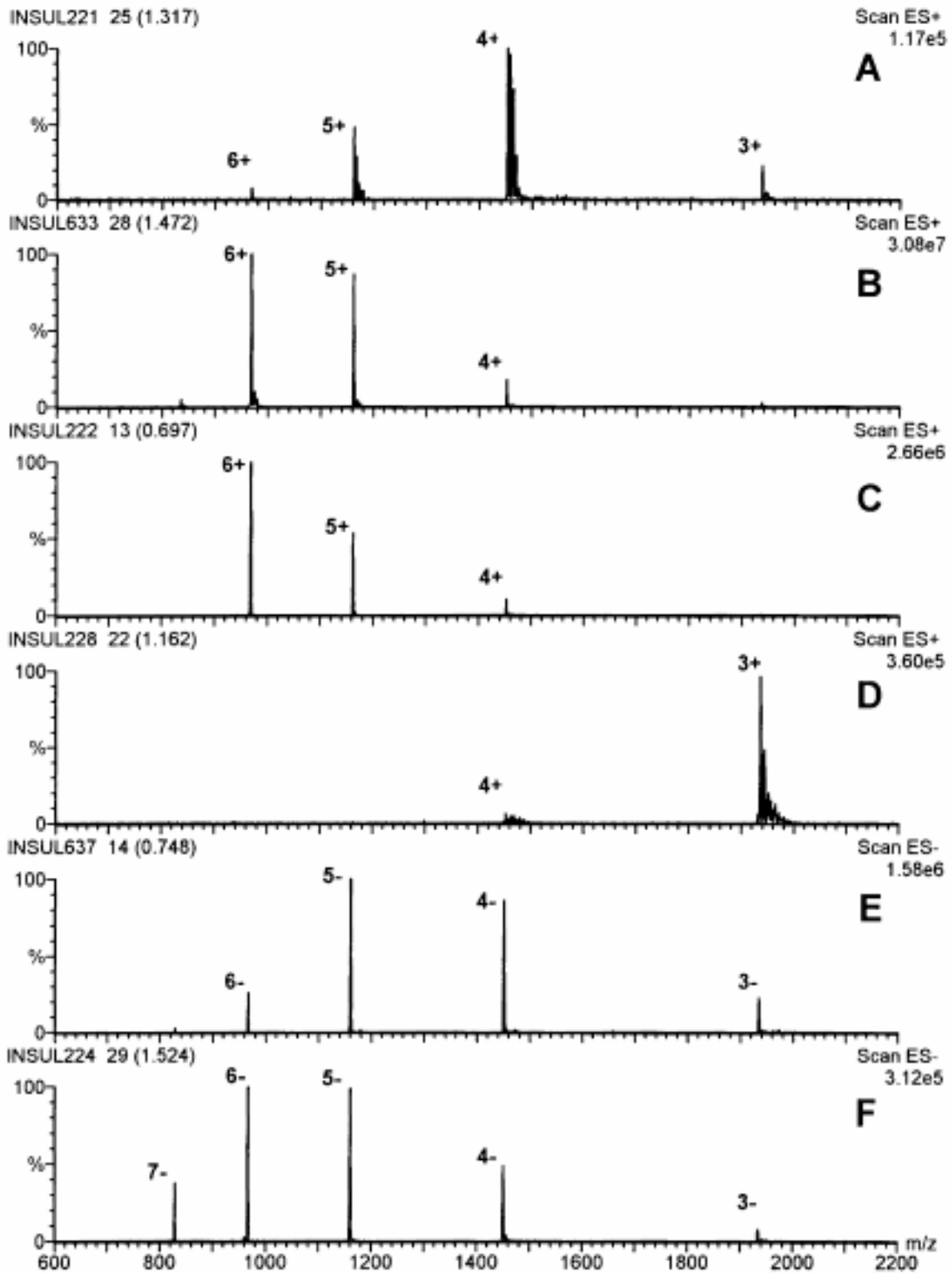
Voor de wESI+ spectra werden volgende varianten gebruikt:

- d) de basissprayoplossing waaraan 0.003% HCOOH werd toegevoegd en een insert in de trap gevuld met $130 \mu\text{L}$ $i\text{-prNH}_2$ (figuur III.15.D).

De spectra in ESI- werden gegenereerd met:

- e) de basissprayoplossing waaraan 1% $i\text{-prNH}_2$ werd toegevoegd en geen basen/zuren in de trap (figuur III.15.E).
- f) de basissprayoplossing en een insert in de trap gevuld met $130 \mu\text{L}$ $i\text{-prNH}_2$ (figuur III.15.F).

De andere massaspectrometrische instellingen waren als volgt: brontemperatuur 125°C , flow van “nebulizing” en “drying” gas waren 12 en $450 \text{ L}/\text{uur}$, respectievelijk. De spanning op het capillair bedroeg 3.0 kV voor de positieve spectra en 3.5 kV voor de negatieve spectra. De spanning op de cone werd ingesteld op 35 V behalve voor het spectrum in wESI+ (figuur III.15.D) waar ze 100 V bedroeg.



Figuur III.15.A-F. Positief en negatief electrospray ionisatie massaspectra van insuline opgenomen met verschillende sprayoplossingen.

Het ESI⁺ spectrum in figuur III.15.A (basissprayoplossing) is enkel voorgesteld om de effecten van de verschillende manieren van toevoegen van basen/zuren gemakkelijker te kunnen vergelijken. Verder is de gevoeligheid van het spectrum in figuur III.15.A relatief slecht, er komen veel adductionen voor en lading 4⁺ (m/z 1453) vormt de basispiek.

In figuur III.15.B wordt het typische ESI⁺ spectrum van insuline voorgesteld, zoals gegenereerd met een zure sprayoplossing. De belangrijkste ionen dragen lading 5⁺ (m/z 1163) en 6⁺ (m/z 969). Wanneer figuur III.15.B vergeleken wordt met figuur III.15.C, waar het zuur via de gasfase werd toegevoegd, gebruik makend van de trap, merken we op dat een spectrum met ongeveer dezelfde gevoeligheid verkregen wordt. Daarenboven wordt figuur III.15.C ook gekenmerkt door de aanwezigheid van minder adductionen en een op de voorgrond tredende lading 6⁺ (m/z 969).

In figuur III.15.D werd gebruik gemaakt van wESI⁺ om ladingsvermindering te verkrijgen, nl. een zwak zure sprayoplossing en de toevoeging van een vluchtige base via de gasfase (gasfase protontransferreactie, 40). De hogere spanning op de cone (100 V) werd in dit geval gebruikt om de ionen met een kleine lading te begunstigen.

In de figuren III.15.E en III.15.F worden de ESI⁻ spectra van insuline weergegeven. Beide spectra vertonen een gelijkaardige kwaliteit, maar toch merken we op dat het spectrum, waar de base via de gasfase werd toegevoegd (figuur III.15.F), een betere gevoeligheid vertoont en dat er een kleine verschuiving optreedt naar de ionen met grotere ladingen (6- en 7-).

Wij waren vooral geïnteresseerd in de praktische aspecten en niet zozeer in de mechanismen van de ionenvorming onder deze verschillende omstandigheden. Toch hebben we enkele preliminaire experimenten uitgevoerd, door de pH van de verschillende sprayoplossingen te meten, om zo misschien toch een eerste inzicht te krijgen van de mogelijke mechanismen. De pH-waarden worden voorgesteld in tabel III.8.

Tabel III.8. Een overzicht van de pH-waarden volgens de samenstelling van de verschillende spray-oplossingen.

Samenstelling sprayoplossing	pH
Basissprayoplossing	6.5
Basissprayoplossing + 1% i-prNH ₂	11
Basissprayoplossing + 1% HCOOH	2
Basissprayoplossing + i-prNH ₂ in gasfase	10
Basissprayoplossing + HCOOH in gasfase	3
Basissprayoplossing + 0.003% HCOOH	5.4
Basissprayoplossing + 0.003% HCOOH + i-prNH ₂ in gasfase	8.5

Wanneer we de pH-waarden bekijken volgens de samenstelling van de sprayoplossing, zouden we mogen aannemen dat de in evenwichtstelling van de pH optreedt vóór het ionisatieproces. Bijgevolg, zou men dus ook gelijkaardige spectra verwachten in het geval dat de base/zuur toegevoegd werd aan het HPLC-eluens of aangebracht werd via de gasfase. Dit werd bevestigd in figuur III.15.B en III.15.C en III.15.E en III.15.F. Daarenboven merkten we ook op dat, na toevoeging van de basen/zuren in de gasfase, ionen met een grotere lading bevorderd werden, zelfs met een spray die minder basisch/zuur (slechts 0.33%) was dan deze verkregen wanneer 1% base/zuur aan de oplossing werd toegevoegd. Hiervoor hebben we geen verklaring gevonden. Men mag ook niet vergeten dat de uiteindelijk verkregen massaspectra niet enkel beïnvloed worden door pH, maar ook door de lading van het capillair en andere collisieprocessen.

III.3. Chromatografische eigenschappen en staalopzuivering

Peptiden en proteïnen kunnen aan verschillende vormen van chromatografie ter analyse en staalopzuivering onderworpen worden, nl. “size-exclusion”-, “ion-exclusion”-, “reversed phase”-, hydrofobe interactie- en affiniteitschromatografie. Van al deze verschillende chromatografische vormen wordt RPC het meest gebruikt. Toch stelt de chromatografie van peptiden en proteïnen meer problemen in vergelijking met de chromatografie van kleinere moleculen. Hiervoor is het belangrijk de mechanismen van interactie tussen peptiden en proteïnen en het RP-oppervlakte van de kolom te kennen.

III.3.1. Chromatografische eigenschappen

III.3.1.1. Interactiemechanismen tussen peptiden en proteïnen en “reversed phase”-HPLC-kolommen

RPC is een heel krachtig hulpmiddel om peptiden/proteïnen te scheiden, zelfs peptiden/proteïnen die slechts in 1 aminozuur van elkaar verschillen kunnen met RPC gescheiden worden (50). Maar ongelukkigerwijze vertonen RP-chromatogrammen van peptiden/proteïnen vaak verschillende pieken, die de aanwezigheid van 2 producten doen veronderstellen, waar er in feite maar 1 verwacht wordt (51). Daarbij komt dat de pieken vaak verbreed zijn en ‘een schouder’ vertonen. Zo’n profiel zou bij kleine moleculen de aanwezigheid van onzuiverheden doen vermoeden, maar bij proteïnen treden ze zelfs op bij zuivere standaarden. Het optreden van verscheidene pieken doet veronderstellen dat het peptide/proteïne zich ontvouwd heeft tijdens analyse en dat verschillende conformaties ontstaan, elk met hun retentietijd (52). In het algemeen zijn de ontvouwde vormen meer hydrofobisch en worden daardoor langer weerhouden (52, 53). Het optreden van verbrede pieken en schouders wijst eerder op een reversibele ontvouwing.

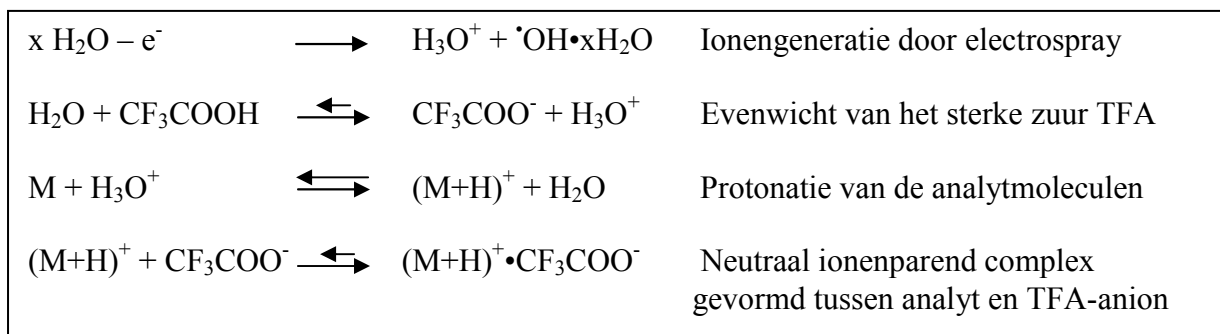
Om de chromatografische eigenschappen van peptiden en proteïnen te verstaan, is het belangrijk de mechanismen te kennen volgens dewelke deze peptiden/proteïnen intrageren met het RP-oppervlak. In tegenstelling tot de kleine moleculen, die zich continu kunnen verdelen tussen de mobiele fase en de hydrofobe stationaire fase, zijn peptiden/proteïnen te groot om zich te verdelen in die hydrofobe fase. In plaats daarvan worden ze geadsorbeerd aan het hydrofoob oppervlak en blijven ze geadsorbeerd tot de concentratie van het organisch

solvent (bvb. CH₃CN) de kritische concentratie om desorptie te veroorzaken, bereikt heeft (55). De scheiding en adsorptie van peptiden/proteïnen is dus afhankelijk van de verdeling van de aminozuren (hydrofoob of hydrofiel) op het oppervlak van de moleculen.

Elutie van peptiden/proteïnen van RP-kolommen gebeurt bijna steeds door gebruik te maken van een stijgende lineaire gradiënt aan organisch solvent (54). Daar het aantal moleculen van het organisch solvent dat vereist is om desorptie te veroorzaken heel kritisch is (55), heeft desorptie slechts plaats binnen een heel klein concentratiegebied van het organisch solvent. Bij een lagere concentratie is er dus volledige retentie van het peptide/proteïne en als de kritische concentratie bereikt wordt, treedt de desorptie plots op, wat resulteert in scherpe pieken met een hoge resolutie. Wel moet men steeds indachtig zijn dat een te hoge concentratie aan organisch solvent ook denaturatie van het peptide/proteïne kan veroorzaken.

Naast het organisch solvent spelen ook ionenparende componenten, zoals TFA, een belangrijke rol in RPC van peptiden en proteïnen. Ze bepalen immers niet alleen de pH van het eluens, maar intrageren ook met het polypeptide in oplossing. TFA is de meest gebruikte ionenparende component. Het is heel vluchtig en kan op die manier heel eenvoudig terug verwijderd worden. TFA wordt ook veel gebruikt daar het de mogelijkheid bezit om de piekverbreding en asymmetrie, die ontstaan door interactie van zowel polaire, ionische en hydrofobe plaatsen van peptiden en proteïnen met de hydrofobe stationaire fase, te verminderen. Door zijn zure en sterk ionenparende eigenschappen kan het complexen vormen met de positief geladen basische residuen van de te bepalen peptiden of proteïnen. Op die manier wordt de hydrofiliciteit verminderd en de retentietijd verhoogd.

Meestal worden concentraties tussen 0.01% en 0.1% aangewend want, ongelukkigerwijze, veroorzaken hogere concentraties suppressie van de ionenvorming door een gecombineerd effect van wijzigingen van de ionenparing en oppervlaktespanning (55). Hoge TFA-concentraties veroorzaken nl. een hoge geleidbaarheid en oppervlaktespanning van het eluens. Hierdoor wordt de spray onstabiel en kan er signaalvermindering optreden. Door ionenparende eigenschappen tussen de TFA-anionen en de basische analytmoleculen kunnen ook neutrale complexen ontstaan (figuur III.16.). Aangezien deze laatste geen lading dragen, worden ze niet meer gedetecteerd in de MS. Hierdoor daalt de gevoeligheid van de LC-MS-analyse enorm.



Figuur III.16. Mogelijke verklaring voor signaalsuppressie veroorzaakt door de ionenparende eigenschappen van TFA met vorming van neutrale complexen.

III.3.1.2. Isocratische versus gradiëntelutie

De grote gevoeligheid van de peptiden- of proteïneretentie op kleine concentratieverschillen van organisch solvent, heeft als gevolg dat isocratische elutie heel moeilijk uit te voeren is. Bij deze laatste blijft de concentratie van het organisch solvent immers constant. Bijgevolg is het aangewezen gradiëntelutie uit te voeren. Als startconcentratie wordt steeds aangeraden niet minder dan 5% organisch solvent te gebruiken, aangezien bij lagere concentraties de kolomequilibratie te lang duurt. De eindconcentratie blijft best onder de 95% organisch solvent want anders verdwijnen alle sporen water uit de organische fase en dit maakt kolomequilibratie opnieuw moeilijker. Bovendien is het ook belangrijk dat de looptijd van de gradiënt niet te kort is, om deformaties of denaturatie van het peptide/proteïne te vermijden.

III.3.2. Staalopzuivering

III.3.2.1. Suppressie en matrixeffecten

Suppressie van de ionisatie en matrixeffecten zijn bekende fenomenen in de LC-MS-analyse. Sinds het verschijnen van de eerste publicaties over ionensuppressie in ESI-MS (45, 57) zijn er al verschillende anderen die dezelfde effecten voor kwantificatie van componenten en hun metabolieten in biologische media beschreven hebben (57-60). Ionensuppressie en matrixeffecten worden hoofdzakelijk veroorzaakt door co-eluerende bestanddelen die de ionisatie van de te bepalen component onderdrukken. Gezien het ons streefdoel was om een kwantitatieve meetprocedure voor de bepaling van urinair C-peptide op punt te zetten, was het eveneens een noodzaak het fenomeen matrixeffect nauwlettend na te gaan. Hiervoor gingen

we als volgt te werk: in onze eerste experimenten met waterige C-peptidestandaarden werd een detectielimiet van ~ 0.2 ng vastgesteld. Aangezien urinestalen gemiddeld ~ 25 pmol/mL (75 ng/mL) C-peptide bevatten, leek een directe injectie van 25 μ L urine (dit bevat ~ 0.625 pmol of 1.8 ng C-peptide) een realistische mogelijkheid. Wanneer dit signaal echter vergeleken werd met het signaal van dezelfde hoeveelheid C-peptide in een waterige standaard, merkten we op dat de respons sterk onderdrukt was, nl. tot 7 maal (tabel III.8.). Slechts na een tienvoudige verdunning van de urine met water kon de oorspronkelijke gevoeligheid opnieuw bereikt worden.

Om na te gaan of dit matrixeffect veroorzaakt werd door de aanwezigheid van anorganische ionen, bvb. NaCl, werden waterige standaarden bereid waaraan 30 mmol/L NaCl-oplossing werd toegevoegd. Opnieuw werd een signaal voor C-peptide verkregen met dezelfde gevoeligheid als de waterige standaard. Hieruit konden we besluiten dat het onderdrukkend effect niet veroorzaakt werd door anorganische ionen, maar wel door verschillende andere co-eluerende componenten uit de urinematrix (tabel III.8.).

Tabel III.8. Relatieve massaspectrometrische respons van C-peptide in verschillende matrices.

Matrix	Intensiteit (%)
Waterige standaard	100
Waterige standaard (+ 30 mmol/L NaCl)	100
Urine	15-30
10-voudig verdunde urine	100
Opgezuiverde urine	95

Nota: Alle oplossingen bevatten 1 ng/ μ L C-peptide (10 μ L geïnjecteerd), behalve de opgezuiverde urine, die bevatte ~ 0.4 ng/ μ L C-peptide (25 μ L geïnjecteerd).

Wanneer we nu echter de urine vooraf opzuiverden door gebruik te maken van UF, waarbij het de bedoeling was C-peptide in het retentaat te weerhouden, konden we, na de injectie van dezelfde absolute hoeveelheid C-peptide, opnieuw eenzelfde intensiteit behalen als voor de waterige standaard. Dit wijst er op dat we erin slaagden dit matrixeffect te overwinnen door de urine vooraf te filtreren.

UF wordt beschouwd als een aantrekkelijke staalvoorbereidingstechniek voor de LC-MS-analyse van peptiden en proteïnen. Het laat immers toe om laag moleculair gewicht substanties te verwijderen (in het filtraat) en hoog moleculair gewicht substanties aan te concentreren (in het retentaat) in een enkelvoudige stap. Indien men de analyt wenst te weerhouden in het retentaat en voldoende terugvinding wenst te bereiken, is het aangewezen

ultrafilters met cut-off waarden overeenstemmend met de helft of een derde van het moleculair gewicht van de analyt te gebruiken (61, 62). Aangezien het Mr van C-peptide 3020 bedraagt, werden eerst ultrafilters met cut-off waarden van een derde, nl. 1 kDa, getest. Deze filters waren echter erg onpraktisch wegens de lange filtratietijd (~2 uur) die vereist was voor filtratie van 1 mL urine. Daarna werden filters met een hogere cut-off waarde uitgetest, nl. de Centricon YM-3 ultrafilters (Millipore, Etten-Leur, Nederland) met een nominale cut-off waarde van 3 kDa (63). De filtratietijd voor 1 mL urine bedroeg ~45 min tot 1 uur (op 7000 x g). Het retentaat, ~30 µL, werd vervolgens aangelengd met 150 µL water en na injectie van 25 µL, verkregen we ~95% van de gevoeligheid zoals in onze oorspronkelijke waterige standaarden (tabel III.8.). UF is dus geschikt gebleken en deze filters zouden bijgevolg gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van de meetprocedure voor C-peptide.

III.3.2.1.1. Opmerking: overwinnen van praktische beperkingen van ultrafilters

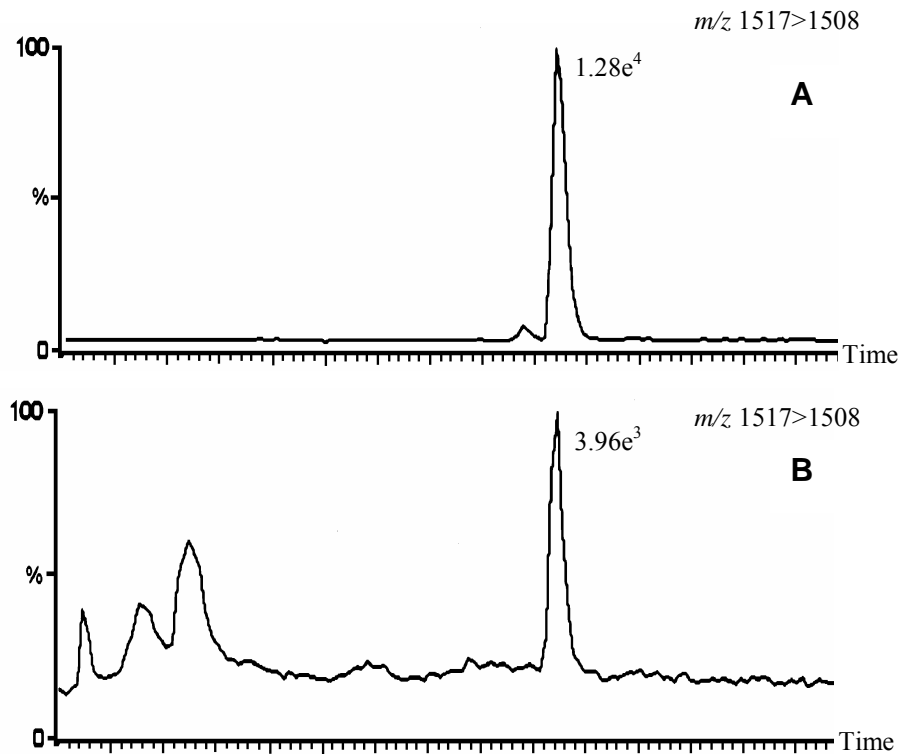
Zoals in hoofdstuk II reeds besproken, brachten recente ontwikkelingen in de het domein van de ultrafilters, de “high-flow” ultrafilters (Vivaspin, Vivascience, Lincoln, Groot-Brittannië) op de markt. Hoewel de laagst beschikbare cut-off waarde 5 kDa is, hebben we toch de mogelijkheden van deze filters voor de analyse van C-peptide in urine onderzocht. De filtratietijd voor 1 mL urine was nu merkkelijk korter, nl. slechts 15 minuten. In de eerste experimenten werd enkel gebruik gemaakt van waterige C-peptidestandaarden. We merkten, wat in de lijn van onze verwachtingen lag, dat praktisch geen C-peptide weerhouden werd. Interessanterwijze, door het toevoegen van BSA aan de urine, zodat een uiteindelijke BSA-concentratie van 1% verkregen werd, kon het C-peptide toch kwantitatief weerhouden worden (64). Vervolgens werd aan het retentaat, ~25 µL (afkomstig van 1 mL urine), opnieuw 1 mL water toegevoegd (om het retentaat te ‘wassen’). UF werd herhaald zodat een uiteindelijk volume van 200 µL bereikt werd. Na de injectie van 25 µL verkregen we een signaal met ongeveer dezelfde gevoeligheid als in de waterige standaarden. Hieruit blijkt dus dat we, door het toevoegen van 1% BSA, er toch in slaagden filters te gebruiken die normaal, door praktische beperkingen, helemaal niet bruikbaar zijn voor de opzuivering van C-peptide. Bovendien laten deze filters een veel snellere staalvoorbereiding van de urinestalen toe.

III.3.2.1.2. Verder onderzoek naar ionisatiesuppressie

Tijdens de verdere ontwikkeling van de kwantitatieve meetprocedure voor C-peptide (hoofdstuk IV) werd overgegaan van een 150 mm Hypersil PEP C18 kolom naar een 50 mm Hamilton PRP-3 kolom. Deze kolom bevat een polymeerpakkingsmateriaal en is ideaal geschikt voor de analyse van peptiden en proteïnen. Deze wijziging van kolom materiaal noodzaakte ons echter na te gaan of de resterende chromatografische resolutie en MS-selectiviteit nog voldoende waren voor de analyse van biologische stalen.

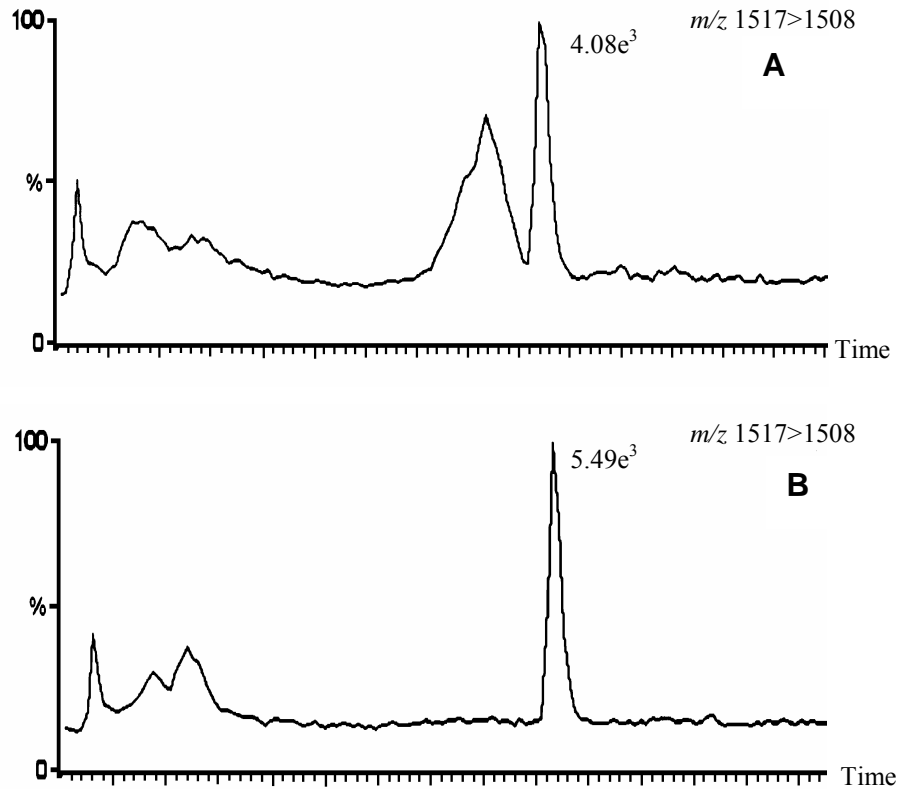
De eerste experimenten met de 50 mm kolom werden uitgevoerd zonder gebruik te maken van de isotopisch gemerkte IS ($^2\text{H}_8\text{-Val}^{7,10}\text{-C-peptide}$), gezien de extreem hoge kostprijs. Ofschoon we voor de meeste stalen interferentievrije chromatogrammen verkregen, merkten we toch op dat de absolute intensiteit van sommige urinestalen vrij laag was. Maar aangezien de 'exacte' concentratie van de stalen nog niet gekend was, baarde deze observatie ons aanvankelijk geen zorgen. Later, na analyse van meerdere urinestalen, leek het er ook op dat sommige urinestalen schijnbaar 'onzuiverheden' leken te bevatten. Daarom besloten we de meetprocedure meer in detail na te gaan door gebruik te maken van de isotopisch gemerkte IS.

Bij vergelijking van de respons van 5 ng zuivere IS (intensiteit: $1.28e^4$, figuur III.17.A) met de respons van dezelfde hoeveelheid IS, die aan een staal met lage intensiteit was toegevoegd, verkregen we een signaal voor de IS met slechts 1/3 van de verwachte intensiteit (intensiteit: $3.96e^3$, figuur III.17.B). Eigenaardigerwijze, na een 1:1 verdunning van dit staal met starteluens en injectie van hetzelfde volume (20 μL), verkregen we een signaal voor de IS met een verhoogde intensiteit (vergelijkbaar met figuur III.18.A), die verhoudingsgewijs de oorspronkelijke intensiteit evenaarde. Deze vaststelling deed ons vermoeden dat hoge concentraties co-eluerende componenten ionensuppressie veroorzaakten.



Figuur III. 17.A & B. Representatief ionenchromatogram van (A) 5 ng zuivere isotopisch gemerkte IS en (B) 5 ng isotopisch gemerkte IS toegevoegd aan een urinestaal met lage intensiteit.

Uitgaande van deze kennis werden gelijkaardige experimenten uitgevoerd met de urinestalen die zogenaamd ‘onzuiverheden’ leken te bevatten. Allereerst werd dezelfde hoeveelheid IS aan de urinestalen toegevoegd. Opnieuw namen we een sterke suppressie van het signaal waar voor de IS (intensiteit: $4.08e^3$, figuur III.18.A) en bovendien leek nu ook op de ionentransitie van de IS een ‘onzuiverheid’ aanwezig te zijn. Vervolgens werd het staal opnieuw 1:1 verdund met het starteluens en hetzelfde volume als van het onverdunde staal werd geïnjecteerd. Inderdaad, we verkregen een piek met verhoogde intensiteit, nl. $5.49e^3$ (figuur III.18.B), en tegelijkertijd was de zogenaamde ‘onzuiverheid’ volledig verdwenen.



Figuur III.18.A & B. Representatief ionenchromatogram van (A) 5 ng IS in een staal dat onzuiverheden leek te bevatten en (B) hetzelfde staal na 1:1 verdunning met het starteluens.

Tot slot beschikten we nog over een andere mogelijkheid om deze suppressieproblemen aan te pakken, nl. het wijzigen van de gradiënt van het HPLC-programma. Een langzamere gradiënt kan er nl. voor zorgen dat de co-eluerende bestanddelen vroeger of later elueren. De toepassing van een gewijzigde gradiënt, nl. van 10% organisch eluens naar 40% organisch eluens in 8 min ipv 4 min, gaf een verdubbeling van de intensiteit van het C-peptidesignaal.

III.3.2.2. Besluit

We kunnen dus besluiten dat men voorzichtig moet zijn met metingen in de zogenaamde ‘specifieke’ MRM-modus. Uit deze experimenten is duidelijk gebleken dat hoge concentraties van co-eluerende componenten suppressie van het signaal en/of slechte chromatografie kunnen veroorzaken. Deze bevindingen benadrukken nogmaals het belang van isotoopdilutie voor de kwantitatieve bepaling van diagnostisch belangrijke peptiden in biologische matrices.

III.3.2.3. Staalopzuivering en chromatografie: beide in 1 stap?

In de chromatografie is, naast de samenstelling van het eluens en het gradiënt-programma, de keuze van het pakkingmateriaal van de kolom een derde belangrijk aspect. In het algemeen wordt een goede resolutie voor peptiden en proteïnen in RPC verkregen met een poriëngrootte van 300 Å en een partikelgrootte van 3 à 5 µm. Als stationaire fase heeft men de keuze uit de klassieke, gemodificeerde silicakolommen met een C18-, C8- of C4-hydrofobe keten. Bij stijgende lengte van de alkylketen neemt de hydrofobe interactie met de peptiden/proteïnen ook toe. Naast de standaard silica gebaseerde C18-kolommen, wordt vaak verkozen om chromatografie van peptiden en proteïnen uit te voeren op kolommen die gepakt zijn met een polymeermateriaal zoals poly(styreen-divinyl)benzeen. In tegenstelling met de klassieke silica gebaseerde kolommen heeft dit materiaal als eigenschap stabiel te zijn over een breed pH-gebied (pH 1 tot 13). De “gecrosslinkte” structuur van het polymeerpakkingsmateriaal voorkomt daarbij ook het zwellen en krimpen van de drager bij een veranderende mobiele fase.

Recente ontwikkelingen in de synthese van RP-polymeerkolommen (bvb. de “Trap cartridges” Michrom, Verenigde Staten) maken het nu mogelijk om aanconcentratie en het verwijderen van zouten, detergenten en grote proteïnen bij LC-MS-analysen uit te voeren in 1 stap (65). Op die manier zou het mogelijk moeten worden om staalopzuivering en chromatografie van de analyt in 1 stap uit te voeren.

De peptidentrap van Michrom bevat een polymeerpakkingsmateriaal met een medium poriëngrootte en een grote partikelgrootte. Het materiaal werd zodanig ontworpen dat het kleine polynucleotiden, peptiden en andere kleine biomoleculen met een grootte van 0.5 tot 50 kDa bindt, terwijl de grotere moleculen en proteïnen helemaal niet weerhouden worden. Voor de opzuivering en analyse van proteïnen anderzijds, kan gebruik gemaakt worden van de proteïnetrap. Dit pakkingsmateriaal heeft grotere poriën en is bovendien ook samengesteld uit nog grotere partikels. Het is zo ontworpen dat het proteïnen en andere biomoleculen met een moleculair gewicht tussen 5 en 500 kDa kan weerhouden.

III.3.2.3.1. Toepassing

We vonden het de moeite waard om de mogelijkheden van deze “online” staalopzuivering even uit te testen bij volgend probleem: omwille van stabiliteitsredenen werd aan een standaardoplossing van 1 ng/ μ L parathyroïd hormoon (PTH, Mr 9425) BSA toegevoegd als stabilisator, zodat een uiteindelijke BSA-concentratie bereikt werd van 1%. Na injectie van 10 μ L van deze gestabiliseerde PTH-oplossing op de HPLC-kolom (Hamilton PRP-3 150 x 2.1 mm i.d.) merkten we echter dat PTH en BSA samen elueerden, met als gevolg dat op de m/z -waarde van het 7-voudig geladen PTH (m/z 1347) teveel interferentie van het BSA optrad waardoor kwantificatie niet mogelijk was.

Er werd besloten om UF uit te voeren met filters met een cut-off waarde van 30 kDa om zo beide componenten te scheiden. Helaas, na UF vonden we geen PTH terug in het ultrafiltraat. We veronderstelden dat PTH te sterk gebonden was aan het BSA waardoor beiden via UF niet gescheiden konden worden.

Na injectie echter van 10 μ L van deze gestabiliseerde PTH-oplossing op een peptidentrap, merkten we dat het BSA (Mr ~66000) helemaal niet weerhouden werd en direct van de kolom elueerde (reeds bij 0% organisch eluens). Het PTH daarentegen elueerde pas van de peptidentrap wanneer de gradiënt een concentratie van 25% CH₃CN bereikt had. De peptidentrap liet ons dus toe om PTH van BSA te scheiden. Op die manier kon PTH toch kwantitatief bepaald worden. Deze mogelijkheid om kleine en grotere proteïnen van elkaar te scheiden opent veel perspectieven om in de toekomst “online” staalopzuivering uit te voeren.

III.4. Stabiliteit van peptiden en proteïnen in oplossing

Het is sinds lang gekend dat peptiden en proteïnen heel kwetsbare moleculen zijn die een grote zorgvuldigheid vereisen gedurende hun opzuivering en bewaring om te kunnen verzekeren dat ze volledig intact blijven en hun activiteit behouden.

Peptiden en proteïnen kunnen heel gemakkelijk hun activiteit verliezen of veranderen van structuur door verdunning, verandering van oplosmiddel, blootstelling aan enzymen, zware metalen, ... maar ook door verandering van fysische condities, zoals vriezen en ontdooien. In het algemeen mogen peptiden- of proteïneoplossingen nooit hevig geschud of gemixt worden want dit kan leiden tot oxidatie of oppervlaktedenaturatie. Verder mogen de oplossingen niet blootgesteld worden aan extreme pH-waarden, hoge temperaturen of organische solventen. Uiteindelijk is het vooral de aminozuursamenstelling die de voornaamste bepalende factor is voor de chemische stabiliteit.

Wanneer men peptiden of proteïnen wenst te bewaren, is het zeker niet aangeraden de overmaat in oplossing te bewaren. Vooral peptiden en proteïnen, die in hun sequentie het aminozuur cysteïne, methionine, asparagine, glutamine of een N-terminaal glutaminezuur bevatten, blijken heel snel afbreekbaar te zijn in oplossingen. In het algemeen wordt aangeraden de resterende hoeveelheid peptide of proteïne steeds te lyofiliseren en daarna droog bij -20°C , of indien mogelijk, bij -80°C te bewaren gedurende een langere periode.

Helaas, ook het vriesdroogproces kan geen garantie bieden om afbraak van peptiden/proteïnen tegen te gaan. Het zou vooral de drogende stap, veeleer dan de vriezende stap, zijn die de afbraak zou veroorzaken.

In de literatuur is al heel wat beschreven over bestanddelen die een beschermende werking zouden uitoefenen tijdens het lyofilizeren (66, 67). Zo zouden sommige sachariden, bvb. trehalose, peptiden/proteïnen kunnen stabiliseren door de vorming van een H-binding tussen het suiker en het gedroogde peptide/proteïne (66). Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) of PVP zou, door de interactie met H_2O , beletten dat H_2O invriest en op die manier de stabiliteit verhogen (67). Deze 2 mogelijkheden, nl. de toevoeging van trehalose en PVP, werden geëvalueerd voor de lyofilisatie van C-peptide en insuline. Geen enkel gaf echter een verbetering voor de stabiliteit tijdens het lyofilisatieproces. Daarenboven merkten we ook dat de stabiliteit sterk afhankelijk bleek te zijn van de lyofilisatiecyclus. Nota: het lag buiten ons objectief het lyofilisatieproces van deze peptiden en proteïnen volledig te optimaliseren. Om die reden en ook met het oog op het feit dat tijdens de metingen een zuivere peptiden- of

proteïnestandaardoplossing minstens 1 meetdag stabiel gehouden moet kunnen worden, werd naar andere oplossingen gezocht.

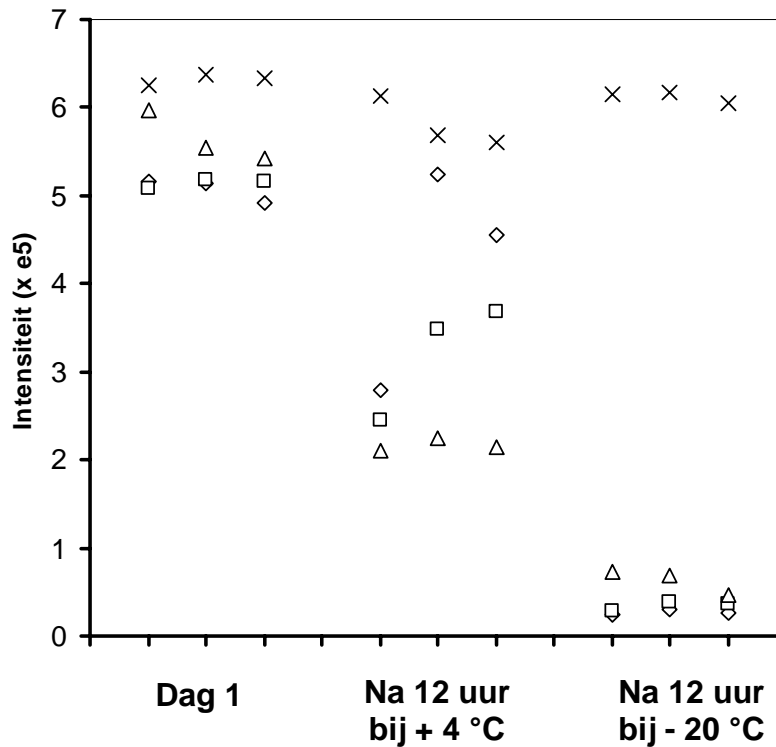
Deutscher et al. (68) vermeldde volgende mogelijkheden om peptiden- of proteïne-oplossingen te stabiliseren:

- gebruik van hoge proteïneconcentraties (>1 mg/mL) opgelost in een bufferoplossing met een pH tussen 5 en 7.
- toevoeging van 0.1 mM EDTA om chelaten te vormen met de zware metalen.
- oxidatieve effecten aan de cysteïneresidues kunnen verminderd worden door de toevoeging van 2-mercaptoethanol of dithiotreitol (DTT).
- toevoegen van 10 tot 20% glycerol, of een ander proteïne, bvb. BSA.
- toevoegen van protease-inhibitoren (bvb. Aprotinine).

Enkele van deze mogelijkheden werden onderzocht en daarbij maakten we gebruik van insuline als modelproteïne. Insuline werd opgelost in 4 verschillende oplosmedia, nl.

- 1) het basisoplosmiddel bestaande uit H₂O + 0.05% HCOOH (pH ~3.5).
- 2) het basisoplosmiddel + 0.01% DTT.
- 3) het basisoplosmiddel + 10% glycerol.
- 4) het basisoplosmiddel + 1% BSA.

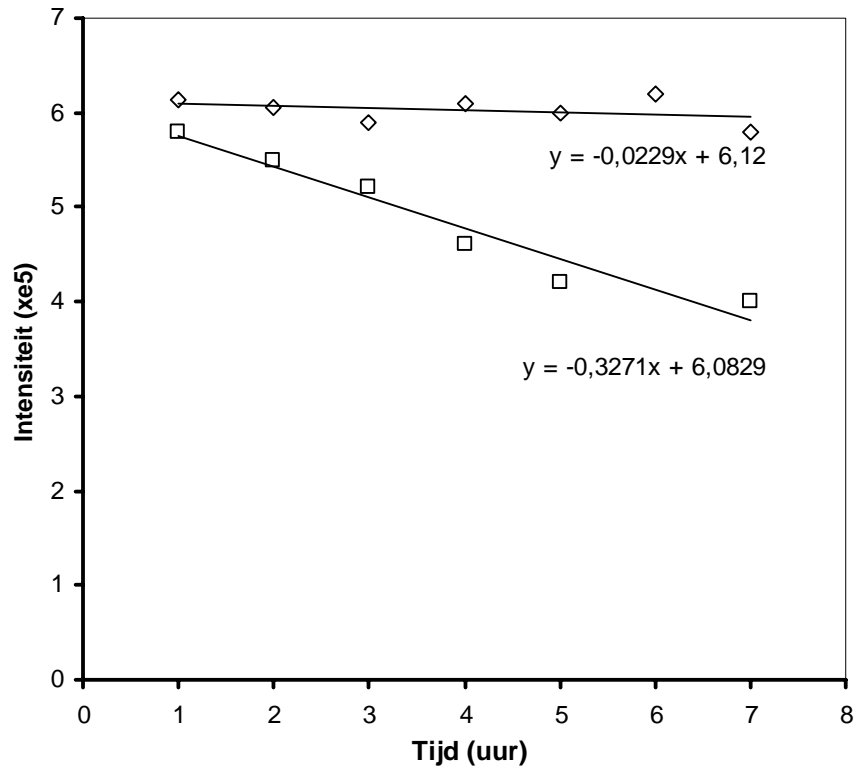
Telkens werden 3 verschillende insulineoplossingen bereid. De stabiliteit van insuline in de verschillende oplossingen werd nagegaan gedurende 1 meetdag. Van de verschillende oplossingen werd 10 µL geïnjecteerd op een Hamilton PRP3-kolom (50 x 2.1 mm i.d.). Dit werd voor elke oplossing 6 maal herhaald. Het eluens voor isocratische elutie bestond uit 70/30/0.05 H₂O/CH₃CN/HCOOH (v/v/v). De flow bedroeg 0.2 mL/min en de retentietijd van insuline onder deze omstandigheden bedroeg ongeveer 2.5 min. Vervolgens werd 1 reeks van de oplossingen gedurende één nacht bewaard bij +4°C (koelkast) en een andere reeks bij –20°C (diepvries). De volgende dag werd de stabiliteit opnieuw nagegaan (figuur III.19.).



Figuur III.19. Overzicht van de gemiddelde intensiteiten (n=6) voor de verschillende oplosmedia van insuline na rechtstreekse injectie en overnachting bij + 4°C en -20 °C.
◇: basisoplosmiddel; □: basisoplosmiddel + 0.01% DTT; △: basisoplosmiddel + 10% glycerol; ×: basisoplosmiddel + 1% BSA.

Uit figuur III.19. valt duidelijk af te lezen dat insuline tijdens de eerste meetdag stabiel bleef in de 4 verschillende oplosmedia. Wanneer de stalen echter bewaard werden bij + 4°C en - 20°C traden grote verschillen op. Deze resultaten toonden aan dat insuline het meest stabiel bleef in het basisoplosmiddel dat versterkt werd met 1% BSA. De toevoeging van 0.01% DTT of 10% glycerol bleek in ons geval de afbraak niet tegen te kunnen gaan.

Vervolgens wilden we nagaan wat de optimale BSA-concentratie was, vereist voor stabilisatie, en die tegelijk geen chromatografische problemen gaf. Hiervoor werden insulineoplossingen bereid die 0.1%, 1%, 5% en 10% BSA bevatten. Na de eerste injectie bleek al gauw dat oplossingen met 5% en 10% BSA helemaal niet bruikbaar waren omdat deze hoge proteïneconcentraties een sterke ionisatiesuppressie veroorzaakten. Hierdoor werd hun nut niet verder onderzocht. Na herhaaldelijke injecties (n=7) van de insulineoplossingen met 0.1% en 1% BSA gedurende een periode van 7 uur was het duidelijk merkbaar dat een BSA-concentratie van 0.1% toch onvoldoende was om een stabiliserend effect op insuline gedurende de een volledige meetdag te kunnen uitoefenen (figuur. III.20.).



Figuur III.20. Overzicht van de intensiteiten na herhaaldelijke injectie over een periode van 7 uur van een standaardoplossing insuline gestabiliseerd met 0.1% BSA en 1% BSA.
◇: basisoplosmiddel + 1% BSA; □: basisoplosmiddel + 0.1% BSA.

Uit figuur III.20. blijkt duidelijk dat 1% BSA een groot stabiliserend vermogen heeft. Gedurende de meetdag was er zo goed als geen afbraak van insuline. Om die reden werd besloten in alle volgende experimenten de peptiden- en proteïneoplossingen telkens te stabiliseren met 1% BSA-oplossing. Om de mogelijke enzymatische afbraak door proteasen tegen te gaan, werd voortaan protease-vrije BSA gebruikt. Daarbij werd ook telkens gestreefd de concentratie standaardmateriaal in de oplossingen zo hoog mogelijk te houden.

III.5. Besluit

Met insuline als modelproteïne hebben we een groot aantal operatiemodi geëvalueerd die gebruikt konden worden met ESI-MS/MS. Hierbij was de aandacht vooral gevestigd op sensitiviteit en selectiviteit van de metingen. De verschillende operatiemodi omvatten ten eerste bepalingen in de SIM-modus, nl. in de positieve of negatieve ionisatiemodus (ESI+ of ESI-). Beide mogelijkheden waren toepasbaar met basische of zure sprayoplossingen (wESI+ of wESI-). Uitgaande van deze 4 basismodi kon vervolgens CAD uitgevoerd worden met zowel hoge als lage collision-energieën. Dit resulteerde in een totaal van 12 verschillende operatiemodi. Uit de evaluatie van al deze mogelijkheden konden we besluiten dat de SIM-modus de meest verkozen modus is voor analyse van componenten in een eenvoudige matrix (bvb. kwaliteitscontrole van standaarden), aangezien de beste S/N-verhouding verkregen werd. CAD daarentegen wordt verkozen wanneer componenten in een complexe matrix moeten bepaald worden (bvb. analyse van een component in serum of urine), aangezien CAD de selectiviteit verhoogt. Bij de ontwikkeling van een nieuwe meetprocedure is het steeds belangrijk dat deze 12 verschillende modi onderzocht worden om op die manier tot die modus te komen die resulteert in een optimale S/N-verhouding.

Vervolgens hebben we ook aangetoond dat UF als staalopzuivering bij analyse van peptiden en proteïnen een heel bruikbare techniek is die LC-MS/MS-analysen voorafgaat. Men moet wel steeds waakzaam zijn voor matrixeffecten of suppressie van de ionisatie veroorzaakt door co-eluerende bestanddelen. Deze effecten kunnen soms grotendeels vermindert worden door het staal vooraf 1:1 te verdunnen met het starteluens. Anderzijds wees dit nogmaals op het belang van de toepassing van isotoopdilutie.

Een ander knelpunt bij de analyse van peptiden/proteïnen is de stabiliteit van de standaard. Wij ervoeren dat de stabiliteit het best bewaard kon worden door de standaard op te lossen in 1% BSA-oplossing en vervolgens te verdelen in porties en bij -20°C te bewaren.

Opmerking: Deze onderwerpen zijn terug te vinden in volgende publicaties:

- Fierens C, Stöckl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. Strategies for the determination of insulin with tandem electrospray mass spectrometry: implications for other analyte proteins? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001;15:1433-41.

- Fierens C, Thienpont LM, Stöckl D, De Leenheer AP. A convenient method for the generation of negative and positive electrospray ionization mass spectra of proteins by gas-phase admission of volatile bases and acids via the nebulizing gas. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001;15:451-3.

- Fierens C, Thienpont LM, Stöckl D, De Leenheer AP. Overcoming practical limitations for the application of ultrafiltration in sample preparation for liquid chromatography mass spectrometry of small proteins. *Ann. Biochem.* 2000;285:168-9.

- Fierens C, Thienpont LM, Stöckl D, De Leenheer AP. Matrix effects in the quantitative analysis of urinary C-peptide by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000;14:936-7.

REFERENTIES

- (1) Karas M, Bahr U, Ingendoh A, Hillenkamp F. Laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989;28:760-1.
- (2) Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* 1991;63:1193A-1203A.
- (3) Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. *J. Chem. Phys.* 1968;49:2240-9.
- (4) Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
- (5) Fenselau C. MALDI MS and strategies for protein analysis. *Anal. Chem.* 1997;69:661A-5A.
- (6) Loo JA, Loo RRO. Applications of electrospray ionization. In: Cole RB, ed. *Electrospray ionization mass spectrometry: Fundamentals, instrumentation & applications.* New York: John Wiley & Sons, 1997:385-419.
- (7) Kippen DA, Cerini F, Vadas L, Stöcklin R, Vu L, Offord RE, Rose K. Development of an isotope dilution assay for precise determination of Insulin, C-peptide, and Proinsulin level in non-diabetic and Type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J. Biol. Chem.* 1997;272:12513-22.
- (8) Dass C, Kusmierz JJ, Desiderio DM. Mass spectrometric quantification of endogenous beta-endorphin. *Biol. Mass. Spectrom.* 1991;20:130-8.

- (9) Barr JR, Maggio VL, Patterson Jr. DG, Cooper GR, Henderson LO, Turner WE, Smith SJ, Hannon WH, Needham LL, Sampson EJ. Isotope dilution-mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I. *Clin. Chem.* 1996;42:1676-82.
- (10) Kobold U, Jeppsson JO, Dülffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A_{1c} based on peptide mapping. *Clin. Chem.* 1997; 43:1944-51.
- (11) Bunk DM, Welch MJ. Electrospray ionization mass spectrometry for the quantitation of albumin in human serum. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997;8:1247-54.
- (12) Roberts NB, Green BN, Morris N. Potential of electrospray mass spectrometry for quantifying glycohemoglobin. *Clin. Chem.* 1997;43:771-8.
- (13) Stöcklin R, Vu L, Vadas L, Cerini F, Kippen AD, Offord RE, Rose K. A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes* 1997;46:44-50.
- (14) Mitchell AE, Morin D, Lakritz J, Jones D. Quantitative profiling of tissue-and gender-related expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the mouse. *Biochem. J.* 1997;325:207-16.
- (15) Wilbert SM, Engrissei G, Yau EK, Grainger DJ, Tatalick L, Axworthy DB. Quantitative analysis of synthetic peptide, NR58-3.14.3, in serum by LC-MS with inclusion of a diastereomer as internal standard. *Anal. Biochem.* 2000;278:14-21.
- (16) Desiderio DM. Mass spectrometric analysis of neuropeptidergic systems in the human pituitary and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999;731:3-22.
- (17) Kobayashi N, Kanai M, Seta K, Nakamura K. Quantitative analysis of synthetic human calcitonin by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1995;672:17-23.

- (18) Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. (Review article). *Biochem. J.* 2001;355:545-61.
- (19) Gaskell SJ. Electrospray: principles and practice. *J. Mass Spectrom.* 1997;32:677-88.
- (20) Iavarone AT, Jurchen JC, Williams ER. Effects of solvent on the maximum charge state and charge state distribution of protein ions produced by electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000;11:976-85.
- (21) Marie G, Serani L, Lapr evote O, Das BC. Influences of pH and in-source collisional energy on the cationization of insulin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998;12:1182-6.
- (22) Fligge AT, Bruns K, Przybylski M. Analytical development of electrospray and nanoelectrospray mass spectrometry in combination with liquid chromatography for the characterization of proteins. *J. Chromatogr. B.* 1998;706:91-100.
- (23) Thomson BA. Declustering and fragmentation of protein ions from an electrospray ion source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997;8:1053-8.
- (24) Loo JA, Loo RRO, Light KJ, Edmonds CG, Smith RD. Multiply charged negative ions by electrospray ionization of polypeptides and proteins. *Anal. Chem.* 1992;64:81-8.
- (25) Konermann L, Douglas DJ. Unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: a comparison of positive and negative ion modes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998;9:1248-54.
- (26) Cheng X, Gale DC, Udseth H, Smith RD. Charge state reduction of oligonucleotide negative ions from electrospray ionization. *Anal. Chem.* 1995;67:586-93.
- (27) Mirza UA, Chait BT. Effects of anions on the positive ion electrospray ionization mass spectra of peptides and proteins. *Anal. Chem.* 1994;66:2898-2904.

- (28) Kelly MA, Vestling MM, Fenselau CC, Smith PB. *Org. Mass Spectrom.* 1992; 27:1143.
- (29) Zhou S, Cook KD. Protonation in electrospray mass spectrometry: wrong-way-round or right-way-round? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000;11:961-6.
- (30) Le Blanc JCY, Wang J, Guevremont R, Siu KWM. *Org. Mass Spectrom.* 1994;29:587.
- (31) Mansoori BA, Volmer DA, Boyd RK. 'Wrong-way-round' electrospray ionization of amino acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997;11:1120-30.
- (32) Muddiman DC, Cheng X, Udseth HR, Smith RD. Charge-state reduction with improved signal intensity of oligonucleotides in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 1996;7:697-706.
- (33) Kebarle P, Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem.* 1993; 65:972A-86A.
- (34) Papayannopoulos IA. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom. Rev.* 1995;14:49-73.
- (35) Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Bio-med. Environm. Mass Spectrom.* 1988;16:99-111.
- (36) Falick AM, Hines WM, Medzihradzky KF, Baldwin MA, Gibson BW. Low mass ions produced from peptides by high energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993;4:882-93.
- (37) Loo RRO, Udseth AR, Smith RD. Evidence of charge inversion in the reaction of singly charged anions with multiply charged macroions. *J. Phys. Chem.* 1991;95: 6412-15
- (38) Loo RRO, Udseth AR, Smith RD. A new approach for the study of gas-phase ion-ion reactions using electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1992;3:695-705.

- (39) Griffey RH, Sasmor H, Greig MJ. Oligonucleotide charge states in negative ionization electrospray mass spectrometry are a function of solution ammonium ion concentration. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997;8:155-60.
- (40) Stephenson JJJ, McLuckey SA. Charge manipulation for improved mass determination of high-mass species and mixture components by electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1998;33:664-72.
- (41) Stephenson JJJ, McLuckey SA. Simplification of product ion spectra derived from multiply charged parent ions via ion/ion chemistry. *Anal. Chem.* 1998;70:3533-44.
- (42) Stephenson JJJ, McLuckey SA. Ion/ion reactions for oligopeptide mixture analysis: application to mixtures comprised of 0.5-100 kDa components. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998;9:957-65.
- (43) Stephenson JJJ, McLuckey SA. Charge reduction of oligonucleotide anions via gas-phase electron transfer to xenon cations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997;11:875-80.
- (44) Ebeling DD, Westphall MS, Scalf M, Smith LM. Corona discharge in charge reduction electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000;72:5158-61.
- (45) Scalf M, Westphall MS, Smith LM. Charge reduction electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000;72:52-60.
- (46) Loo JA, Edmonds CG, Smith RD. Tandem mass spectrometry of very large molecules. 2. Dissociation of multiply charged proline-containing proteins from electrospray ionization. *Anal. Chem.* 1993;65:425-38.
- (47) Loo JA, Ogorzalek Loo RR, Light KJ, Edmonds CG, Smith RD. Multiply charged negative ions by electrospray ionization of polypeptides and proteins. *Anal. Chem.* 1992;64:81-8.

- (48) Roepstroff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984;11:601.
- (49) Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT. Novel fragmentation process of peptides by collision induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem.* 1987;59:2621-5.
- (50) de Collongue-Poyet B, Vidal-Madjar C, Sebille B, Unger KK. Study of conformational effects of recombinant interferon γ adsorbed on a non-porous reversed-phase silica support. *J. Chromatogr. B* 1995;664:155-61.
- (51) Hossain MD. The effects of denaturation in the displacement chromatographic behaviour of proteins. *Chemical Engineering Journal* 1992;49:B29-B39.
- (52) McNay J, Fernandez E. How does a protein unfold on a reversed phase liquid chromatography surface? *J. Chromatogr. A* 1999;849:135-48.
- (53) Wu S, Figueroa A, Karger B. Protein conformational effects in hydrophobic interaction chromatography retention characterization and the role of mobile phase additives and stationary phase hydrophobicity. *J. Chromatogr.* 1986;371:3-27.
- (54) Roettger B. Adsorption phenomena in hydrophobic interaction chromatography. *Biotech. Progress* 1989;5:79-88.
- (55) Geng X, Regnier FE. Retention model for proteins in reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1984;296:15-30.
- (56) Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC, Kuhlmann FE. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *J. Chromatogr. A* 1995;712:177-90.
- (57) Ikonomou MG, Blades AT, Kebarle P. Investigations of the electrospray interface for liquid-chromatography mass-spectrometry. *Anal. Chem.* 1990;62:957-67.

- (58) Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC-MS/MS analyses of biological fluids: A method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal. Chem.* 1998;70:882-9.
- (59) Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK. Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998;18:347-57.
- (60) Pollettini A, Marrubini-Bouland G, Montagna M. Development of a coupled-column liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the direct determination of betamethasone in urine *J. Chromatogr. B* 1998;713:339-352.
- (61) Vivascience, Ltd. (1999) Vivaspin 500 μ L, 2 mL and 4 mL; technical data and operating instructions. Lincoln, UK.
- (62) Filtron Technology Corporation (1999) Microsep Microconcentrators, operating instructions. Northborough, MA.
- (63) Fierens C, Thienpont LM, Stöckl D, De Leenheer AP. Matrix effect in the quantitative analysis of urinary C-peptide by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000;14:936-7.
- (64) Fierens C, Thienpont LM, Stöckl D, De Leenheer AP. Overcoming practical limitations for the application of ultrafiltration in sample preparation for liquid chromatography/ mass spectrometry of small proteins. *Anal. Biochem.* 2000;285:168-9.
- (65) Michrom BioResources (2002). Product information: Trap cartridges. Auburn, CA, USA.
- (66) Carrasquillo KG, Sanchez C, Griebenow K. Relationship between conformational stability and lyophilization-induced structural changes in chymotrypsin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2000;31:41-53.

- (67) Benahmed A, Ranger M, Leroux JC. Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide). Pharm. Res. 2001;18:323-8.
- (68) Deutscher MP. Maintaining protein stability. Methods Enzymol. 1990; 182:83-6.

HOOFDSTUK IV

ONTWIKKELING VAN EEN REFERENTIEMEETPROCEDURE VOOR DE BEPALING VAN C-PEPTIDE IN URINE

IV.1 Inleiding

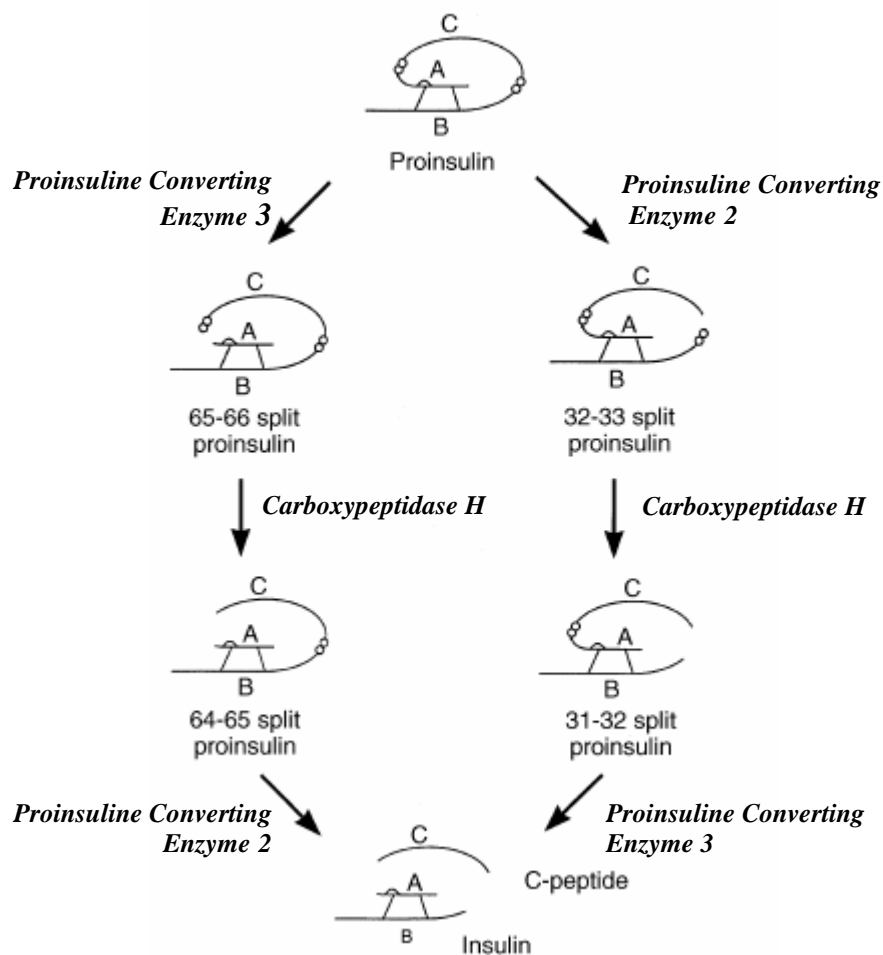
IV.1.1. De fysiologie van C-peptide

De β -cellen van de pancreas synthetiseren een 86 aminozuren tellend lineair polypeptide, proinsuline, de precursor van insuline en C-peptide. De twee verbindingen tussen insuline en C-peptide worden gekenmerkt door de aanwezigheid van een paar basische aminozuren nl. Lys-Arg aan de C-terminus of Arg-Arg aan de N-terminus van C-peptide. Deze dibasische aminozuren worden herkend als doelwit voor enzymatische splitsing door 2 endopeptidases, nl. het prohormoon convertase 2 en 3 (PC 2 en PC 3), die een splitsing veroorzaken aan het C-terminale uiteinde van het paar. Vervolgens wordt de afsplitsing van de 2 aminozuren vervolledigd door een exopeptidase, nl. carboxypeptidase H, en wordt de heterodimere insulinemolecule en het residueel ~ 3000 Da fragment, nl. het connecterend ("C") peptide, in de circulatie gebracht (1) (figuur IV.1.). Dit hele proces wordt gecontroleerd door een feedbackmechanisme van de plasma glucoseconcentraties. De activiteit van PC2 (en niet van PC3) stijgt namelijk parallel met de proinsulineconcentratie in de pancreas, als antwoord op een stijging van het glucosegehalte. De splitsing door PC3 wordt dan de snelheidsbeperkende stap.

Er wordt verondersteld dat C-peptide een belangrijke rol speelt in de synthese van insuline. Bij de synthese van de zwavelbruggen tussen de A- en B-keten van insuline (figuur III.5.) zorgt het nl. voor een correcte paring van de cysteïneresiduen tussen A7 en B7, A20 en B19 en A6 en A11. Op die manier zou de vorming van een correcte secundaire en tertiaire structuur van insuline vergemakkelijkt worden (2, 3).

Aangezien insuline en C-peptide samen gesecreteerd worden, is er voor elke molecule insuline ook een molecule C-peptide aanwezig in ons lichaam (4). Niettegenstaande deze equimolaire concentraties in het bloed tijdens piekmomenten van de secretie van de β -cellen van de pancreas, zijn de perifere concentraties niet meer gelijk. Dit is te wijten aan het feit dat

de metabole klaringssnelheid van C-peptide (4.6 mL/min) beduidend lager is dan die van insuline (16.4 mL/min). C-peptide wordt voornamelijk gemetaboliseerd in de nieren. De renale excretie maakt voor 69% deel uit van de totale metabole klaring (nota: voor insuline bedraagt dit slechts 33%) (5).



Figuur IV.1. Voorstelling van de vorming van insuline en C-peptide uit de proinsulinemolecule.

IV.1.2. Diagnostische toepassingen

Sinds de ontdekking van C-peptide en insuline werd het interessant om beide peptiden te bepalen zowel voor diagnostische als research doeleinden. Juiste metingen van plasma insuline en C-peptide zijn van het grootste belang bij patiënten met diabetes mellitus, maar ook in andere pathofysiologische toestanden, zoals bvb. bij obesitas (6-8). C-peptidebepalingen worden uitgevoerd wanneer men vermoedt dat een persoon aan diabetes mellitus lijdt, maar waar het nog niet duidelijk is of de persoon aan type 1 of type 2 diabetes lijdt. Personen van wie de pancreas niet meer in staat is om insuline te produceren (type 1 diabetes of insuline-afhankelijke diabetes, IDDM), hebben gewoonlijk sterk verminderde insuline- en C-peptideconcentraties. Personen daarentegen met type 2 diabetes (of niet-insuline-afhankelijke diabetes, NIDDM) hebben normale of verhoogde C-peptideconcentraties. Op die manier kan een onderscheid gemaakt worden tussen IDDM en NIDDM (9).

De relatief hoge urinaire klaring van C-peptide en de afwezigheid van een belangrijke hepatische klaring doen veronderstellen dat de bepaling van urinair C-peptide een indicator is om de hoeveelheid insuline, die gesecreteerd werd gedurende een specifiek tijdsinterval, te evalueren. In tegenstelling tot de insuline plasmaconcentraties, die variëren in antwoord op de maaltijden, geven de metingen van de 24-uurs urinaire secretie van C-peptide een nuttig beeld van de gemiddelde β -cel secretie. Bovendien biedt de bepaling van urinair C-peptide ook nuttige informatie in omstandigheden waarbij het niet mogelijk is om betrouwbare insulinemetingen uit te voeren (bvb. door de vorming van insuline antilichamen). De bepaling van C-peptide kan ook gebruikt worden als indicator voor de insulineproductie in die gevallen waar exogeen insuline (afkomstig van injectie) en endogeen insuline (door het lichaam geproduceerd) gemengd zijn. In deze situatie zou het immers weinig zin hebben insuline zelf te meten. Een andere veelgebruikte toepassing waarvoor de bepaling van urinair C-peptide nuttig is, is de evaluatie van de β -cel activiteit van de pancreas bij diabetespatiënten die behandeld worden met insuline. Een stijging van de insulinebehoefte is goed gecorreleerd met een daling van de C-peptideconcentratie in serum en urine.

In volgende gevallen kan ook overgegaan worden tot de bepaling van urinair C-peptide:

- Diagnose van insulinegeïnduceerde nagebootste hypoglycemie (6).
- Bijdrage in de diagnose van insulinoma (6).
- Bepaling van residueel pancreasweefsel na een pancreatectomie of bepaling van de insulinesecretie na pancreastransplantatie (10).

IV.1.3. Bestaande meetprocedures voor de bepaling van C-peptide

Voor de routineanalyse van C-peptide is er een brede waaier aan commerciële immunotestsystemen zoals RIA-, enzyme gelinkte - (ELISA) of chemiluminescente immunotestsystemen beschikbaar. De meeste systemen zijn ontwikkeld voor de bepaling van C-peptide in zowel serum als in urine. Voor de bepaling in urine worden de stalen voorafgaandelijk verdund met een door de fabrikant bijgeleverde verdunningsoplossing. De verdunning is noodzakelijk omdat voor de bepaling van C-peptide in urine dezelfde standaardcurve gebruikt wordt als voor de bepaling in serum en de urinaire concentraties veel hoger zijn dan die in serum.

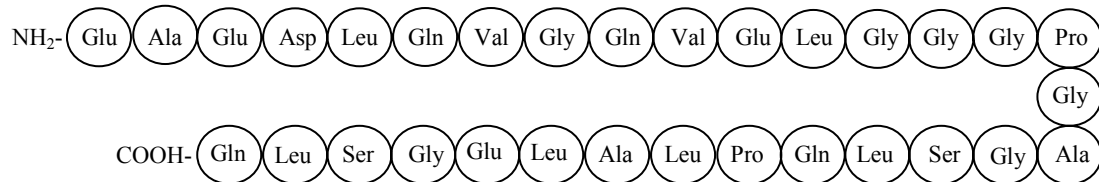
Niettegenstaande de huidige grote beschikbaarheid aan immunotestsystemen voor de bepaling van C-peptide was hun ontwikkeling een grote uitdaging. Dit is vooral te wijten aan het feit dat C-peptide relatief klein is (nl. 31 aminozuren) en een heel lage antigeniciteit heeft door de afwezigheid van een rigide secundaire en tertiaire structuur. In hoofdstuk V worden de problemen in de ontwikkeling en de kenmerken van enkele routinetestsystemen voor de bepaling van C-peptide meer in detail besproken. Aangezien diabetes mellitus vandaag de dag in onze Westerse wereld een veel voorkomende ziekte is en een correcte diagnose heel belangrijk is voor de behandeling, zou de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure, die de mogelijkheid biedt deze testsystemen te evalueren en te standaardiseren, heel nuttig zijn (11).

IV.1.4. Objectieven

Aangezien LC-MS een algemene techniek geworden is in de peptiden- en proteïne-analyse, wilden wij, zoals reeds in hoofdstuk I vermeld, voor deze klasse van substanties, die inderdaad enkel met LC-MS bepaalbaar zijn, overgaan tot de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure. Niettegenstaande dat de bepaling van C-peptide in serum een klinisch grotere betekenis heeft, werd toch verkozen de metingen uit te voeren in urine en dit wegens de gemakkelijkere beschikbaarheid van de stalen en het uitvoeren van MS-metingen. Deze studie moet model staan voor verdere ontwikkelingen van referentiemeetprocedures van peptiden en proteïnen. Dit objectief zou ons tevens toelaten het in ons laboratorium reeds bestaande referentiemeetprocedurepanel voor de bepaling van analyten die belangrijk zijn bij de behandeling en/of diagnose van diabetes, nl. glucose (12, 13) en glycohemoglobine (14, 15), uit te breiden.

V.1.5. Fysicochemische eigenschappen van C-peptide

Het proinsuline C-peptidefragment 33-63 ($C_{129}H_{211}N_{35}O_{48}$), afkomstig van de mens, is een lineair polypeptide dat bestaat uit 31 aminozuren en een Mr van 3020.3 bevat.



Figuur IV.2. De aminozuursequentie van C-peptide, afkomstig van de mens.

Daar C-peptide geen basische aminozuren (zoals lysine, arginine of histidine) bevat, maar overwegend uit zure aminozuren bestaat (zoals aspartaanzuur of glutaminezuur), beschikt het over een zuur karakter en een laag isoëlektrisch punt, nl. pI 3.2.

C-peptide is biologisch inert en het wordt praktisch volledig via de nieren geëxtraheerd in de urine, waar het stabiel blijft en ook kan gekwantificeerd worden.

Bij niet-diabetici bedraagt de urinaire concentratie van C-peptide 17-33 nmol/L (50-100 ng/mL) berekend uit 24 uurs-urine (16). In het serum ligt de concentratie van C-peptide ~40 keer lager, nl. in het bereik van 0.16-0.99 nmol/L (0.5-3.0 ng/mL).

Nota: verder in dit hoofdstuk zullen de concentraties uitgedrukt worden in ng/mL.

IV.2. Experimenteel gedeelte

IV.2.1. Standaarden, reagentia en urines

Voor kalibratie van de meetprocedure werd het proinsuline C-peptidefragment 33-63 standaardmateriaal aangekocht bij ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, Verenigde Staten). Het product werd afgeleverd in een vial die $250 \mu\text{g} \pm 5 \mu\text{g}$ gevriesdroogd standaardmateriaal bevatte met een peptidengehalte van 89% en een HPLC-zuiverheid van >99% (volgens de informatie van de fabrikant). Bij de berekening van het C-peptidegehalte in de kalibratoren werd rekening gehouden met de zuiverheid en het peptidengehalte. Standaardoplossingen werd bereid door het zorgvuldig afwegen van het toegevoegde volume ($\sim 1 \text{ mL}$) van een 1% protease-vrije BSA-oplossing (Sigma, St-Louis, MO, Verenigde Staten) in de vial. Deze 1% BSA-concentratie was vereist voor de stabiliteit van C-peptide in oplossing (III.4.). Er werd rekening gehouden met de dichtheid van de BSA-oplossing om het exact volume te kennen waarin de inhoud van de vial werd opgelost. Uit deze stockoplossing ($\sim 250 \text{ ng}/\mu\text{L}$) werd gravimetrisch een 1/5 verdunningsreeks met de 1% BSA-oplossing bereid, zodat werkoplossingen met een concentratie van respectievelijk 50 and $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ verkregen werden. Onmiddellijk na bereiding werden deze werkoplossingen verdeeld in $100 \mu\text{L}$ porties in polypropylenen vials en ingevroren bij -20°C tot de dag van analyse. Elke analysedag werd een andere portie ontdooid en gravimetrisch 1/10 verdund met de 1% BSA-oplossing zodat werkoplossingen van $\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ verkregen werden. Eens verdund werden de porties niet meer opnieuw ingevroren en hergebruikt.

Als IS werd in de preliminaire experimenten gebruik gemaakt van een C-peptide-homoloog, nl. tyrosine-C-peptide (Tyr-C-peptide, Mr 3183) aangekocht bij ICN Biomedicals. Het peptidengehalte bedroeg 89% en de zuiverheid van het product was >98%. Bij de optimalisatie en evaluatie van de meetprocedure werd gebruik gemaakt van een isotopisch gemerkt analoog, nl. $[^2\text{H}_{16}]$ -C-peptide (Mr 3036) aangekocht bij Bachem (Bubendorf, Zwitserland). Het peptidengehalte bedroeg 86.9% en de zuiverheid van het product was >93%.

TFA was afkomstig van Aldrich (Steinheim, Duitsland) en het gebruikte HCOOH was afkomstig van Fluka (Steinheim, Duitsland). Alle andere gebruikte chemicaliën waren “super-purity” solventen van Romil (Cambridge, Groot-Brittannië).

De stalen op basis van gelyofiliseerde urine en gebruikt als dagelijkse IQC voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure, waren de Bio-Rad Lyphochek[®] Quantitative Urine Controls Level 1, aangekocht bij Bio-Rad (Irvine, CA, Verenigde Staten).

De methodevergelijking werd uitgevoerd met 45 random urinestalen afkomstig van schijnbaar gezonde mannelijke of vrouwelijke vrijwilligers tussen de 15 en 65 jaar (voor een uitvoerige beschrijving van de stalen: zie hoofdstuk V).

IV.2.2. Apparatuur

Voor de gravimetrische staalname werd een 100g-Mettler balans, type AT261 Deltarange met afleesbaarheid tot op 10^{-5} g, gebruikt. Ultrafiltratie werd uitgevoerd met Centricon YM-3 filters (Millipore, Bedford, MA, Verenigde Staten) met een cut-off waarde van 3K en een horizontaal georiënteerd membraan vervaardigd uit RC. Centrifugatie gebeurde met een Biofuge primo R (Heraeus, Hanau, Duitsland) centrifuge met een kracht van $7000 \times g$.

De LC-MS-analysen werden uitgevoerd met een Micromass (Altrincham, Groot-Brittannië) VG Quattro II “triple stage” massaspectrometer uitgerust met een megaflow electrospray probe en een “cross flow counter” electrode. De MS was gekoppeld aan een Kontron (Milano, Italië) model 325 HPLC-systeem met een autosampler model 425. De eerste experimenten in de ontwikkeling werden uitgevoerd op een Hypersil PEP C18-kolom afkomstig van Alltech (Deerfield, IL, Verenigde Staten). Deze kolom had een lengte van 150 mm, een i.d. van 2.1 mm, een partikelgrootte van $5 \mu\text{m}$ en een poriëngrootte van 300 \AA . Voor de verdere optimalisering van de meetprocedure werd gebruik gemaakt van een polymeer Hamilton PRP-3 kolom (Reno, Nevada, Verenigde Staten) met een lengte van 50 mm, een i.d. van 2.1 mm, een partikelgrootte van $3 \mu\text{m}$ en een poriëngrootte van 300 \AA . Eenzelfde, maar langere kolom, nl. Hamilton PRP-3 150 x 2.1 mm, werd aangewend bij onderzoek naar de aanwezigheid van mogelijke interferenties. Alle kolommen werden tijdens de analyse in een kolomoven verwarmd tot 45°C . Een Valco splitter (Valco, Zwitserland) werd gebruikt om de solventpiek uit de massaspectrometer te splitsen.

Een LC-MS-analyse werd als volgt uitgevoerd: aan het retentaat werd $150 \mu\text{L}$ ultrapuur water toegevoegd, $30 \mu\text{L}$ hiervan werd op de C18-kolom gebracht. Gradiënt-chromatografie werd uitgevoerd met flow van $200 \mu\text{L}/\text{min}$. Als mobiele fase werd gebruik gemaakt van $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ in een verhouding van 100:0:0.02 (v/v) voor eluens A en 50:50:0.02 (v/v) voor eluens B. HCOOH werd via de “bubble trap” aan de gasfase

toegevoegd (III.2.7.). De runtijd voor 1 cyclus bedroeg 16 min. Het programma startte bij 90% eluens A, daarna werd eluens B verhoogd van 10 tot 70% in 10 minuten. Gedurende 2 minuten werd bij 70% eluens B gebleven en in de volgende 0.1 minuut keerde het systeem terug naar 90% eluens A. Gedurende 3.9 minuten werd de kolom gereëquilibreerd alvorens de volgende injectie gestart werd. Onder deze chromatografische condities elueerde C-peptide na ongeveer 10.5 minuten.

De massaspectrometrische bepalingen gebeurden onder wESI-. Volgende transitities werden geselecteerd om in de MRM-modus te monitoren; $[M-2H]^{2-}$ bij m/z 1509>1500 voor C-peptide en bij m/z 1517>1508 voor $[^2H_{16}]$ -C-peptide. Bij opname in de scanmodus werd gescand van m/z 50 tot 3000 in 4.0 s. De scantijd voor de metingen in de MRM-modus was 0.5 s, zodat minstens 15 keer onder de LC-piek gescand werd.

Als collisiegas werd argon gebruikt met een druk van 3.0×10^{-3} mbar. De collisie-energie werd ingesteld op 30 eV. De spanning op de cone en het capillair bedroeg respectievelijk 60 V en 3.5 kV. De brontemperatuur werd ingesteld op 175°C.

IV.2.3. Analyseprocedure voor de bepaling van C-peptide in urine

Er werd verkozen om de volledige analyse uit te voeren in polypropylenen materiaal dat vooraf gespoeld werd met een 1% BSA-oplossing.

De staalvoorbereiding voor de bepaling van C-peptide in urine was gebaseerd op UF. Het volume urine (max. 2 mL) aan UF onderworpen, werd zo berekend dat, afhankelijk van de C-peptideconcentratie in het staal, ongeveer 15 of 40 ng C-peptide door analyse ging. De urine werd nauwkeurig gepipetteerd en afgewogen in de 2 mL ultrafilters. Daaraan werd ook een gepaste hoeveelheid $[^2H_{16}]$ -C-peptide als IS gravimetrisch toegevoegd om uiteindelijk een 1:1 (\pm 5%) isotoopratio te verkrijgen gedurende de MS-metingen. Na een equilibratietijd van ~30 min werd UF uitgevoerd.

Ultrafiltratie met Centricon YM-3

In hoofdstuk III werd reeds beschreven dat voor staalopzuivering van C-peptide niet enkel ultrafilters met een cut-off waarde van 3K, maar ook ultrafilters met een cut-off waarde van 5K gebruikt kunnen worden. Wij hebben verkozen voor deze analyse toch gebruik te maken van filters met een cut-off waarde van 3K, nl. de Centricon YM-3 filters.

Na centrifugatie van de filters gedurende 45 min met een kracht van $7000 \times g$ werd $\sim 100 \mu\text{L}$ retentaat overgehouden. Hieraan werd $600 \mu\text{L}$ HPLC-water toegevoegd om het retentaat te wassen. Na goed mengen werd UF herhaald gedurende 25 min. Vervolgens werd voor een 2^{de} maal $600 \mu\text{L}$ HPLC-water toegevoegd en werd opnieuw gefiltreerd gedurende 25 min zodat een uiteindelijk retentaatvolume van $\sim 50 \mu\text{L}$ verkregen werd. Hieraan werd $150 \mu\text{L}$ HPLC-water toegevoegd. Na goed mengen werd het retentaat overgebracht in een polypropylenen vial. Vervolgens werd $30 \mu\text{L}$ hiervan rechtstreeks in het LC-MS-systeem geïnjecteerd.

IV.2.4. Bepaling van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure

IV.2.4.1. Specificiteit

De specificiteit werd nagegaan op zowel de ionentransitie van de ST als van de IS aan de hand van reële urinestalen. Om de aanwezigheid van storende substanties op de ionentransitie van de IS (m/z 1517>1508) op te sporen, werden urinestalen zonder IS voorbereid en geïnjecteerd op het LC-MS-systeem.

Om de zuiverheid van de ionentransitie van C-peptide (m/z 1509>1500) na te gaan, werd ten eerste de chromatografische resolutie verbeterd door gebruik te maken van langere HPLC-kolommen nl. een polymeer Hamilton PRP-3 kolom en een silica gebaseerde Hypersil PEP C18 kolom, beiden $150 \times 2.1 \text{ mm}$ i.d. kolommen. Daarbij werd de resolutie ook verbeterd door de gradiënt van de LC-MS-metprocedure te verlengen (van 10% B naar 90% B in 14 min i.p.v. 10 min).

Een tweede manier om de aanwezigheid van storende substanties op de ionentransitie van C-peptide na te gaan, was het monitoren van een andere ionentransitie in de negatieve ionisatiemodus, nl. in plaats van het meest intense fragment m/z 1509>1500 werd het fragment m/z 1509>1327 gevolgd.

IV.2.4.2. Detectielimiet

De detectielimiet bij een S/N-verhouding van 3 werd bepaald na injectie van zuivere standaardoplossingen met dalende C-peptideconcentraties in het LC-MS-systeem. De S/N-verhouding gedurende kwantificatie werd bepaald aan de hand van een urinestaal dat volledig door analyse was gegaan.

IV.2.4.3. Terugvinding van de ultrafiltratie

De terugvinding van de ultrafiltratie werd bepaald door vergelijking van de MS-ratio van 3 urinestalen, waaraan een gekende hoeveelheid IS (in een 1:1 verhouding) vóór en na ultrafiltratie werd toegevoegd. Dit werd herhaald gedurende 7 dagen.

IV.2.4.4. Nauwkeurigheid/Juistheid

Experimenten om de nauwkeurigheid/juistheid van de meetprocedure te bepalen, werden uitgevoerd met urine afkomstig van een type 1 diabetespatiënte die geen C-peptide meer produceert (= blanco urine). Nota: alvorens deze urine als basis voor deze experimenten te gebruiken, werd eerst de afwezigheid van C-peptide bevestigd.

Aan deze urine werd gravimetrisch een bepaalde hoeveelheid C-peptidestandaard toegevoegd, zodat uiteindelijk 3 urinestalen met een verschillende C-peptideconcentratie van respectievelijk 30.0, 148.2 en 264.9 ng/mL C-peptide, verkregen werden.

Gedurende 7 dagen werd van elk staal een geschikte hoeveelheid urine in duplicaat ingewogen, zodat telkens 60 ng C-peptide door analyse ging. Na deze staalname werd telkens gravimetrisch een geschikte hoeveelheid IS toegevoegd zodat een MS-ratio van 1:1 verkregen werd. Na ultrafiltratie werden deze stalen geanalyseerd met LC-MS.

IV.2.4.5. Precisie

De precisie, uitgedrukt in totale imprecisie (VC, %), werd berekend door de 3 in IV.2.4.4. vermelde urinestalen te meten in duplicaat gedurende 7 verschillende dagen.

De meetimprecisie van het LC-MS-systeem werd bepaald door een 10 µL van een ST/IS-oplossing 10 maal achtereenvolgens te injecteren onder de vooraf beschreven meetvoorwaarden.

De totale imprecisie van de methode werd ook berekend aan de hand van de resultaten van de 45 urinestalen die in drievoud bepaald werden voor de methodevergelijking. Hierbij werd voor de berekening van de imprecisie gebruik gemaakt van onderstaande formule. De SDs werden berekend uit de drievoudige meting van de individuele stalen en vervolgens “gepooled”.

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

De suffixen 1,2...tot k verwijzen naar de verschillende series metingen ($k = 45$) en n naar het aantal metingen per serie ($n=3$).

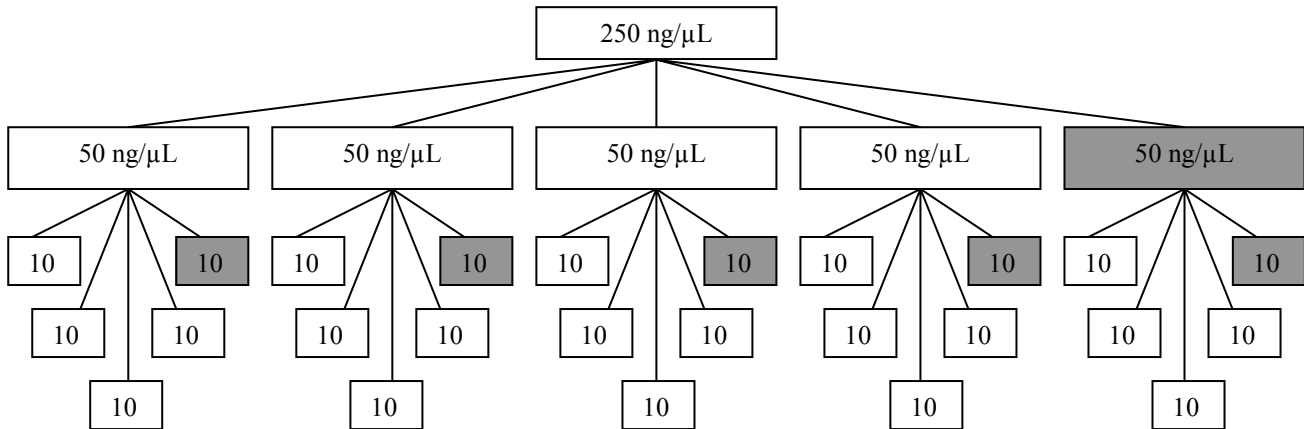
De VC (%) werd als volgt berekend: $VC = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$ waarbij \bar{x} de gemiddelde C-peptide-concentratie voorstelt.

IV.3. Resultaten en discussie

IV.3.1. Controle van de stabiliteit van de standaard

Het stabiel houden van een peptiden- of proteïnestandaard in oplossing is, zoals reeds beschreven werd in hoofdstuk III.4., niet eenvoudig. Na het uittesten van verschillende mogelijkheden om de stabiliteit te verhogen, merkten we op dat de stabiliteit van C-peptide in oplossing toenam met stijgende concentratie. Experimenteel stelden we inderdaad vast dat C-peptidestandaarden, met een concentratie van ~ 1 ng/ μ L of kleiner in een 1% BSA-oplossing, tijdens bewaring instabiel bleken te zijn. Hun concentratie was reeds $\sim 30\%$ verminderd na bewaring bij -20°C gedurende 24 uur. Standaarden daarentegen die ~ 10 ng/ μ L C-peptide bevatten, gaven na bewaring bij -20°C gedurende 1 of meerdere dagen, weken tot maanden steeds reproduceerbare resultaten. Aan de hand van deze vaststellingen besloten we, uitgaande van de C-peptidestockoplossing (~ 250 ng/ μ L), een 1/5 verdunningsreeks van de standaardoplossingen in een 1% protease-vrije BSA-oplossing te bereiden (figuur IV.3.). Om de invries- en ontdooicycli zoveel mogelijk te beperken, werden de oplossingen in porties van 100 μ L verdeeld en bewaard bij -20°C . Alle standaardoplossingen werden in polypropylenen vials bewaard. Polypropyleen werd verkozen boven glas om de mogelijke vorming van Na-adducten tegen te gaan. Vooraf werden deze vials ook gespoeld met een 1% BSA-oplossing. Dit zou een beschermende werking uitoefenen en de mogelijke interactie van C-peptide met polypropyleen verhinderen.

Om een controle te hebben over de stabiliteit van deze oplossingen tijdens bewaring werd telkens 1 portie per verdunningsreeks overgehouden (zie de lichtgrijs gekleurde porties in figuur IV.3.). Op regelmatige tijdstippen werden deze ten opzichte van elkaar getest. Onderling verschilden de geteste porties nooit meer dan 1.5%. Hieruit we konden besluiten dat deze bewaringsprocedure de stabiliteit van onze C-peptidestandaarden kon garanderen



Figuur IV.3. Overzicht van de aangelegde verdunningsreeks van de C-peptidestandaarden. De porties in het lichtgrijs aangeduid stellen de porties voor die werden overgehouden en waarmee onderling de stabiliteit werd getest. Nota: de concentraties zijn steeds in ng/μL uitgedrukt.

IV.3.2. Vereisten voor een referentiemeetprocedure

De ID-LC-MS/MS-meetprocedure werd ontwikkeld en geoptimaliseerd om te voldoen aan de analytische vereisten van een referentiemeetprocedure, nl. voldoende gevoeligheid, nauwkeurigheid/juistheid, precisie en goede specificiteit. Algemeen zijn hiervoor de staalopzuivering, de chromatografische en massaspectrometrische condities, de kalibratie en het feit van ID heel belangrijk.

IV.3.2.1. Kalibratie

Als standaardmateriaal werd proinsuline C-peptidefragment 33-63 standaardmateriaal aangekocht bij ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, Verenigde Staten). We zijn er ons wel van bewust dat voor een referentiemeetprocedure een internationale primaire standaard, indien deze beschikbaar is, zou moeten gebruikt worden. Voor C-peptide is de IRP 84/510 internationale standaard verkrijgbaar. Niettegenstaande zijn beschikbaarheid werd deze standaard toch niet verkozen als kalibrator voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure. Ten eerste werd uit economische redenen verkozen de ID-LC-MS/MS-meetprocedure te kalibreren met een commercieel beschikbare C-peptidestandaard met een hoge zuiverheid (>99%). Ten tweede beschouwen we de IRP-standaard zeker niet superieur aan het ICN-materiaal. De IRP-standaard is namelijk een recombinant product en bevat een onzuiverheid van ~10% (versus ~1% voor de ICN-standaard). Bovendien werd de inhoud van de ampul (10 μg) nominaal

toegekend door vergelijking met verschillende andere commercieel beschikbare C-peptide-standaarden (17). Normaliter moet die gecertificeerd zijn in termen van massa-eenheden bvb. na aminozuuranalyse en MS.

De bereiding en verdunning van onze standaardoplossingen gebeurden gravimetrisch in een 1% protease-vrije BSA-oplossing waarbij telkens rekening gehouden werd met de dichtheid van het oplosmiddel. Nota: wij zijn ons ervan bewust dat, alhoewel de bereiding van onze standaarden heel zorgvuldig en gravimetrisch werd uitgevoerd, de juistheid van onze standaarden nog steeds afhangt van de juistheid van het afvullen van de 250 µg product door de fabrikant. Die verzekerde ons een gewicht van 250 ± 5 µg. We hebben geprobeerd het gewicht te controleren, maar met onze balans was dit niet mogelijk met een voldoende nauwkeurigheid.

IV.3.2.1.1 Vergelijking ICN Biomedicals C-peptidestandaard en IRP 84/510 standaard

We beschikten over 1 ampul van 10 µg van de IRP-standaard. Hiermee konden we beide standaarden t.o.v. elkaar vergelijken. Uit deze vergelijking merkten we dat de C-peptideconcentratie van de IRP-standaard 20% lager lag dan die van de ICN-standaard. Helaas, zolang er geen internationaal erkende standaard beschikbaar is waarvan de concentratie in termen van massa-eenheden gedefinieerd is, is het onmogelijk te concluderen welke concentratie nu de juiste is. Nota: zoals hoger vermeld voor de ICN-standaard, hangt ook de juistheid van de IRP-standaard, afgeleverd in ampullen van 10 µg, af van de juistheid van het afvullen door de fabrikant. Ook voor de IRP-standaard kon het gewicht (10 µg) niet gecontroleerd worden.

IV.3.2.2. Isotoopdilutie

Het belang van het gebruik van een isotopisch gemerkte IS werd reeds in hoofdstuk II.2.3.1.2. en III.3.2. (over suppressie en matrixeffecten) aangetoond.

Wij beschikten over 2 isotopisch gemerkte analogen van C-peptide, nl. [$^2\text{H}_{14}$]-C-peptide met als label [$^2\text{H}_2$ -Gly^{8,13,14,15,17,19,28}] (Mr 3034) en [$^2\text{H}_{16}$]-C-peptide met als label [$^2\text{H}_8$ -Val^{7,10}] (Mr 3036). Eerst genoemde analoog was een gift van het medisch universitair centrum van Genève (Zwitserland). Slechts enkele µgrammen waren beschikbaar. Laatst genoemd analoog was weliswaar commercieel verkrijgbaar, maar gezien de hoge kostprijs

gingen wij toch op zoek naar een andere mogelijke IS, zoals een homoloog van C-peptide, waarmee onze eerste experimenten tijdens de ontwikkeling van deze meetprocedure konden uitgevoerd worden. Op die manier werd het commercieel beschikbare Tyr-C-peptide (Mr 3183) als mogelijke IS uitgetest. Tyr-C-peptide is een C-peptidemolecule waaraan nog een additioneel aminozuur, namelijk tyrosine, is gehecht. Al gauw werd een verschil in ionisatie duidelijk tussen C-peptide en Tyr-C-peptide. Het leek erop dat Tyr-C-peptide zich niet zo gemakkelijk liet ioniseren, waardoor steeds een 4-voudige concentratie Tyr-C-peptide moest ingewogen worden om uiteindelijk een MS-ratio van 1:1 te verkrijgen. Hieruit konden we dus vaststellen dat een homoloog vanuit 2 oogpunten niet geschikt was als IS. Ten eerste werd niet ideaal gecompenseerd voor variabelen bij de MS-meting. Ten tweede compenseerde hij, door de noodzaak om een 4-voudige hoeveelheid toe te voegen, niet ideaal voor staalvoorbereiding. Om bovenstaande redenen werd Tyr-C-peptide dus niet verder gebruikt als IS. Vermoedelijk zou C-peptide waaraan een kleiner aminozuur gehecht is meer geschikt zijn. Helaas werd dit niet getest aangezien dit niet commercieel beschikbaar was. Voor de optimalisatie en evaluatie van de meetprocedure werd daarom besloten gebruik te maken van de commercieel beschikbare [$^2\text{H}_{16}$]-C-peptide als IS.

De hoeveelheid IS werd gravimetrisch aan de stalen en standaarden toegevoegd. Aangezien ook hier de resultaten werden berekend door gebruik te maken van éénpuntskalibratie (18), werd zoveel mogelijk gestreefd om een MS-ratio van 1:1 te verkrijgen. Daarbij werd rekening gehouden met de massaspectrometrische overlap van de ST op de ionentransitie van de IS en omgekeerd (~3.5% en 4.5%, respectievelijk).

IV.3.2.3. Meetprotocol voor een referentiemeetprocedure

Het meetprotocol was zodanig dat steeds begonnen werd met 3 injecties van kalibratoren gevolgd door 4 urinestalen, 3 kalibratoren, enz. Dit afwisselend injecteren van standaarden en onbekenden werd gedaan om een eventuele drift van het toestel op te merken en fouten hierdoor te minimaliseren.

Bij uitvoering van de methodevergelijkingsstudie moest een panel van 45 urinestalen bepaald worden. We wilden echter zoveel mogelijk stalen op 1 meetdag bepalen. Gezien de lange analysetijden was het onmogelijk alle stalen op dezelfde meetdag te bepalen. Bijgevolg werden de stalen, voor meting met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure, in 2 groepen verdeeld. Per dag konden maximum 24 stalen in singlicaat gemeten worden. Het meetprotocol werd nu lichtjes gewijzigd en zag er als volgt uit: 2 injecties van kalibratoren gevolgd door 8 urine-

stalen, 2 kalibratoren, enz. Dit werd herhaald gedurende 6 meetdagen, zodat uiteindelijk voor elk staal 3 resultaten verkregen werden. De injectievolgorde van de stalen werd elke dag gewijzigd en de volgende meetdag werden telkens 2 stalen overlappend meegeanalyseerd, zodat eventuele stabiliteitsproblemen van de standaard konden waargenomen worden.

IV.3.2.4. Interne kwaliteitscontrole (IQC)

Voor de geldigheid van een referentiemeetprocedure is het aangeraden gecertificeerde controlestalen te gebruiken. Helaas, voor C-peptide zijn tot op heden geen gecertificeerde controlestalen met een urinematrix commercieel beschikbaar. Daarom selecteerden we een ander stabiel, gelyofiliseerd urinestaal, nl. Bio-Rad Lyphochek[®] Quantitative Urine Control Level 1, dat we als IQC gebruikten. Vooraf bepaalden we eerst zelf de C-peptideconcentratie van dit staal. Hiervoor werd elke meetdag een nieuw flesje lyofilisaat gereconstitueerd. De C-peptideconcentratie werd in duplicaat gemeten gedurende 7 opeenvolgende dagen. Telkens werd ook een onafhankelijke kalibratie uitgevoerd. De gemiddelde C-peptideconcentratie en het daarbijhorende 95% CI bedroeg 15.4 ± 0.5 ng/mL. Deze gemiddelde waarde werd als doelwaarde gebruikt.

Tijdens de metingen werd elke meetdag een IQC-staal in duplicaat meegeanalyseerd. Aangezien er tot op heden nog geen algemeen aanvaarde richtlijnen beschikbaar zijn waaraan een referentiemeetprocedure voor C-peptide moet voldoen, hebben wij ons min of meer gebaseerd op die voor de substraten en hormonen (19). We besloten een meetdag pas te aanvaarden wanneer de afwijking van het resultaat van 1 der metingen van de IQC en de doelwaarde kleiner was dan 3.5% en het verschil tussen de duplicaten niet meer dan 2.5% bedroeg. De gemiddelde afwijking van het IQC-staal t.o.v. de toegewezen waarde bedroeg 2.7%. Tenslotte dient vermeld te worden dat bij analyse van reële urinestalen, volgens bovenvermeld protocol, er boven op de IQC-regels, over gewaakt werd dat de VC maximaal 5% bedroeg.

IV.3.3. Bespreking van de meetcondities

IV.3.3.1. LC-condities in de LC-MS-meetprocedure

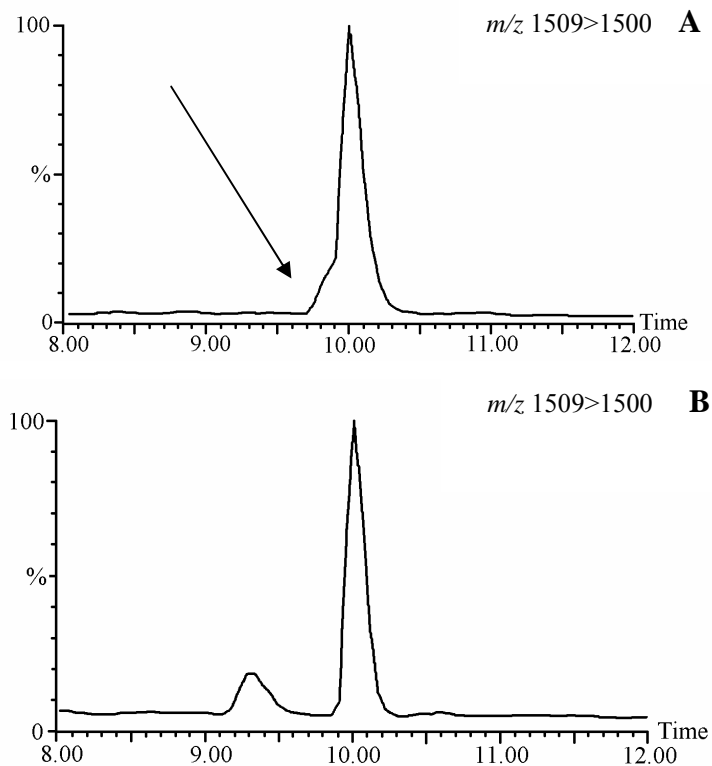
Bij de ontwikkeling van de meetprocedure werd tijdens de eerste experimenten gebruik gemaakt van een silica gebaseerde Hypersil PEP C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5 μ m, 300 Å) kolom. Gradiëntchromatografie werd uitgevoerd met flow van 170 μ L/min. Als mobiele fase werd gebruik gemaakt van H₂O/CH₃CN/*n*-C₃H₇OH/HCOOH/TFA in een verhouding van 80:20:1:0.06:0.01 (v/v) voor eluens A en 60:40:1:0.06:0.01 (v/v) voor eluens B.

Bij de verdere optimalisering van de meetprocedure werd overgeschakeld naar een kortere, meer robuuste polymeerkolom die speciaal ontworpen is voor de opzuivering en isolatie van peptiden en proteïnen, nl. een 50 x 2.1 mm Hamilton PRP-3 kolom. Vervolgens werd ook de samenstelling van het eluens vereenvoudigd. In de preliminaire experimenten werd nl. *n*-C₃H₇OH toegevoegd aan het eluens omdat dit de eigenschap zou bezitten een stabielere ionenstroom te produceren en de herequilibratie van de kolom te bevorderen (20), maar aangezien deze invloed van *n*-C₃H₇OH niet duidelijk merkbaar was, werd besloten *n*-C₃H₇OH voortaan weg te laten. Verder werd ook gebruik gemaakt van de mogelijkheid om HCOOH via de gasfase toe te voegen (III.2.7.). HCOOH was noodzakelijk om een voldoende zuur milieu te genereren, vereist voor de ionisatie van sommige stalen met een complexe matrix. Dit zuur milieu konden we immers niet bereiken door de TFA-concentratie op te drijven. Het is nl. algemeen gekend dat een hoge TFA-concentratie de ionisatie kan onderdrukken (III.3.1.1.). Bij een TFA-concentratie van 0.04% merkten we reeds dat de intensiteit van het C-peptidesignaal al voor een derde afgenomen was in vergelijking met het signaal verkregen bij gebruik van 0.02% TFA.

Bovendien leek het er op dat na de in gebruik name van de Hamilton PRP-3 kolom sommige stalen een ‘onzuiverheid’ vertoonden. Daarom besloten we de TFA-concentratie te optimaliseren. Hierbij werd er vooral naar gestreefd om de ‘onzuiverheid’ (figuur IV.4.A) volledig van de C-peptidepiek te scheiden. Enkel op die manier kon kwantificatie door oppervlakte-integratie (basislijn tot basislijn) zonder risico op interferentie verzekerd worden.

Deze kritische TFA-hoeveelheid werd bepaald door de TFA-concentratie te variëren van 0.01% naar 0.015% tot uiteindelijk 0.02%. Bij deze laatste concentratie was de ‘onzuiverheid’ volledig gescheiden van de C-peptidepiek (figuur IV.4.B) en was er een minimaal verlies aan gevoeligheid. De uiteindelijke mobiele fase was merkkelijk

vereenvoudigd en bestond nu uit: H₂O/CH₃CN/TFA in een verhouding van 100:0:0.02 (v/v) voor A en 50:50:0.02 (v/v) voor B.



Figuur IV.4.A & B. LC-MS/MS-chromatogram van een urinestaal waarbij in (A) elutie plaatsvond met eluens dat 0.01% TFA bevatte en waar een mogelijke ‘onzuiverheid’ op de ionentransitie van C-peptide aanwezig is en in (B) elutie plaatsvond met een eluens dat 0.02% TFA bevatte en waar de ‘onzuiverheid’ voldoende van de C-peptidepiek gescheiden is.

IV.3.3.2. MS-condities in de LC-MS-meetprocedure

Massaspectrometrisch werden de metingen uitgevoerd onder wESI- in de MRM-modus. De instelling van de conespanning (60 V) werd geoptimaliseerd zodat enerzijds maximale gevoeligheid verkregen werd, en anderzijds de kans op “in-source” fragmentatie beperkt bleef. CAD gebeurde onder milde, welbepaalde condities (collisie-energie 30 eV). Het enkelvoudig geladen moederion was nauwelijks zichtbaar in het spectrum. Het dubbel geladen moederion (m/z 1509) daarentegen vormde het voornaamste ion in het spectrum (figuur III.13.). Na het uitvoeren van CAD werd verkozen het meest intense fragment of de ionentransities m/z 1509>1500 en 1517>1508 voor C-peptide en [²H₁₆]-C-peptide respectievelijk, te monitoren.

IV.3.4. Bespreking van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure voor C-peptide

IV.3.4.1. Specificiteit

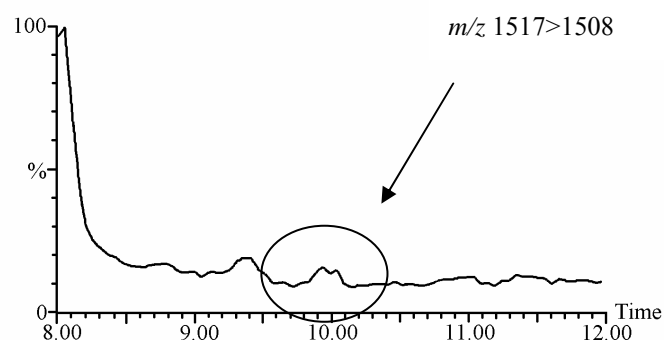
Voor de LC-MS-meetprocedure werd de specificiteit van de meting voor het grootste deel verzekerd door het theoretisch meetprincipe gebaseerd op MS. De MS-detectie werd uitgevoerd in de MRM-modus, wat een hoge selectiviteit verzekert. Na optimalisatie van de LC-condities werden telkens interferentievrije chromatogrammen (figuur IV.4.B) verkregen, waaruit we konden afleiden dat het gebruik van LC in combinatie met MS-detectie onder negatieve wESI in de MRM-modus een heel specifieke analyse van C-peptide toeliet.

Toch werden nog bijkomende experimenten met urinestalen uitgevoerd om de aanwezigheid van mogelijke storende substanties, op zowel de ionentransitie van C-peptide als van de IS, te kunnen uitsluiten. Het belang van dit grondig onderzoek wordt later uitgelegd in hoofdstuk V.

IV.3.4.1.1. Opsporen van storende substanties bij m/z 1517>1508 ($[^2\text{H}_8\text{-Val}^{7,10}]$ -C-peptide)

Het opsporen van substanties, anders dan de IS, op de ionentransitie van de IS kon op een eenvoudige manier gebeuren. Alle urinestalen werden nl. opgezuiverd zonder toevoeging van IS en vervolgens werd de ionentransitie van de IS, nl. m/z 1517>1508, gevolgd.

Buiten het verwachte aandeel van C-peptide op de ionentransitie van de IS (~3.5%) werd voor geen enkel staal de aanwezigheid van een storende substantie waargenomen (figuur IV.5.).



Figuur IV.5. Representatief ionenchromatogram bij het monitoren van de typische ionentransitie van de IS zoals verkregen na ID-LC-MS/MS-analyse van een urinestaal waaraan geen IS werd toegevoegd.

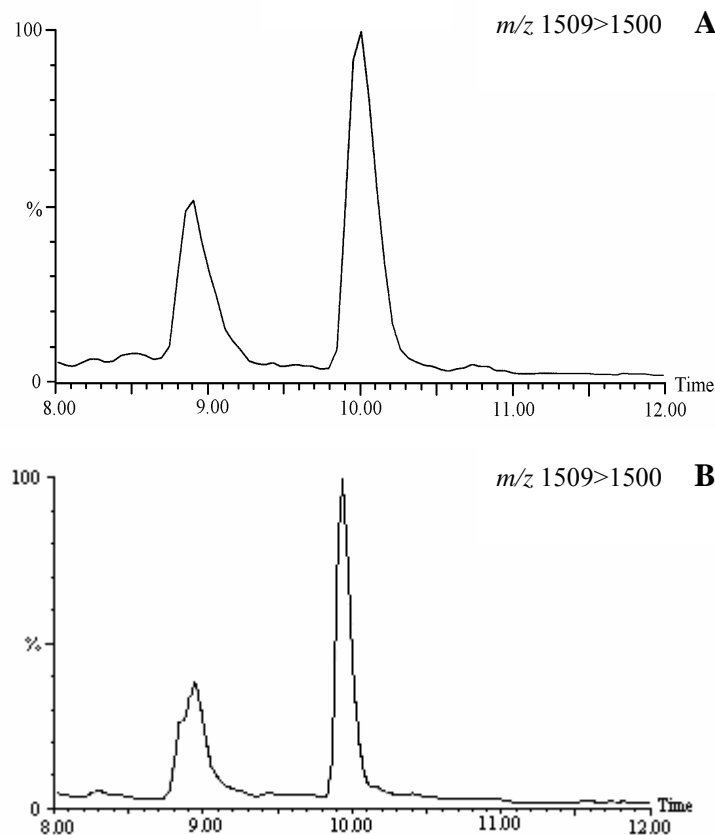
IV.3.4.1.2. Opsporen van storende substanties bij m/z 1509>1500 (C-peptide)

De aanwezigheid van substanties, anders dan C-peptide, op de m/z -waarde van de ionentransitie van C-peptide onderzoeken, was iets minder evident aangezien alle stalen endogeen C-peptide bevatten. Door de chromatografische resolutie te verbeteren of andere ionentransities te monitoren, kon de aanwezigheid van eventueel onderliggende, storende substanties toch zichtbaar gemaakt worden.

a) Verbeteren van de chromatografische resolutie

De chromatografische resolutie werd verbeterd door gebruik te maken van een langere kolom (150 x 2.1 mm i.p.v. 50 mm x 2.1 mm) met hetzelfde pakkingmateriaal, nl. Hamilton PRP-3 (figuur IV.6.A) en een langere kolom die een silicamatrix bevatte i.p.v. het polymeerpakkingmateriaal, nl. een Hypersil PEP C18 kolom (figuur IV.6.B).

Vervolgens werd HPLC-elutie uitgevoerd met een iets verschillende gradiënt (nl. van 10% eluens B naar 90% eluens B in 14 min i.p.v. 10 min).



Figuur IV.6.A & B. Representatief ionenchromatogram zoals verkregen na ID-LC-MS/MS-analyse van een urinestaal na chromatografie op een (A) Hamilton PRP-3 (150 x 2.1 mm) kolom en (B) Hypersil PEP C18 (150 x 2.1 mm) kolom.

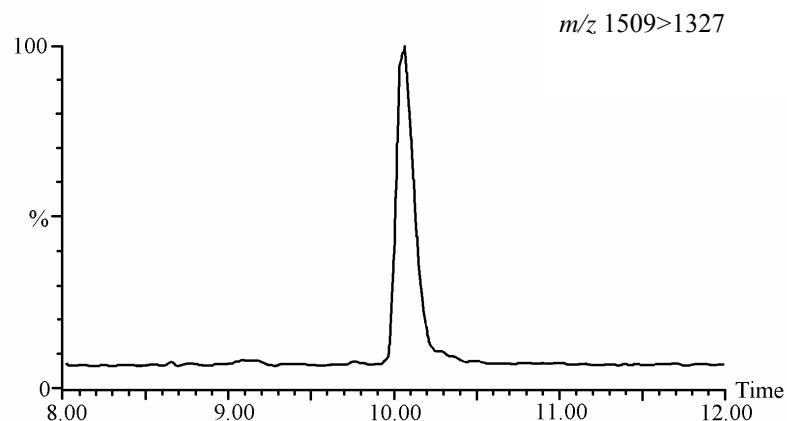
De resolutie van beide kolommen was inderdaad groter en, zoals blijkt uit figuur IV.6.A & B, werden ook bij deze kolommen geen additionele onzuiverheden waargenomen.

Tenslotte werd een urinestaal waaraan IS werd toegevoegd, opgezuiverd en dezelfde hoeveelheid van dit opgezuiverde staal werd op de 3 verschillende kolommen geïnjecteerd. Steeds werden dezelfde C-peptide/IS-ratio's verkregen. Ook dit bevestigt de afwezigheid van onderliggende substanties die dezelfde ionentransities als C-peptide vertonen.

b) Andere ionentransities

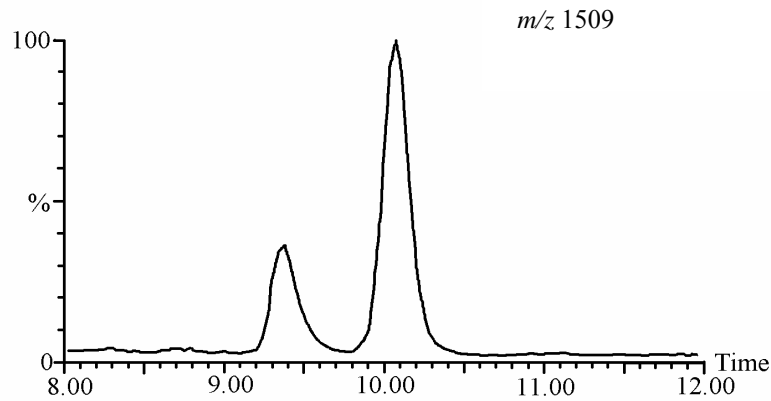
Tot slot werd de aanwezigheid van onzuiverheden nagegaan door een andere ionentransitie te monitoren. In plaats van het meest intense dochterion in het C-peptidespectrum na het uitvoeren van CAD te volgen, nl. het fragment m/z 1509>1500, werd besloten het fragment m/z 1509>1327 of het 2^{de} meest intense dochterion, te volgen.

Ook op deze ionentransitie werden geen onzuiverheden opgemerkt (figuur IV.7.). Daarenboven was de C-peptide/IS-ratio van een opgezuiverd urinestaal, waaraan IS werd toegevoegd, op beide ionentransities gelijk. Ook dit wees ook op de afwezigheid van onderliggende interferenties.



Figuur IV.7. Representatief ionenchromatogram zoals verkregen na ID-LC-MS/MS-analyse van een urinestaal bij het monitoren van ionentransitie m/z 1509>1327.

Tot slot werden (louter uit interesse) de bepalingen ook uitgevoerd in de SIM-modus (m/z 1509) (figuur IV.8.). Natuurlijk waren we ons ervan bewust dat deze modus minder specifiek was dan de MRM-modus. Zelfs in deze modus was er geen enkele aanwijzing voor de aanwezigheid van niet-specifieke substanties.



Figuur IV.8. Representatief ionenchromatogram zoals verkregen na ID-LC-MS/MS-analyse van een urine-staal bij het monitoren van ionentransitie m/z 1509.

Uit deze experimenten konden we besluiten dat de metingen van C-peptide met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure in de negatieve wESI MRM-modus specifiek verliepen. Hoe dan ook, kleine staalafhankelijke effecten in onze ID-LC-MS/MS-meetprocedure kunnen in echter nooit volledig uitgesloten worden.

IV.3.4.2. Detectielimiet

De detectielimiet werd getest met zuivere standaarden en was, bij een S/N-verhouding van 3, gelijk aan 90 pg (0.03 pmol) C-peptide voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure. Deze detectielimiet werd als voldoende beoordeeld, aangezien de urinaire C-peptideconcentratie (berekend op 24-uurs urine) bij gezonde personen tussen de 50 en 100 ng/mL bedraagt.

Om de S/N-verhouding gedurende kwantificatie met ID-LC-MS/MS te bepalen, werd 30 μ L van een opgezuiverd urinestaal (\sim 5 ng C-peptide) geïnjecteerd. De S/N-verhouding bedroeg \sim 75 wat er op wees dat de gevoeligheid voldoende was voor onze doelstelling, met name betrouwbare kwantificatie van C-peptide in urine.

IV.3.4.3. Terugvinding bij ultrafiltratie

In tabel IV.2. worden de gemiddelde terugvindingspercentages met hun 95% CI-interval van UF voorgesteld. Deze werden bepaald na analyse van 3 verschillende urinestalen op 5 opeenvolgende dagen.

Tabel IV.2. Terugvindingspercentages + 95% CI bij UF van 3 urinestalen gedurende 5 opeenvolgende dagen.

Urinestaal	Dag 1 (%)	Dag 2 (%)	Dag 3 (%)	Dag 4 (%)	Dag 5 (%)	Gemiddelde ± 95% CI (%)
1 (15 ng/mL)	92.6	93.4	93.0	93.9	91.7	93 ± 0.7
2 (45 ng/mL)	84.8	76.0	85.7	92.3	94.9	87 ± 6.5
3 (150 ng/mL)	84.2	77.7	83.0	86.0	87.6	84 ± 3.3

Uit deze resultaten merken we duidelijk dat de gemiddelde terugvinding van UF voor de 3 urinestalen steeds boven de 80% lag, wat wijst op een voldoende terugvinding. De grote verschillen in het 95% CI tussen urinestaal 1 en 2 zijn vermoedelijk te wijten aan staalgebonden effecten. Door het gebruik van een isotopisch gemerkte IS worden deze staalgebonden effecten opgevangen. Dit wijst nogmaals op het belang van het gebruik van een isotopisch gemerkte IS.

IV.3.4.4. Nauwkeurigheid/Juistheid

De nauwkeurigheid/juistheid van de meetprocedure werd bevestigd door aan een blanco urinestaal een gekende hoeveelheid C-peptidestandaard toe te voegen (tabel IV.3.). Om te voldoen aan de eisen van een referentiemeetprocedure moet de juistheid van een meetprocedure bepaald worden door analyse over een langere periode van gecertificeerde referentiecontrolematerialen. Aangezien momenteel geen gecertificeerde controlestalen met een urinematrix beschikbaar zijn voor C-peptide kon de juistheid op die manier niet bepaald worden en werd ze bepaald door aan blanco urine C-peptide toe te voegen.

Gemiddeld werd 100.5% van de toegevoegde C-peptideconcentraties teruggevonden, wat wijst op een hoge nauwkeurigheid/juistheid.

Tabel IV.3. Bepaling van de nauwkeurigheid/juistheid van de ID-LC-MS/MS-metprocedure van C-peptide door aan blanco urinestalen een gekende hoeveelheid C-peptidestandaard toe te voegen.

C-peptideconcentratie (ng/mL)	Juistheid (%) ± 95% CI (%)	n
30.03	96.44 ± 2.70	7
148.2	102.48 ± 1.52	7
264.9	102.71 ± 1.32	7

IV.3.4.5. Precisie

In tabel IV.4. wordt de totale imprecisie van de onafhankelijke analyse in duplicaat van 3 urinestalen met een C-peptideconcentratie tussen 30 en 265 ng/mL op 7 verschillende dagen voorgesteld.

De meetimprecisie van de meetprocedure, nagegaan met een ST/IS-oplossing, was <2% voor $n=10$.

Tabel IV.4. Totale imprecisie van 3 representatieve urinestalen.

Staal	VC (%)	n
Urinestaal 1 (30.0 ng/ μ L)	3.3	14
Urinestaal 2 (148.2 ng/ μ L)	2.0	14
Urinestaal 3 (264.9 ng/ μ L)	1.7	14

Na de bepalingen van de 45 urinestalen (tabel IV.5.) werd, uitgaande van de 3 meetresultaten per staal, de totale imprecisie van de meetprocedure berekend. De imprecisie bedroeg 3.0% wat overeenkwam met de eerder bepaalde imprecisie. Deze resultaten wijzen op een voldoende lage imprecisie van de methode.

IV.3.5. Toepassing

De meetprocedure werd, zoals reeds eerder beschreven, toegepast op 45 urinestalen. Een uitvoerige beschrijving van de herkomst van de stalen en het meetprotocol wordt in hoofdstuk V gegeven. De C-peptideconcentratie varieerde tussen 2.9 en 151.3 ng/mL, met een gemiddelde concentratie van 40.5 ng/mL.

In tabel IV.5. wordt een overzicht gegeven van de gemiddelde C-peptideconcentratie (en VC) voor elk urinestaal.

Tabel IV.5. Overzicht van de gemiddelde C-peptideconcentratie en VC voor elk urinestaal (n=3), zoals bepaald met de ID-LC-MS/MS-metprocedure.

Staal	Gemiddelde C-peptideconcentratie (ng/mL)	VC (%) (n=3)
1	85.68	2.32
2	25.72	1.36
3	11.57	2.12
4	73.71	1.44
5	30.08	2.17
6	13.34	1.33
7	60.74	1.77
8	90.08	3.18
9	151.34	2.34
10	56.10	3.21
11	44.64	3.24
12	31.85	0.73
13	8.55	3.94
14	10.30	5.34
15	29.19	3.03
16	38.23	1.50
17	46.88	1.94
18	13.81	0.14
19	52.48	0.27
20	25.07	2.55
21	25.04	2.20
22	9.38	2.01
23	2.95	3.90
24	59.71	1.62

Hoofdstuk IV: Ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van C-peptide in urine

25	107.28	3.42
26	26.79	0.08
27	34.24	1.02
28	17.61	0.26
29	22.61	2.39
30	35.15	0.73
31	41.74	1.89
32	20.22	2.03
33	26.40	1.73
34	28.86	2.16
35	33.52	1.67
36	103.94	2.30
37	30.33	2.46
38	17.20	1.85
39	34.48	1.95
40	19.99	2.05
41	57.81	1.33
42	100.48	2.72
43	29.66	1.80
44	8.55	2.53
45	59.80	2.54

Uit deze resultaten kunnen we vaststellen dat voor de ontwikkelde ID-LC-MS/MS-meetprocedure een VC van 3.5% haalbaar is.

IV.4. Besluit

We zijn er in geslaagd een meetprocedure op basis van ID-LC-MS/MS te ontwikkelen voor de bepaling van urinair C-peptide met voldoende specificiteit, gevoeligheid, precisie en nauwkeurigheid/juistheid. Als IS werd een isotopisch gemerkt analoog, [²H₁₆]-C-peptide, gebruikt en de staalvoorbereiding gebeurde met ultrafiltratie. Deze meetprocedure werd toegepast voor de kwantificatie van C-peptide in urinestalen van 45 willekeurige, schijnbaar gezonde vrijwilligers en kan voorgesteld worden als basis voor een referentiemeetprocedure.

Om als volwaardige referentiemeetprocedure te kunnen optreden is de beschikbaarheid van een internationale erkende primaire standaard met een hoge zuiverheid en waarvan de massa nauwkeurig gedefinieerd is in termen van massa-eenheden vereist. Verder is er nood aan een gecertificeerd controlemateriaal waarvan de waarde bepaald werd door een interlaboratoriavergelijkingsstudie. Ook moet de meetprocedure gevalideerd worden door deelname aan een interlaboratoriastudie, waarbij overeenkomst van resultaten wordt bewezen volgens de vooropgestelde eisen van nauwkeurigheid/juistheid en precisie, en dit onder toezien van een geautoriseerde organisatie (21, 22).

Opmerking: De ontwikkeling van deze meetprocedure werd gepubliceerd in:

- Fierens C, Thienpont LM, Stöckl D, Willekens E, De Leenheer AP. Quantitative analysis of urinary C-peptide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a stable isotopically labeled internal standard. *J. Chromatogr. A* 2000;896:275-8.

REFERENTIES

- (1) Kjems L, Bates D. The measurement of Insulin, C-peptide and Proinsulin in Diabetes Mellitus, DAKO, Glostrup, 1997.
- (2) Ashby J, Frier B. Circulating C-peptide: Measurement and Clinical applications. *Ann. Clin. Biochem.* 1981;18:125.
- (3) Steiner DF. On the role of the proinsulin C-peptide. *Diabetes* 1978;27:145-8.
- (4) Rendell M. C-peptide levels as a criterion in treatment of maturity-onset diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983;57:1198-206.
- (5) Katz AI, Rubenstein AH. Metabolism of proinsulin, insulin and C-peptide in rat. *J. Clin. Invest.* 1973;52:1113-21.
- (6) Bonser AM, Garcia-Webb P. C-peptide measurement: methods and clinical utility. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 19:297-351.
- (7) Clark PM, Hales CN. How to measure plasma insulin. *Diabetes/Metabolism reviews* 1994;10:79-90.
- (8) Clark PM. Insulin, proinsulin and C-peptide assays. *Proceedings of the UK NEQAS Meeting* 1994;1:138-43.
- (9) Madsbad S. Prevalence of residual beta-cell function and its metabolic consequences in type I (insulin-dependent) diabetics. *Diabetologia* 1983;24:141-7.
- (10) Madsbad S, Hartling SG, Faber OK. C-peptide and proinsulin. In: Alberti KG, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, eds. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, New York: John Wiley & Sons, 1992:301-35.

- (11) Clark PM. Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. *Ann. Clin. Biochem.* 1999;36:541-64.
- (12) Stöckl D, Reinauer H. Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method setup. *Clin. Chem.* 1993;39:993-1000.
- (13) Thienpont LM, De Leenheer AP, Stöckl D, Reinauer H. Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. II. Method transfer. *Clin. Chem.* 1993;39:1001-6.
- (14) Jeppsson JO, Kobold U, Mauri P, Miedema K, Mosca A, Niederau C, Paroni R, Susanto F, Thienpont LM. International network of reference laboratories for the determination of HbA1c. *Clin. Chem.* 1998;44:A22.
- (15) Willekens E, Thienpont LM, Stöckl D, Kobold U, Hoelzel W, De Leenheer AP. Quantification of glycohemoglobin in blood by mass spectrometry applying multiple-reaction monitoring. *Clin. Chem.* 2000;46:281-3.
- (16) Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994:928-1001.
- (17) Bristow AF, Das REG. WHO international reference reagents for human proinsulin and human insulin C-peptide. *J. Biol. Stand.* 1988;16:179-86.
- (18) Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, De Leenheer AP. Calibration for isotope dilution mass spectrometry – Description of an alternative to the bracketing procedure. *J. Mass Spectrom.* 1996;31:1119-1125.

- (19) Thienpont LM, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricos C, Siekmann L, Stöckl D. Analytical quality specifications for reference methods and operating specifications for networks of reference laboratories. [Discussion paper from the members of the External Quality Assessment (EQA) Working Group B on target values in EQAS]. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1995;33:949-57.
- (20) Loo JA, Loo RRO. Electrospray ionization mass spectrometry of peptides and proteins. In: Cole RB. *Electrospray ionization mass spectrometry: Fundamentals, instrumentation and applications.* New York: John Wiley & Sons 1997;385-420.
- (21) Müller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine [opinion]. *Clin. Chem.* 2000; 46:1907-9.
- (22) Thienpont LM, Van Uytfanghe K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 2002;323:73-87.

HOOFDSTUK V

TOEPASSING VAN DE REFERENTIEMEETPROCEDURE VOOR URINAIR C-PEPTIDE: EVALUATIE EN REKALIBRATIE VAN ROUTINEMEETPROCEDURES

V.1. Inleiding

In dit hoofdstuk beschrijven we de toepassing van onze ontwikkelde ID-LC-MS/MS-meetprocedure voor de bepaling van C-peptide in urine (hoofdstuk IV). Zoals in hoofdstuk IV reeds beschreven, kunnen we deze meetprocedure als kandidaat referentiemeetprocedure beschouwen. Daarom beslisten we na te gaan of deze meetprocedure zijn rol zou kunnen vervullen in het eerder uitgelegd herleidbaarheidsmodel (I.1.), dat bedoeld is om meetresultaten SI-herleidbaar te maken. Aangezien het gaat om de herleidbaarheid van meetresultaten voor patiëntenstalen, beslisten we inderdaad de evaluatie op urinestalen uit te voeren. Deze aanpak, om dezelfde stalen te bepalen met zowel de te evalueren routine- als met de referentiemeetprocedure, noemt men “split-sample” bepaling. Op die manier bestond de toepassing uit de evaluatie van een aantal commercieel beschikbare routinesystemen voor C-peptide in urine. Deze toepassing zou een interessante eindbestemming van de ontwikkelde ID-LC-MS/MS-meetprocedure kunnen betekenen, o.a. voor fabrikanten, omdat door de Europese wetgeving, nl. de “Directive on In Vitro Diagnostic Medical Devices” (1) geëist wordt dat de herleidbaarheid van de resultaten van routinemeetprocedures aan de hand van referentiemeetprocedures wordt aangetoond.

In ons laboratorium hebben we reeds een ruime ervaring op dit gebied. Er werden reeds vergelijkingsstudies uitgevoerd voor verschillende steroïdhormonen zoals cortisol (2), oestradiol-17 β (3) en testosteron (4), voor substraten zoals kreatinine (5) en cholesterol (6) en voor andere analyten zoals theofylline (7).

Methodevergelijkingen kunnen aangewend worden voor evaluatie van de juistheid van de kalibratie en/of de specificiteit van de routinetestsysteem. Deze evaluatie gebeurt door de vergelijking van de resultaten die verkregen werden met het routinesysteem met de ID-LC-MS/MS-meetwaarden. Uit de statistische en grafische voorstelling van de meetresultaten

(bvb. na lineaire regressie) kan de correlatie van de meetresultaten en de specificiteit van het routinemeetsysteem beoordeeld worden. De nauwkeurigheid/juistheid kan uit de waarde voor de intercept en richtingscoëfficiënt beoordeeld worden. Enkel wanneer de resultaten een voldoende specificiteit van het routinetestsysteem, maar een systematische afwijking t.o.v. de referentiemeetprocedure weergeven, en wanneer er bovendien ook een goede correlatie is tussen de resultaten van referentie- en de routinemeetprocedure, kunnen de resultaten van de methodevergelijking gebruikt worden om een correctie uit te voeren van de waarden van de routinetestsysteemkalibratoren (= ‘recalibratie’ van het immunotestsysteem). Na deze recalibratie is het dus te verwachten dat het routinesysteem in staat zal zijn meetresultaten voor patiëntenstalen te leveren die herleidbaar zijn naar SI-eenheden en dus juist zijn. De hele filosofie achter deze werkwijze is dat door het toekennen van de waarden aan de productkalibratoren van de fabrikant als het ware gecompenseerd wordt voor het mogelijks verschillend gedrag van kalibratoren en patiëntenstalen in de routinemeetprocedure, of het zogenaamde “matrix-effect” (8).

V.1.1. Objectieven

Het was ons objectief de herleidbaarheid van 5 immunotestsysteem voor de bepaling van urinair C-peptide na te gaan. De testsystemen werden allen zodanig ontwikkeld dat met dezelfde kit C-peptide zowel in serum als in urine bepaald kan worden (referenties 9 en 10 zijn reviews over de meettechnieken en klinische relevantie van de serum- en urine-toepassingen). De 5 routinetestsysteem werden geëvalueerd met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure waarvan de ontwikkeling in hoofdstuk IV beschreven werd. Hiervoor werd een serie van 45 urinestalen, afkomstig van schijnbaar gezonde vrijwilligers, gebruikt, die in parallel op de routinetestsysteem en op het ID-LC-MS/MS-systeem gemeten werd.

V.2. Routinetestsystemen voor C-peptide

V.2.1. Problematiek in hun ontwikkeling

De ontwikkeling van de immunotestsystemen voor de bepaling van C-peptide kende een grote uitdaging (9). Enkele knelpunten waren de stabiliteit van het peptide, de ontwikkeling van een standaard, de ontwikkeling van gemerkte C-peptideanalogen, de specificiteit van de antilichamen en de detectie. Vervolgens is een juiste kalibratie en voldoende specificiteit van de systemen moeilijk aan te tonen door de afwezigheid van een referentiemeetprocedure (11, 12) zoals een ID-LC-MS/MS-meetprocedure.

V.2.1.1. C-peptideantiseren

Het ontwikkelen van C-peptideantiserum is niet eenvoudig door de lage antigeniciteit van de molecule. Dit is een gevolg van het lage moleculair gewicht (Mr 3020.3) en de afwezigheid van een onbuigbare secundaire en tertiaire structuur (13, 14). Daarenboven kunnen er tussen de verschillende species enorme verschillen in aminozuursequentie optreden. Het isoleren van menselijk C-peptide is niet eenvoudig, waardoor in de meeste immunotestsystemen antilichamen tegen synthetisch bereid C-peptide (gebaseerd op humaan C-peptide) gebruikt worden.

Het produceren van gemerkte analogen voor bvb. chemiluminescentie- of RIA-testsystemen kent ook zijn moeilijkheden. Zo wordt bvb. voor RIA het merken van C-peptide met ¹²⁵I bemoeilijkt door de afwezigheid van tyrosineresiduen in de peptidenketen (10, 15). Alvorens te kunnen joderen, is het noodzakelijk om een tyrosinemolecule toe te voegen aan de aminozuurketen van C-peptide. De gemerkte analogen vereisen niet enkel zuiverheids- en stabiliteitscontrole, maar ook bevestiging van de immunologische identiteit met de natuurlijke molecule (16).

V.2.1.2. C-peptidestandaard en kalibratie

De productkalibratoren van de meeste testsystemen werden gestandaardiseerd tegen de internationale primaire standaard, nl. C-peptide IRP 84/510 (17), afkomstig van het “National Institute for Biological Standards and Control” (NIBSC). Ondanks dit feit treedt er, zoals via de hierbij beschreven methodevergelijking zal aangetoond worden, toch nog een grote

variabiliteit op tussen de resultaten van de verschillende immunotestsystemen voor analyse van dezelfde stalen. Dit bleek echter ook uit de resultaten van het certificatie rapport van de standaard (17). Hieruit kunnen we dus eigenlijk reeds besluiten dat kalibratie van verschillende testsystemen met een gemeenschappelijke kalibrator niet voldoende is voor standaardisatie. Dit is te wijten aan het ondertussen welgekende fenomeen niet-overdraagbaarheid of “non-commutability”, dat verklaart dat routinemeetprocedures zich anders kunnen gedragen met kalibratoren dan met natieve stalen (11).

V.2.1.3. Specificiteit van de systemen

De specificiteit van de meeste beschikbare testsystemen is niet optimaal (18). Een oorzaak voor deze onspecifieke metingen is de cross-reactiviteit met gelijkaardige proteïnen zoals proinsuline of niet-volledig gesplitste C-peptidefragmenten zoals Arg-Arg-C-peptide of C-peptide-Lys-Arg. Hierbij zou C-peptide-Lys-Arg het meest voorkomende fragment (tot 10% van de C-peptideconcentratie) zijn (19). Andere gekende interfererende componenten die in de literatuur beschreven zijn, zijn insuline, glucagon, somatostatine (16).

V.2.1.4. Geëvalueerde routinetestsystemen

De metingen met de routinetestsystemen, in het kader van de methodevergelijking, werden alle uitgevoerd in de respectievelijke applicatielaboratoria onder de directe supervisie van de verschillende fabrikanten/verdelers of in een routinelaboratorium. De volgende automatische routinetestsystemen werden geëvalueerd:

- 1) de chemiluminescente-metprocedure van Byk-Sangtec op de Liaison in het applicatielaboratorium van Diasorin, Brussel;
- 2) de chemiluminescente-metprocedure van DPC op de Immulite 2000 in het applicatielaboratorium DPC, Breda, Nederland;
- 3) de immuno-enzymometrische-metprocedure op de AIA-21 van Tosoh in het applicatielaboratorium van Eurogenetics, Tessenderlo.

De manuele routinesystemen waren:

- 4) de RIA-metprocedure van Biosource in het routinelaboratorium van het AZ Middelheim (Antwerpen) met de Biosource C-PEPsp-RIA kit;
- 5) de vernieuwde RIA-metprocedure van Biosource in het applicatielaboratorium van Biosource (Nivelles) met de Biosource C-PEP-RIA New kit.

Alle meetprocedures werden gebruikt volgens de voorschriften van de fabrikant. Aangezien alle kits ontworpen zijn voor zowel de bepaling van C-peptide in serum als in urine, was verdunning van de urinestalen met het bijgeleverde diluens vereist wegens het concentratieverschil van C-peptide in serum en urine.

In tabel V.1. wordt een beknopt overzicht van de technische karakteristieken van de verschillende meetprocedures voorgesteld. Daarna volgt een korte beschrijving van de respectievelijke systemen.

Tabel V.1. Overzicht van de technische karakteristieken van de C-peptide-immunotestsystemen (alle toepasbaar voor de bepaling van C-peptide in serum en urine).

Firma (teststelsel of kit)	Immunosysteem principe	Detectie- principe	Staalvolume (µL) (verdunning)
Diasorin (<i>Liaison</i>)	Sandwich	Luminescentie	50 (1:10)*
DPC (<i>Immulite 2000</i>)	Competitie	Luminescentie	75 (1:20 ¹)*
Eurogenetics (<i>AIA-21</i>)	Sandwich	Fluorescentie	20 (1:10)*
Biosource (<i>C-PEP_{sp}-RIA</i>)	Competitie	Radioactiviteit	100 (1:21)
Biosource (<i>C-PEP-RIA New</i>)	Competitie	Radioactiviteit	100 (1:21)

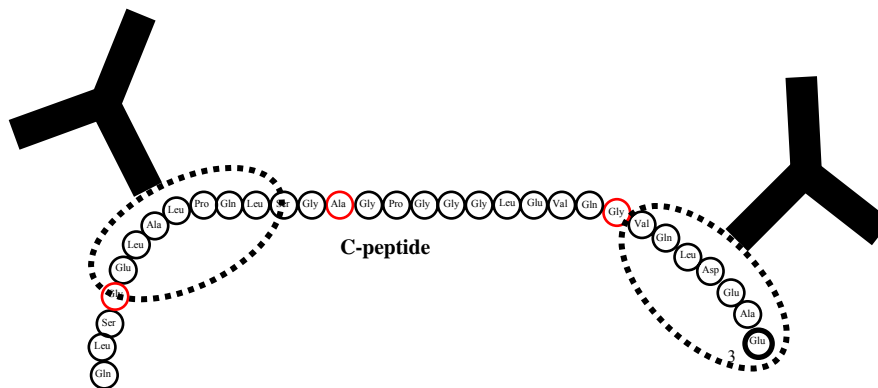
¹Sterk geconcentreerde stalen werden 1:40 verdund.

*Verdunning wordt automatisch gemaakt in het systeem

Diasorin (Liaison)

De Liaison C-peptidekit (Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Duitsland) is een tweezijdige immunoluminometrische test gebaseerd op het sandwichprincipe en wordt automatisch gemeten op de Liaison (Diasorin, Saluggia, Italië). Het C-peptide in het staal wordt eerst gebonden aan heel specifieke monoklonale anti-C-peptideantilichamen, die geïmmobiliseerd zitten op de wand van vele kleine magnetische partikeltjes. Het tweede anti-C-peptideantilichaam, dat zich zal binden op het gebonden C-peptide, is gemerkt met isoluminol.

Daarna volgt een wasstap, waarbij de overmaat aan gemerkte antilichamen weg-gewassen wordt, en het ‘starter reagens’, bestaande uit NaOH en H₂O₂, wordt toegevoegd. Hierbij treedt een chemiluminescente reactie op. Het lichtsignaal wordt gemeten in relatieve lichteenheden en is recht evenredig met de hoeveelheid C-peptide aanwezig in het staal. De urinestalen worden telkens 1/10 verdund om in het bereik van de standaardcurve (0.01 – 30 ng/mL) te vallen.



Figuur V.I. Voorstelling van de bindingsplaatsen van de 2 antilichamen op C-peptide bij de Liaison.

DPC (Immulite 2000)

De C-peptidekit op de Immulite 2000 (DPC, Los Angeles, CA, Verenigde Staten) is een immuno-enzymetrische test gebaseerd op het competitieprincipe. Aan het staal wordt een hoeveelheid C-peptide, gemerkt met alkalinefosfatase, toegevoegd. Dit gemerkt C-peptide en het C-peptide aanwezig in het staal treden in competitie voor de polyklonale anti-C-peptide-antilichamen die gebonden zijn op magnetische partikels. Na een incubatietijd van 60 min worden de magnetische partikels gewassen en wordt een chemiluminescent substraat (dioxetaan) toegevoegd en dit wordt gedurende 5 min geïncubeerd. De sterkte van het uitgezonden lichtsignaal is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid C-peptide aanwezig in het staal. Om in het bereik van de standaardcurve (0.5 – 7.0 ng/mL) te vallen, worden de urinestalen 1/20 verdund. Sommige sterk geconcentreerde stalen dienen zelfs 1/40 verdund te worden. De metingen werden uitgevoerd in het Nederlands applicatielaboratorium van DPC (Breda, Nederland).

Eurogenetics (AIA-21)

De AIA-C-peptidekit en het bijhorend Tosoh AIA-meetsysteem (Tosoh, Shiba, Minato-Ku Tokyo, Japan) is een tweestaps immuno-enzymometrisch testsysteem gebaseerd op het sandwichprincipe. Hier wordt het C-peptide aanwezig in het staal gebonden op monoklonale anti-C-peptideantilichamen, die geïmmobiliseerd zitten op de wand van

magnetische partikels. Simultaan bindt zich ook een tweede antilichaam, dat gemerkt is met alkalinefosfatase. Daarna worden de magnetische partikels gewassen zodat de niet-gebonden enzymegemerkte antilichamen verwijderd kunnen worden. Vervolgens wordt een fluorogeen substraat (4-methylumbelliferylfosfaat) toegevoegd en volgt een incubatietijd van 40 min waarin het substraat omgezet wordt tot het fluorogeen 4-methylumbelliferone. De gemeten fluorescentie wordt dan vergeleken met een standaardcurve waaruit de C-peptideconcentratie in het staal bepaald wordt. De gemeten hoeveelheid fluorescentie is evenredig met de C-peptideconcentratie aanwezig in het staal. Om in het bereik van de kalibratiecurve (0.3 – 19.3 ng/mL) te vallen, worden de urinestalen 1/10 verdund. De meting van de urinestalen met deze routinemeetprocedure gebeurde in het Europees hoofdkantoor van Tosoh, nl. Eurogenetics (Tessenderlo).

Biosource (C-PEPsp-RIA kit)

Deze Biosource C-PEPsp-RIA kit en de vernieuwde Biosource C-PEP-RIA New kit werden geëvalueerd als vertegenwoordigers voor de manuele RIA-systemen. Bij de klassieke kit berust het principe op een competitie tussen een hoeveelheid ^{125}I -Tyr-C-peptide en C-peptide aanwezig in het staal of standaard voor binding aan een antilichaam, dat geïmmobiliseerd zit op de wand van een polystyrenen buisje. Na een incubatietijd van 3 uur wordt het niet-gebonden ^{125}I -Tyr-C-peptide weggewassen en wordt de radioactiviteit geteld met behulp van een gammateller. De hoeveelheid radioactiviteit is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid C-peptide aanwezig in het staal. De metingen met deze routinemeetprocedure werden uitgevoerd in het klinisch laboratorium van het AZ Middelheim (Antwerpen). Het bereik van de standaardcurve is 0.9 – 15 ng/mL, bijgevolg dienen de urinestalen telkens 1/21 verdund te worden.

Biosource (C-PEP-RIA New kit)

Het verschil met de klassieke kit is dat in deze kit gebruik gemaakt wordt van 2 antilichamen i.p.v. 1. Het ^{125}I -gemerkt C-peptide treedt in competitie met C-peptide voor een bindingsplaats op de C-peptideantilichamen, afkomstig van een geit, die met een welbepaalde concentratie werden toegevoegd aan het staal. Deze antilichamen gaan op hun beurt reageren met konijnen anti-geitenantilichamen, die bevestigd zijn op de wand van een polystyrenen buisje. Verder verloopt deze meetprocedure gelijkaardig als de klassieke meetprocedure.

V.3. Experimenteel gedeelte

V.3.1. Urinestalen

Alle urinestalen voor de methodevergelijking werden random verzameld van 45 schijnbaar gezonde, vrijwillige mannelijke of vrouwelijke donoren tussen de 15 en 65 jaar. De stalen werden overeenkomstig de richtlijnen van de Ethische Commissie van de Universiteit Gent behandeld. Wat de collectiecondities betreft, werden de aanwijzingen van de fabrikanten, zoals vermeld in de bijsluiters van de C-peptidekits, gevolgd. Hierin werden er geen speciale voorzorgen voorzien. Er werd enkel een bewaring bij -20°C aangeraden wanneer de stalen niet binnen de 24 uur geanalyseerd konden worden. Toch hebben we enkele bijzondere voorzorgen genomen opdat we zouden kunnen verzekeren dat alle deelnemers van deze studie identieke porties ontvingen. Om die reden werden de urinestalen onmiddellijk na donatie in “bulk” ingevroren en bewaard bij -20°C tot de start van de meetcampagne (ongeveer 4 weken na het verzamelen van alle stalen). Juist voor de start van de studie werden de stalen ontdooid (en centrifugeerd indien nodig), verdeeld in 1 mL porties polypropylenen analysebuisjes (van het type “Eppendorf”) en daarna opnieuw ingevroren en bewaard bij -20°C . Vervolgens werden alle stalen op droog ijs tot bij de deelnemende firma’s of laboratoria gebracht. Bij aankomst werd telkens gecontroleerd of de stalen nog steeds diepgevroren waren. Ze werden pas op de dag van de analyse ontdooid en daarna nooit meer herbruikt. Al de metingen werden in een periode van 2 weken uitgevoerd.

De C-peptideconcentratie in de stalen varieerde tussen 2.9 en 151.3 ng/mL met een gemiddelde concentratie van 40.5 ng/mL, zoals bepaald met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure.

V.3.2. Interne kwaliteitscontroles voor de routinemeetprocedures

De interne kwaliteitscontrole van de immunotestsystemen werd uitgevoerd met de IQC-stalen, zoals aangeraden werd door de verschillende fabrikanten. Daarbij werd rekening gehouden met de kitspecifieke doelwaarden. De IQC-stalen waren de volgende: Bio-Rad Lyphochek[®] Immunoassay Plus Control materiaal voor Diasorin, de DPC C-Peptide ‘Control Modul’, de Eurogenetics Multi-analyte controlestalen en de Biosource kitcontrolestalen.

V.3.3. Analyseprotocol voor de evaluatie

De “split-sample” bepaling werd zo georganiseerd dat de maximale bewaartijd van de verdeelde urineporties 2 weken was. Om dit te bereiken werden de metingen in de verschillende testlaboratoria uitgevoerd in 1 week, nl. in de 2^{de} week van de ID-LC-MS/MS-metingen.

V.3.3.1. Metingen met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure

De metingen met ID-LC-MS/MS-meetprocedure werden uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk IV. In het kort wordt hier nog even het analyseprotocol beschreven. Door de lange analysetijd per staal vereiste een enkelvoudige meting van de 45 stalen 2 volledige analysedagen. Het meetprotocol bestond uit de injectie van 2 kalibratoren, 8 stalen, 2 kalibratoren, enz.... tot alle opgezuiverde stalen die dag gemeten waren. De IQC-stalen werden random in de serie in duplicaat gemeten. De metingen werden herhaald zodat aan het einde van de metingen voor elk staal 3 resultaten verkregen werden. Nota: het injectieschema van de stalen werd elke dag gewijzigd. Bovendien werd een meetdag slechts aanvaard indien de gemiddelde IQC-waarde minder dan 3% afweek van de doelwaarde (nl. 15.4 ng/mL). Voor de methodevergelijking werd rekening gehouden met de gemiddelde waarde van de 3 resultaten voor elk staal.

V.3.3.2. Metingen met de routinetestsystemen

De deelnemende firma's hebben de stalen ontvangen zonder weet te hebben van hun oorsprong en ze waren willekeurig genummerd. Zoals hoger beschreven, werd er op toegezien dat de resultaten representatief voor de respectievelijke kits werden gereproduceerd. Elk labo volgde hetzelfde meetschema. Bij het begin van de run werden de IQC-stalen in duplicaat gemeten. Wanneer de vooropgestelde criteria van de fabrikant vervuld waren, werd overgegaan tot de meting van de stalen volgens het volgende meetprotocol: staal 1A en B tot staal 8A en B; elk IQC-staal in duplicaat; enz. tot alle stalen geanalyseerd werden. De run werd beëindigd met de duplicaat bepaling van elk IQC-staal. Voor de methodevergelijking werd het gemiddelde van de twee metingen van elk staal gebruikt.

V.3.4. Verwerking van de resultaten

V.3.4.1. Statistische methoden

a) Routinetestsysteem

De imprecisie (uitgedrukt als VC, %) van de routinetestsysteem werd berekend uit de data van de duplicaat analyse van de urinestalen gebruik makend van volgende formule:

$$VC_{Routine} = \frac{\sqrt{\sum d^2 / (2xn)}}{\bar{x}} \times 100$$

waarbij d = het verschil tussen de twee metingen, n = aantal stalen en \bar{x} = gemiddelde C-peptideconcentratie.

b) ID-LC-MS/MS-meetprocedure

Voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure werd de VC berekend zoals weergegeven in IV.2.4.5.

De totale VC van de vergelijking tussen een routinetestsysteem en de ID-LC-MS/MS-meetprocedure werd op volgende manier berekend:

$$VC_{tot} = \sqrt{\left(\frac{VC_{Routine}}{\sqrt{2}}\right)^2 + \left(\frac{VC_{ID-LC-MS/MS}}{\sqrt{3}}\right)^2}$$

Hierbij werd de $VC_{Routine}$ gedeeld door $\sqrt{2}$ aangezien de metingen in duplicaat werden uitgevoerd, en de $VC_{ID-LC-MS/MS}$ door $\sqrt{3}$ gezien de drievoudige bepaling van elk staal.

V.3.4.2. Grafische voorstelling

De methodevergelijking werd grafisch op de volgende manieren voorgesteld:

i) een spreidingsdiagram van de resultaten van elke meetprocedure (voorgesteld in de Y-as) werd uitgezet t.o.v. de resultaten van de ID-LC-MS/MS-meetprocedure in de X-as. Additioneel werd in de grafiek de regressielijn (_), de Y=X-as (....) en het 95% waarschijnlijkheidsinterval, zoals berekend uit VC_{tot} (-.-), weergegeven. Regressieanalyse werd

uitgevoerd gebruik makend van gewogen Deming regressie, zoals berekend werd met het CBStat programma van K. Linnet (www.cbstat.com).

ii) een spreidingsdiagram van de resultaten van alle meetprocedures (voorgesteld in de Y-as) uitgezet t.o.v. de resultaten van de ID-LC-MS/MS-metprocedure in de X-as. Regressie werd uitgevoerd met een tweedegraadsfunctie.

iii) een spreidingsdiagram van de gecalibreerde waarden (berekend uit de tweedegraadsfunctie) van alle meetprocedures (voorgesteld in de Y-as) uitgezet t.o.v. de resultaten van de ID-LC-MS/MS-metprocedure in de X-as. Additioneel werd de gemiddelde concentratie van de gecalibreerde waarden voor elk staal weergegeven.

V.4. Resultaten en discussie

Voor zover wij weten, werd tot nu toe geen enkel testsysteem reeds geëvalueerd voor zijn toepassing op urine.

V.4.1. Urinestalen

De “split-sample” metingen werden uitgevoerd met een serie van 45 urinestalen. Onder ideale omstandigheden zouden de urinestalen best onmiddellijk na donatie geanalyseerd worden. Maar om logistieke redenen kon niet voldaan worden aan deze vereiste en werd verkozen om in de plaats daarvan ingevroren stalen te gebruiken, zodat dezelfde reeks urinestalen bepaald kon worden met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure en met de 5 testsystemen. Aangezien de ID-LC-MS/MS-metingen en de metingen op routinesystemen niet op hetzelfde tijdstip konden worden uitgevoerd en het niet duidelijk is of C-peptide stabiel blijft in sommige urinestalen bij bewaring voor een langere periode (20), werden de urinestalen in bulk bewaard bij -20°C. Bij de start van de methodevergelijking (ongeveer 4 weken na het samenstellen van het panel) werden de stalen ontdooid, in 1 mL porties verdeeld en opnieuw bij -20°C bewaard tot de dag van analyse. De studie werd zo georganiseerd dat alle metingen uitgevoerd werden in 2 weken. Onder deze omstandigheden veronderstellen we dat alle laboratoria ‘identieke’ stalen ontvingen. Publicaties over de stabiliteit van C-peptide onder deze condities zijn tegenstrijdig (10), maar onze ervaring met ID-MS gaf geen indicatie dat de C-peptide afbraak in deze korte periode (2 weken). Niettegenstaande dit kan een mogelijke afbraak van enkele specifieke stalen nooit definitief uitgesloten worden. Uit de resultaten van de methodevergelijking konden we besluiten dat, indien er een lichte afbraak van de stalen plaatsvond, dit onze resultaten niet beïnvloedde.

De gemiddelde C-peptideconcentratie bedroeg 40.5 ng/mL, zoals bepaald met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure, en na bepaling met de respectievelijke routinesystemen was dit 32.6 ng/mL voor Biosource C-PEPsp-RIA, 61.9 ng/mL voor DPC, 71.8 ng/mL voor Eurogenetics, 76.1 ng/mL voor Diasorin en 98.0 ng/mL voor Biosource C-PEP-RIA New test. Uit deze gemiddelde waarden valt onmiddellijk op dat er grote verschillen optraden tussen de verschillende meetsystemen. Dit wordt uitvoerig besproken in V.4.4.

V.4.2. Interne kwaliteitscontrole

Aangezien de metingen op de immunotestsystemen uitgevoerd werden in slechts 1 laboratorium en op 1 dag moest, zoals hoger beschreven, verzekerd worden dat de resultaten representatief waren voor de respectievelijke testsystemen. Zoals hoger beschreven werd hiertoe aan de fabrikanten gevraagd voldoende aandacht te besteden aan de IQC. Alle IQC-stalen hadden een serummatrix en bijgevolg was de C-peptideconcentratie veel lager dan deze die teruggevonden werd in de urinestalen. Maar de verschillende firma's bevestigden ons dat dit geen hinderpaal vormde voor een adequate IQC aangezien alle geëvalueerde testsystemen aangewend kunnen worden voor de bepaling van C-peptide in zowel serum als urine. Daarenboven werden de urinestalen steeds verdund tot ze ongeveer het bereik van de serumconcentraties benaderden.

De controlestalen werden steeds in duplicaat bepaald; bij het begin van de meting, om de 8 stalen en aan het einde van de metingen. Dit herhaaldelijk injecteren van de controlestalen was belangrijk om eventuele driften of andere problemen van het systeem op te merken en tijdig te kunnen ingrijpen. Gedurende de metingen bij de verschillende firma's werd geen enkele keer een drift opgemerkt.

Uit tabel V.2. blijkt dat de afwijking van de doelwaarde steeds $<5\%$ was voor de concentraties >6 ng/mL of <0.3 ng was voor concentraties ≤ 6 ng/mL. Hieruit kunnen we besluiten dat de gemeten waarden voor de stalen in deze studie representatief zijn voor de nauwkeurigheid van de respectievelijke immunotestsystemen.

De IQC voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure werd reeds uitvoerig besproken in hoofdstuk IV.3.2.4. Voor de ID-LC-MS/MS-metingen bedroeg de afwijking t.o.v. de toegewezen doelwaarde van 15.4 ng/mL, in het gemiddeld 2.7%.

Tabel V.2. Overzicht van de afwijking van de IQC-doelwaarden bepaald door de verschillende immuno-testsystemen en de ID-LC-MS/MS-meetprocedure.

Meetprocedure (testsysteem of kit)	Doelwaarde (A) (ng/mL)	Gemeten waarde (B) (ng/mL)	Delta (B-A)*
Diasorin (Liaison)	<i>IQC 1</i> 2.00	1.91	<0.3 ng
	<i>IQC 2</i> 14.70	14.10	5.0%
DPC (Immulite 2000)	<i>IQC 1</i> 0.70	0.77	<0.3 ng
	<i>IQC 2</i> 3.00	2.94	<0.3 ng
	<i>IQC 3</i> 5.30	5.15	<0.3 ng
Eurogenetics (AIA-21)	<i>IQC 1</i> 1.00	1.07	<0.3 ng
	<i>IQC 2</i> 5.80	5.68	<0.3 ng
	<i>IQC 3</i> 18.20	17.44	4.2%
Biosource (C-PEP _{sp} -RIA)	<i>IQC 1</i> 0.72	1.00	<0.3 ng
	<i>IQC 2</i> 3.56	3.69	<0.3 ng
	<i>IQC 3</i> 0.72	0.57	<0.3 ng
	<i>IQC 4</i> 3.02	2.78	<0.3 ng
Biosource (C-PEP-RIA New)	<i>IQC 1</i> 0.88	0.82	<0.3 ng
	<i>IQC 2</i> 3.29	3.29	<0.3 ng
ID-LC-MS/MS	<i>IQC 1</i> 15.41	15.82	2.7%

V.4.3. Imprecisie

De imprecisie, uitgedrukt als VC (%), van de verschillende immunotestsystemen was onafhankelijk van de C-peptideconcentratie. De VC, berekend uit de resultaten van de 45 urinestalen, varieerde van 3.1% (Eurogenetics) tot 7.5% (DPC). Een overzicht van de VCs voor alle firma's wordt weergegeven in tabel V.3. Deze waarden tonen aan dat, alhoewel alle firma's aanraden de metingen in duplicaat uit te voeren, het eigenlijk reeds voldoende zou zijn om voor de meest precieze meetprocedures de metingen in singlicaat uit te voeren. Voor de ID-LC-MS/MS-meetprocedure bedroeg de imprecisie 3.0% en ook deze was onafhankelijk van de C-peptideconcentratie.

Voor de methodevergelijking werd het gemiddelde van de duplicaten van de immuno-testsystemen vergeleken met het gemiddelde van de drievoudige meting met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure. Uit deze berekening bleek dat de imprecisie van de ID-LC-MS/MS-meetprocedure ($VC/\sqrt{3}=1.7\%$) iets kleiner was die van het beste routinetestsysteem nl. Eurogenetics ($VC/\sqrt{2}=2.2\%$). Deze VCs werden ook gebruikt voor de berekening van VC_{tot} .

Tabel V.3. Imprecisiedata van de meetprocedures en VC_{tot} van de methodevergelijkingen.

Meetprocedure	VC (%)	VC_{tot} (%)
ID-LC-MS/MS	3.0	-
Diasorin	4.7	3.7
DPC	7.5	5.6
Eurogenetics	3.1	2.8
Biosource C-PEPsp-RIA	7.0	5.2
Biosource C-PEP-RIA New	4.5	3.6

Uitgaande van de berekende VC_{tot} werd het 95% waarschijnlijkheidsinterval ($= 1.96 \times VC_{tot}$) voor de dataparen rond de regressielijn berekend. Dit wordt voorgesteld in figuur V.3. met een streepuntlijn (-.-). Dit 95%-waarschijnlijkheidsinterval zal in V.4.5. gebruikt worden voor de beoordeling van de specificiteit en robuustheid van de systemen.

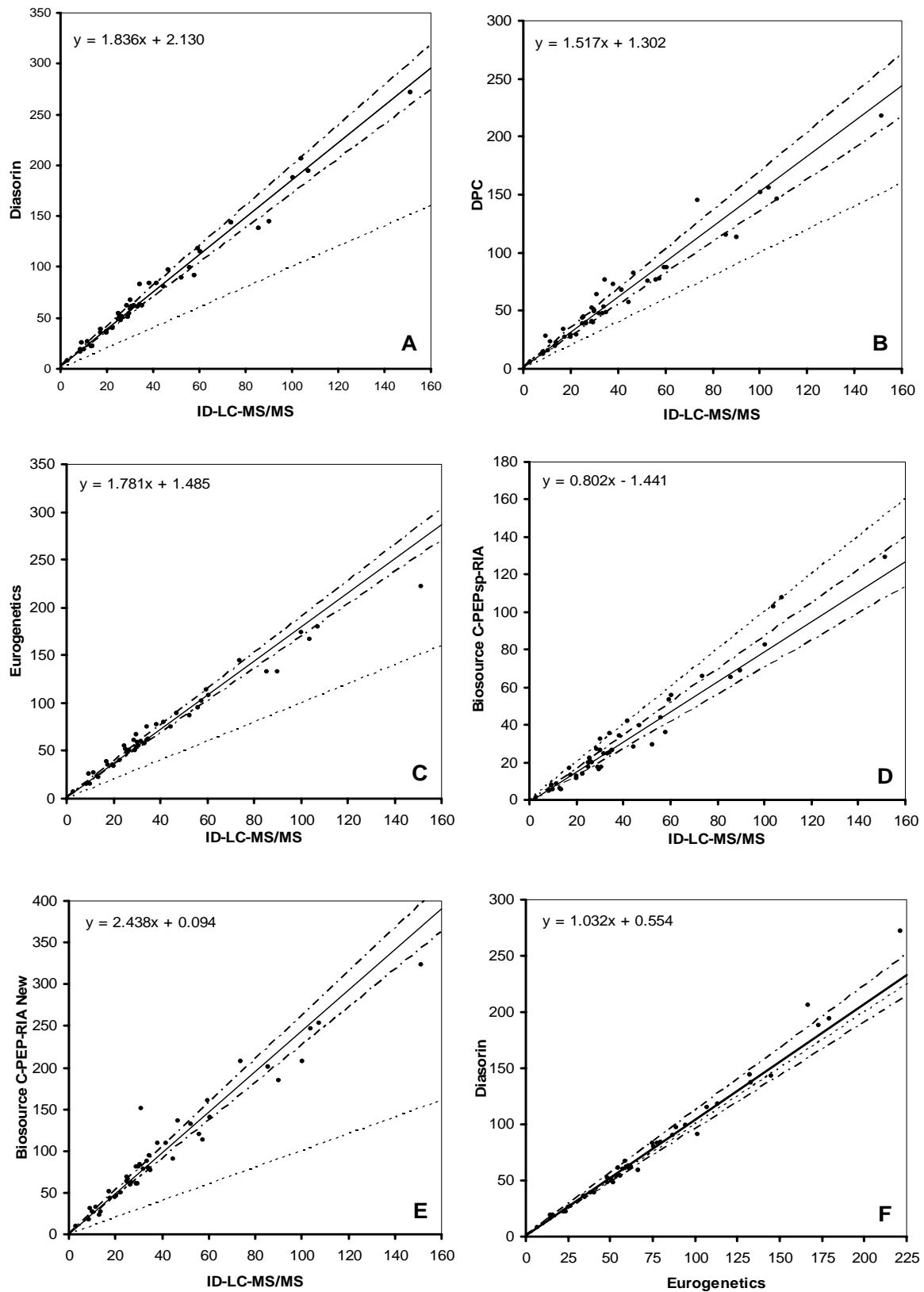
V.4.4. Methodevergelijking – systematische afwijking

De resultaten van de methodevergelijking worden voorgesteld in figuur V.2. en in tabel V.4. Regressie werd uitgevoerd met gewogen Deming regressie. Het gebruik van deze regressieprocedure wordt aanbevolen indien de meetprocedure waarmee vergeleken wordt ook onderhevig is aan fouten. Is dit niet het geval, dan kan ordinare lineaire regressie gebruikt worden. Deming regressie (21, 22) houdt immers rekening met toevallige fouten in beide meetprocedures, en gewogen Deming regressie wordt toegepast wanneer de toevallige fouten van de x- en y-waarden proportioneel zijn met de concentratie. De toegekende gewichten zijn omgekeerd evenredig met voormelde standaarddeviaties. Op die manier wordt de invloed van de observaties in het hogere concentratiebereik verminderd.

De grafische voorstelling van de resultaten van de methodevergelijking wordt weergegeven in figuur V.2.A-E. Additioneel werd ook de vergelijking tussen het immunotest-systeem Eurogenetics en dit van Diasorin voorgesteld (figuur V.2.F). Beide meetprocedures hadden, van alle immunotestsystemen, de kleinste imprecisie. Nota: dit wordt verder in dit hoofdstuk besproken.

Tabel V.4. Gewogen Deming regressie data voor de methodevergelijking van de immunotestsystemen met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure.

Teststelsysteem	Helling \pm 95% CI	Intercept \pm 95% CI
Diasorin	1.836 \pm 0.09	2.130 \pm 1.97
DPC	1.517 \pm 0.08	1.302 \pm 0.82
Eurogenetics	1.781 \pm 0.10	1.485 \pm 2.09
Biosource C-PEPsp-RIA	0.802 \pm 0.14	-1.441 \pm 3.49
Biosource C-PEP-RIA New	2.438 \pm 0.29	0.094 \pm 7.10



Figuur V.2.A-F. Meetresultaten (ng/mL) voor urinair C-peptide zoals verkregen met de 5 onderzochte immunotestsystemen en vergeleken met deze verkregen met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure. (A), Diasorin; (B), DPC; (C) Eurogenetics; (D) Biosource C-PEPsp-RIA; (E) Biosource C-PEP-RIA New. (-): gewogen Deming regressie; (-.-): 95% waarschijnlijkheidsinterval bepaald uit VC_{tot} ; (...): $Y=X$.

Uit de waarden voor het intercept en de helling uit tabel V.4., uit figuur V.2.A-E en uit de verschillen in gemiddelde C-peptideconcentratie valt duidelijk af te leiden dat er grote systematische verschillen optreden tussen de verschillende immunotestsystemen en ID-LC-MS/MS-meetprocedure, maar in het bijzonder ook tussen de immunotestsystemen onderling. De hellingen variëren namelijk van 0.802 (Biosource C-PEPsp-RIA) tot 2.438 (Biosource C-PEP-RIA New).

Aan de ene kant waren deze grote variaties heel opmerkelijk aangezien voor alle immunotestsystemen in de bijsluiter beschreven staat dat de fabrikanten dezelfde primaire kalibrator gebruikten (IRP 84/510) (17) om een waarde toe te kennen aan hun productkalibrator voor de respectievelijke testsystemen. Aan de andere kant waren deze verschillen wel te verwachten, aangezien in het certificatie-rapport van de IRP 84/510 primaire standaard reeds systematische verschillen voor de resultaten van patiëntenstalen beschreven werden. Dit fenomeen wijst op de niet-overdraagbaarheid (“non-commutability”) van de standaarden voor de kalibratie van de onderzochte C-peptidetestsystemen. Dit probleem is algemeen gekend in de immunoteststelsystemstandaardisatie (11). Het toont aan dat het moeilijk is om enkel met een gemeenschappelijke kalibrator immunotestsystemen te standaardiseren, en dat er voor standaardisatie ook nood is aan een methodevergelijking met “split-sample” bepalingen in parallel met een referentiemeetprocedure. Ook het matrixverschil tussen de standaarden en de stalen (serum versus urine) bemoeilijkt in dit geval ook de standaardisatie van de immunotestsystemen.

V.4.5. Methodevergelijking – Recalibratie

Een methodevergelijking kan de mogelijkheid bieden de immunotestsystemen te recalibreren. Dit heeft echter enkel zin wanneer de immunotestsystemen voldoende correlatie vertonen met de referentiemeetprocedure (23).

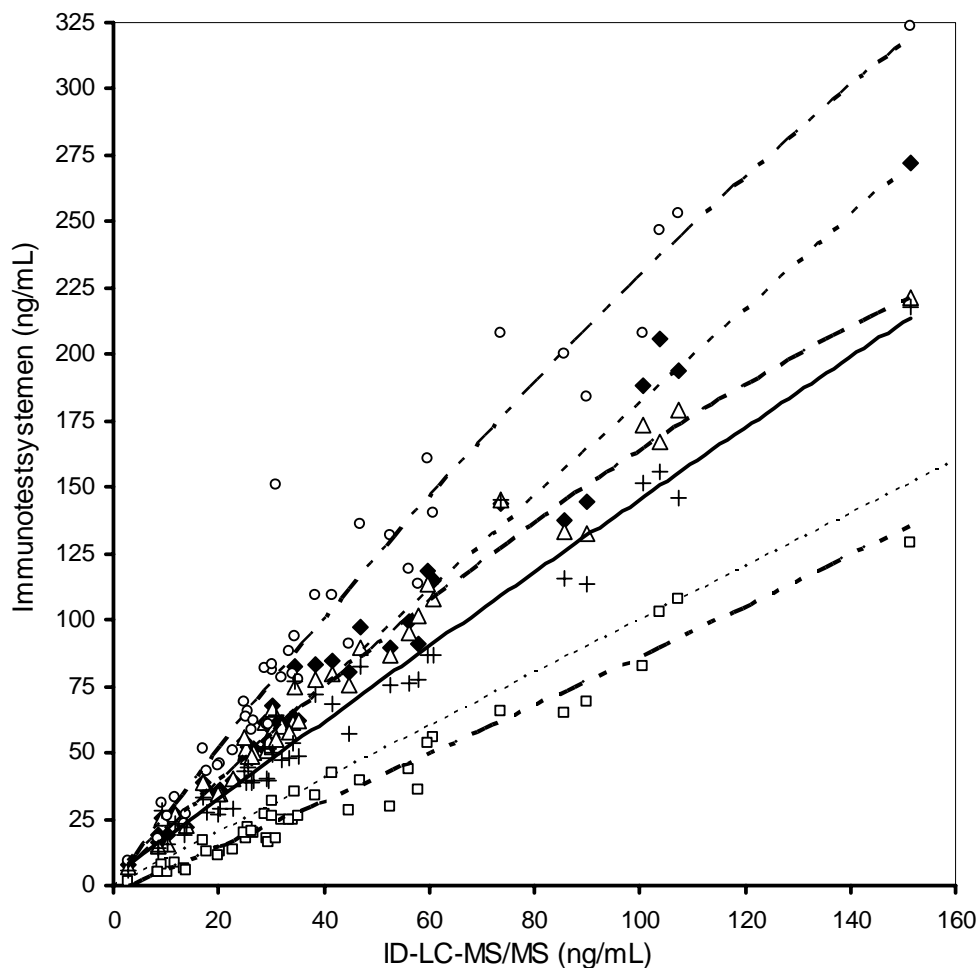
Na visuele inspectie van figuur V.2.A-E merkten we dat sommige meetprocedures (bvb. Eurogenetics en Biosource C-PEP-RIA New) geen lineair verband vertoonden voor hogere analytconcentraties. Om die reden werd voor alle testsystemen de trendlijn herberekend met een tweedegraadsfunctie (figuur V.3. en tabel V.5.).

Tabel V.5. Tweedegraadsregressie data voor de methodevergelijking van de C-peptide-immunotest-systemen met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure.

Teststelsysteem	Tweedegraadsvergelijking	r
Diasorin	$y = -0.0001x^2 + 1.790x + 3.88$	0.9907
DPC	$y = -0.0006x^2 + 1.476x + 3.61$	0.9850 ¹
Eurogenetics	$y = -0.0033x^2 + 1.964x + 0.86$	0.9916
Biosource C-PEPsp-RIA	$y = 0.0005x^2 + 0.843x - 2.74$	0.9796
Biosource C-PEP-RIA New	$y = -0.0035x^2 + 2.648x - 0.11$	0.9860 ²

¹ Staal 4 (74 ng/mL) visueel als uitschieter beschouwd

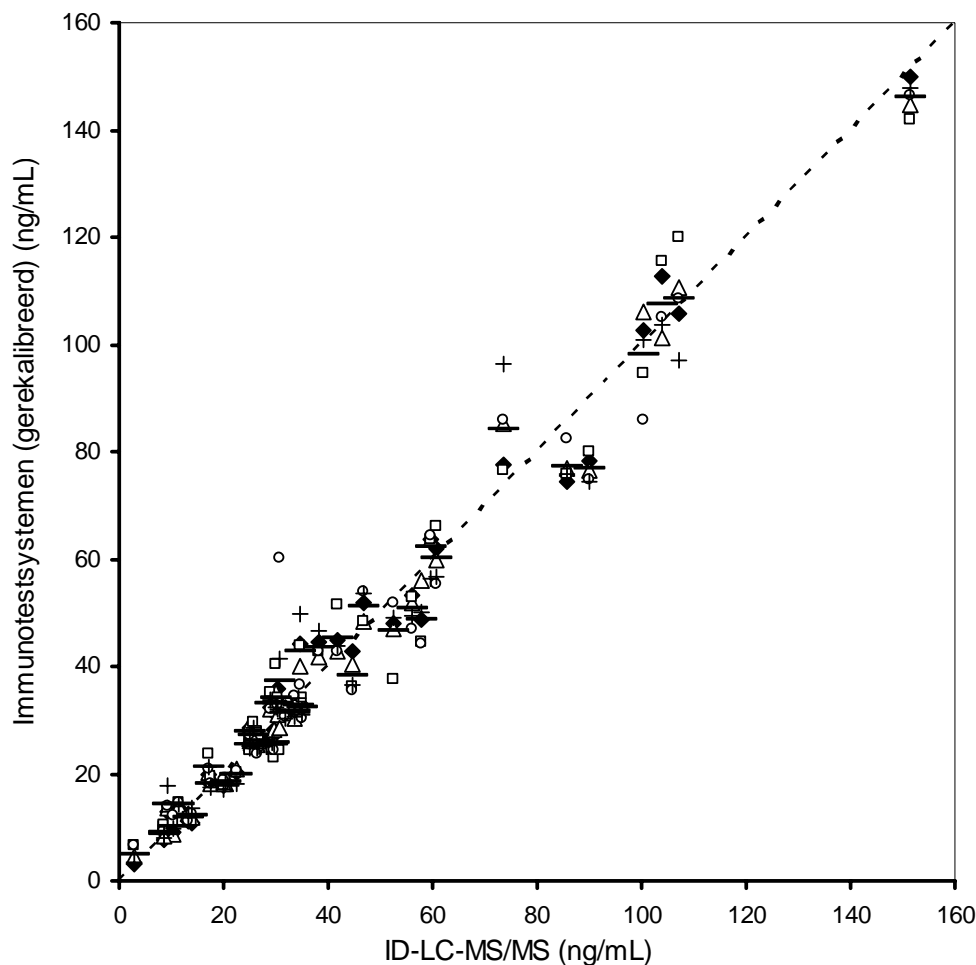
² Staal 45 (31 ng/mL) idem



Figuur V.3. Spreidingsdiagram voor de gemeten urinaire C-peptideconcentraties met de verschillende routinetestsystemen. Regressie werd uitgevoerd met tweedegraadsfunctie.

◆ Diasorin (---); + DPC (___); Δ Eurogenetics (___); Biosource C-PEPsp-RIA (-.-.); ○ Biosource C-PEP-RIA New (- - -).

Zoals afgelezen kan worden uit tabel V.5. vertonen alle geëvalueerde testsystemen een uitstekende correlatie met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure ($0.980 < r < 0.992$). Dit heeft als gevolg dat de methodevergelijking met de kandidaat referentiemeetprocedure een uitstekende basis biedt voor recalibratie van de C-peptidetestsystemen voor de kwantificatie van C-peptide in urine. Deze recalibratie hebben wij, bij wijze van experiment, zelf uitgevoerd. Dit werd bereikt door gebruik te maken van de tweedegraadsvergelijking, zoals vermeld in tabel V.5. In figuur V.4. worden de gecalibreerde concentraties van de urinestalen uitgezet t.o.v. de concentraties gevonden met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure.



Figuur V.4. Voorstelling van de gecalibreerde C-peptideconcentraties zoals bepaald met de immunotestsysteem t.o.v. de ID-LC-MS/MS-concentraties.
◆ Diasorin; + DPC; Δ Eurogenetics; Biosource C-PEPsp-RIA; o Biosource C-PEP-RIANew
— gemiddelde C-peptideconcentratie berekend uit de gecalibreerde waarden van de immunotestsysteem; (...) Y=X lijn.

Uit figuur V.4. blijkt duidelijk dat alle immunotestsystemen met succes kunnen gecalibreerd worden. De meeste stalen liggen nu rond de $Y=X$ lijn. Niettegenstaande dit bleven enkele stalen (rond de concentratie van 80 ng/mL) een uitdaging voor sommige van deze testsystemen. We vermoeden dat dit te wijten is aan niet-specificiteit van de immunotestsystemen (V.4.6.).

Alhoewel figuur V.4. reeds een goed idee heeft over de invloed van recalibratie, kan deze studie kan momenteel nog niet direct aangewend worden voor de recalibratie van de immunotestsystemen omdat, zoals reeds in hoofdstuk IV uitvoerig beschreven, de meetprocedure nog geen deel uitmaakt van een compleet referentiesysteem (bvb. de ID-LC-MS/MS-meetprocedure werd, uit economische redenen, gecalibreerd werd met een commercieel beschikbare C-peptidestandaard met een hoge zuiverheid en niet met de internationaal erkende IRP 84/510 standaard). Ook de problematiek rond de stabiliteit speelt een grote rol (17).

V.4.6. Methodevergelijking – robuustheid/specificiteit

De specificiteit van de immunotestsystemen en de robuustheid voor de staalmatrix kon afgeleid worden uit de vergelijking van de verschillende 95%-waarschijnlijkheidsintervallen met de spreiding van de data rond de regressielijn (figuur V.2.A-E). Rekening houdend met het feit dat sommige vergelijkingen niet lineair zijn, merkten we na visuele inspectie dat de waargenomen spreiding van de data bijna dubbel zo groot was als verwacht werd uit VC_{tot} (bvb. Biosource-C-PEP-RIA New). Dit wees duidelijk op het optreden van staalafhankelijke effecten en/of specificiteitsproblemen. Nota: een deel van de variabiliteit zou afkomstig kunnen zijn van de bewaar- en ontdooiprocedure.

Of de waargenomen spreiding nu veroorzaakt werd door immunotestsystemen of de ID-LC-MS/MS-meetprocedure, kon niet op voorhand aangetoond worden. Het is nl. per definitie verkeerd van ‘omwille van ID-MS’ van meet af aan de ID-LC-MS/MS-meetprocedure als onfeilbaar te beschouwen. Wij konden bovendien niet negeren dat, wanneer we de immunotestsystemen onder elkaar correleerden, het paar Eurogenetics/Diasorin (voorgesteld in figuur V.2.F) een betere correlatiecoëfficiënt vertoonde in vergelijking met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure ($r = 0.995$ versus 0.992). Dit kon eventueel een mogelijke indicatie zijn voor een betere specificiteit van de immunotestsystemen. Alternatief

kon het er op wijzen dat C-peptideachtige moleculen, die helemaal niet gedetecteerd werden met ID-LC-MS/MS-meetprocedure, interfereerden met de verschillende routinesystemen.

Een mogelijke interferentie met proinsuline, die vaak voorkomt bij C-peptidebepalingen in serum, kon hier onmiddellijk uitgesloten worden aangezien proinsuline niet in urine voorkomt (18). Daarentegen is het echter wel beschreven dat, na onvolledige splitsing van de proinsulinemolecule, C-peptide met 2 additionele aminozuren aan de N- en/of C-terminus (Arg-Arg-C-peptide of C-peptide-Lys-Arg, respectievelijk) kan verschijnen in bloed en urine (24). Kippen et al. bepaalde bvb. massaspectrometrisch dat de concentratie van C-peptide-Lys-Arg 4 tot 10% van de C-peptideconcentratie kan bedragen (19).

Massaspectrometrisch kan wel een onderscheid gemaakt worden tussen deze fragmenten op basis van verschillende massa's (m/z 3020 versus m/z 3302 voor C-peptide-Lys-Arg). De immunotestsystemen daarentegen kunnen moeilijker een onderscheid maken tussen C-peptide en deze fragmenten. Dit zou een mogelijke verklaring kunnen bieden voor de spreiding van de resultaten. Helaas, kon de aanwezigheid van deze fragmenten niet getest worden aangezien deze fragmenten niet commercieel beschikbaar zijn. De specificiteit van de immunotestsystemen en de ID-LC-MS/MS-meetprocedure werd daarom op een indirecte manier onderzocht.

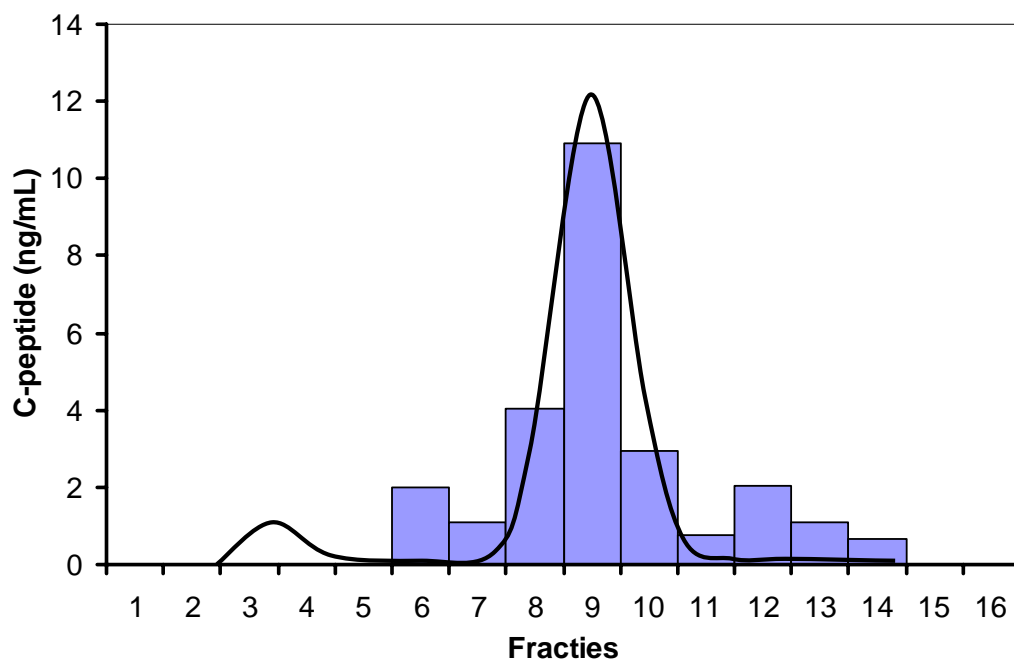
V.4.6.1. Specificiteit van de ID-LC-MS/MS-meetprocedure

Voor wat de ID-LC-MS/MS-meetprocedure betreft, werd de specificiteit uitvoerig onderzocht en beschreven in hoofdstuk IV.3.4.1. Uit deze experimenten kon besloten worden dat de ID-LC-MS/MS-meetprocedure heel specifiek is.

V.4.6.2. Specificiteit van de immunotestsystemen

De Immulite 2000 (DPC) werd als voorbeeld genomen om de specificiteit van de immunotestsystemen na te gaan, aangezien het moeilijk was volgende experimenten bij alle fabrikanten uit te voeren. Er werd op volgende manier te werk gegaan: een urinestaal werd opgezuiverd en geïnjecteerd op het LC-systeem. Gedurende 1.5 min vóór en 1.5 min na elutie van de C-peptidepiek (wat vooraf nauwkeurig bepaald werd aan de hand van C-peptidestandaarden) werden LC-fracties van 40 μ L (12 sec) opgevangen in 300 μ L C-peptidediluens voor de Immulite 2000. In totaal hadden we 16 fracties. In deze fracties werd, dezelfde dag nog, de C-peptideconcentratie bepaald met het Immulite 2000 systeem. De rest van het staal

werd geïnjecteerd op het LC-MS-systeem. De immunoreactiviteit van de Immulite 2000 gevonden in de verschillende fracties werd uitgezet in een balkdiagram of ‘immunogram’. Hierop werd dan het chromatogram, zoals verkregen met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure, gelegd. Dit wordt voorgesteld in figuur V.5. We merkten duidelijk op dat er in verschillende fracties die vóór en na de C-peptidepiek elueerden ook nog bestanddelen aanwezig waren die een immunoreactiviteit vertoonden. Dit wees op de aanwezigheid van ‘cross-reactieve’ bestanddelen in de urine. Deze minder goede specificiteit van de immunotestsystemen zou een mogelijke verklaring kunnen bieden voor het feit dat de sommige onderling beter correleren dan met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure.



Figuur V.5. Immunochromatogram (balkdiagram) van een urinestaal waarop een chromatogram, zoals verkregen met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure (zwarte lijn), werd gelegd.

V.5. Besluit

Eenzijds kunnen wij uit de resultaten van de methodevergelijking besluiten dat er, na het uitvoeren van tweedegraadsregressie, een goede correlatie bestaat tussen de onderzochte immunotestsystemen voor urinair C-peptide en de ID-LC-MS/MS-meetprocedure. Anderzijds wijzen de resultaten van deze studie ook duidelijk op de aanwezigheid van standaardisatieproblemen. Kalibratie met een gemeenschappelijk primaire kalibrator blijkt dus niet voldoende te zijn. Aangezien recalibratie met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure wel succesvol kon uitgevoerd worden, illustreert onze studie dat een methodevergelijking met een echte referentiemeetprocedure een ideale basis is voor standaardisatie van immunotestsystemen (zie inleiding). Verder kan de methodevergelijking de fabrikanten erop wijzen of het immunoteststelsel voldoende specifiek is en/of er nood is aan recalibratie. De voorwaarde om deze meetprocedure officieel te kunnen gebruiken voor de recalibratie van immunotestsystemen, is dat deze ID-LC-MS/MS-meetprocedure erkend wordt als een algemeen aanvaarde referentiemeetprocedure, gekalibreerd met een gecertificeerde internationale C-peptide primaire kalibrator. Bovendien moet ze voldoen aan de vooropgestelde eisen van nauwkeurigheid/juistheid en precisie, en ondersteund zijn door het “Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine” (25).

Opmerking: Deze onderwerpen werden ingediend voor publicatie bij:

- Fierens C, Stöckl D, Baetens D, De Leenheer AP, Thienpont L. Standardization of C-peptide measurements in urine by method comparison with isotope dilution-mass spectrometry. Ingediend voor publicatie bij *Ann. Clin. Biochem.*

- Fierens C, Stöckl D, Baetens D, De Leenheer AP, Thienpont L. Application of an urinary C-peptide electrospray ionization-isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the evaluation of five C-peptide immunoassays for urine. Ingediend voor publicatie bij *J. Chromatogr. B.*

REFERENTIES

- (1) Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities 1998 (Dec.7):L 331/1-L 331/37.
- (2) De Brabandere VI, Thienpont LM, Stöckl D, De Leenheer AP. Three routine methods for serum cortisol evaluated by comparison with an isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method. *Clin. Chem.* 1995;41:1781-3.
- (3) Thienpont LM, De Leenheer AP. Efforts by industry toward standardization of serum estradiol-17 β measurements. *Clin. Chem.* 1998;44:671-4.
- (4) Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, Reinauer H, De Leenheer AP. Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: a five years' experience of two European reference laboratories. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996;34:853-60.
- (5) Thienpont LM, Van Landuyt KG, Stöckl D, De Leenheer AP. Candidate reference method for determining serum creatinine by isocratic HPLC: validation with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry and application for accuracy assessment of routine test kits. *Clin. Chem.* 1995;41:995-1003.
- (6) Thienpont LM, Van Landuyt KG, Stöckl D, De Leenheer AP. Four frequently used test systems for serum cholesterol evaluated by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry candidate reference method. *Clin. Chem.* 1996;42:531-5.
- (7) Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, De Leenheer AP. Candidate reference method for determining serum theophylline applied to target-setting in external quality assessment and routine method evaluation. *Clin. Chem.* 1994;40:1503-11.

- (8) Lasky FD. Achieving accuracy for routine clinical chemistry methods by using patient specimen correlations to assign calibrator values: a means of managing matrix effects. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993;117:412-9.
- (9) Ashby P, Frier BM. Circulating C-peptide: measurement and clinical application. *Ann. Clin. Biochem.* 1981;18:125-30.
- (10) Clark PM. Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. *Ann. Clin. Biochem.* 1999;36:541-64.
- (11) Stöckl D, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricos C, Thienpont LM. Current stage of standardization of measurements of specific polypeptides and proteins discussed in light of steps needed towards a comprehensive measurement system. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1997;35:719-32
- (12) Stöckl D, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricós C, Siekmann L, Thienpont LM. Analytical specifications of reference methods. Compilation and critical discussion (From the members of the European EQA-organizers Working Group B) [review]. *Eur J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996;34:319-37.
- (13) Frank BH, Veros AJ. Physical studies on proinsulin – association, behaviour and conformation in solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968;32:155-60.
- (14) Markussen J. Structural changes involved in the folding of proinsul. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1971;2:210-7.
- (15) Kjems L, Bates D. The measurement of insulin, C-peptide and proinsulin in diabetes mellitus, DAKO, Glostrup, 1997.
- (16) Kuzuya H, Blix PM, Horwitz DL, Rubenstein AH, Steiner DF, Binder C, Faber OK. Heterogeneity of circulating human C-peptide. *Diabetes* 1978;27:184-91.
- (17) Bristow AF, Das REG. WHO international reference reagents for human proinsulin and human insulin C-peptide. *J. Biol. Stand.* 1988;16:179-86.

- (18) Sapin R. Aspects analytiques des dosages d'insuline, peptide-C, proinsulines et glucagon. *Med. Nucl.* 2001;25 :73-9.
- (19) Kippen DA, Cerini F, Vadas L, Stöcklin R, Vu L, Offord RE, Rose K. Development of an isotope dilution assay for precise determination of Insulin, C-peptide, and Proinsulin level in non-diabetic and Type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J Biol Chem* 1997;272:12513-22.
- (20) Kuzuya T, Matsuda A, Saito T, Yoshida S. Human C-peptide immunoreactivity (CPR) in blood and urine – evaluation of a radioimmunoassay method and its clinical applications. *Diabetologia* 1976;12:511-8.
- (21) Linnet K. Estimation of the linear relationship between the measurements of two methods with proportional errors. *Stat. Med.* 1990;1463-73.
- (22) Linnet K. Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. *Clin. Chem.* 1993;39:424-32.
- (23) Thienpont LM. Standardization of steroid immunoassays – In theory an easy task. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998;36:349-52.
- (24) Horwitz DL, Rubenstein AH, Katz AI. Quantitation of human pancreatic beta-cell function by immunoassay of C-peptide in urine. *Diabetes* 1977;26:30-5.
- (25) Thienpont LM, Van Uytfanghe K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 2002;323:73-87.

SAMENVATTING

In de klinische chemie bestaat reeds geruime tijd een algemeen aanvaard coherent meetstelsel met als doel de nauwkeurigheid/juistheid van resultaten, geproduceerd met routinemeetprocedures, te garanderen. Het meetstelsel bestaat uit een hiërarchie van analytische meetprocedures en materialen. Het start bij de SI-eenheid, verwezenlijkt via de primaire kalibrator. Vervolgens omvat de hiërarchie een aantal niveaus waarin meetprocedures naargelang hun juistheid gerangschikt zijn, telkens geassocieerd met een kalibratiemateriaal. Het stelsel wordt vanuit de top naar de bodem toegepast, zodat telkens het materiaal/de meetprocedure van een hogerliggend niveau gebruikt wordt ter kalibratie van/om een waarde toe te kennen aan de meetprocedure/het materiaal in het onderliggend niveau. Algemeen kan dus gesteld worden dat, via toepassing van het coherent meetstelsel, de juistheidsbasis, gelegd door de primaire kalibrator, als verwezenlijking van de SI-eenheid en de primaire referentiemeetprocedure, naar de routinemeetprocedure op die manier getransfereerd wordt.

De nauwkeurigheid/juistheid, haalbaar met een analytische meetprocedure, hangt in eerste instantie van het theoretisch meetprincipe af. Zo wordt algemeen aanvaard dat voor de bepaling van thyroïdhormonen een secundaire referentiemeetprocedure op isotoopdilutie-gaschromatografie/massaspectrometrie (ID-GC-MS) of isotoopdilutie-vloeistofchromatografie/massaspectrometrie (ID-LC-MS) gebaseerd moet zijn. Voor de analytische klasse van peptiden en proteïnen daarentegen, die chromatografisch enkel via LC toegankelijk zijn, is dit ID-LC-MS.

Het objectief van deze thesis was de mogelijkheden van ID-LC-MS voor de ontwikkeling van secundaire referentiemeetprocedures te exploreren. Er werd beslist hierbij gradueel te werk te gaan, waarmee bedoeld wordt dat wij in eerste instantie opteerden voor een serumanalyt, met name T3, waarvoor het principieel ook mogelijk was een ID-GC-MS-meetprocedure te ontwikkelen. Onze overweging hierbij was dat door inderdaad in parallel beide technieken te gebruiken, wij over een goede vergelijkingsbasis zouden beschikken om het potentieel van ID-LC-MS met het in ons laboratorium zeer goed gekende ID-GC-MS te beoordelen. Naast het halen van voornoemde doelstelling betekende de ontwikkeling van een secundaire referentiemeetprocedure voor serum T3 per se een analytische uitdaging voor het laboratorium. Tot op heden werd nog geen secundaire referentiemeetprocedure ontwikkeld, vermoedelijk omwille van de lage serumconcentraties. Bovendien zou er bijzondere aandacht

Samenvatting

moeten besteed worden aan deiodatie door chemische degradatie. In dit verband waren wij bij de ontwikkeling van onze meetprocedures inderdaad succesvol door het nemen van adequate voorzorgen bij de staalopzuivering (afschermen van licht en HPLC-scheiding van T3 en T4) en het inbouwen van een controlemechanisme op basis van $^{13}\text{C}_6\text{-T4}$, wat ons toeliet een eventuele conversie naar $^{13}\text{C}_6\text{-T3}$ massaspectrometrisch te detecteren. Verder hadden de ontwikkelde meetprocedures voldoende gevoeligheid voor kwantitatieve bepaling van klinische T3-concentraties in serum. Andere analytische karakteristieken waren voldoende selectiviteit, interferentievrije chromatogrammen en een goede terugvinding. Verder konden wij uit de validatie tegen de vereisten voor kandidaat referentiemeetprocedures, gesteld door een Europese werkgroep, besluiten dat onze meetprocedures aan de imprecisie en bias criteria van respectievelijk maximaal 2.0% en 0.9% voldeden. We kwamen ook tot de vaststelling dat de ID-GC-MS- en ID-LC-MS/MS-meetprocedures voor de bepaling van serum T3 gelijkwaardig zijn in analytische kwaliteit. Het voordeel van de ID-LC-MS- t.o.v. de ID-GC-MS-meetprocedure is wel dat er geen risicovolle derivatisatiestap nodig is. Beide kunnen dus voorgesteld worden als kandidaat referentiemeetprocedure. Om echter als volwaardige referentiemeetprocedures aanvaard te kunnen worden, is er nood aan een internationaal aanvaarde primaire kalibrator, gecertificeerde referentiematerialen en zullen de procedures aan een interlaboratoria vergelijkende studie moeten onderworpen worden. Zo'n referentiemeetsysteem wordt nu tot stand gebracht in het kader van een Europees project.

In een tweede instantie was het de bedoeling in deze thesis over te gaan naar de klasse van analyten die in nog lagere concentraties in serum voorkomen, zoals de vrije fractie van T4 in serum. In dit verband werd een haalbaarheidsonderzoek uitgevoerd. Wij maakten gebruik van de ultrafiltratietechniek om de minimale hoeveelheid vrij hormoon (0.02%) van de overheersende hoeveelheid proteïnegebonden hormoon te scheiden. De adsorptie van T4 aan de filters en de mogelijke proteïnelekkage werden geëvalueerd. Uit deze experimenten konden we besluiten dat ultrafilters met een membraan bestaande uit geregenereerde cellulose (10K) het meest geschikt zijn voor de scheiding vrij/gebonden hormoon. De meest kritische stap in de verdere ontwikkeling van een referentiemeetprocedure zal het op punt stellen zijn van een gecontroleerde ultrafiltratieprocedure zodat het vrije van het gebonden T4 gescheiden kan worden zonder verstoring van het *in-vivo* evenwicht. Vervolgens werd voor de opzuivering van het ultrafiltraat overgegaan naar vaste faseextractie. Deze opzuiveringsprocedure was eenvoudig, liet toe meerdere stalen tegelijkertijd op te zuiveren en vereiste minder stappen dan vloeistof-vloeistofextractie, hetgeen resulteerde in een hogere terugvinding van de analyt. Tot slot werd, zowel voor de ID-GC-MS- als de ID-LC-MS-

Samenvatting

meetprocedure, de gevoeligheid aanzienlijk verbeterd zodat de detectie van deze lage concentraties met voldoende gevoeligheid haalbaar was.

In hoofdstuk III werd overgegaan naar de klasse van peptiden en proteïnen die enkel via LC-MS analyseerbaar zijn. Aangezien dit tot nu toe een onbekend terrein voor ons was, werd eerst dieper ingegaan op het massaspectrometrisch gedrag van deze klasse van analyten. Om de massaspectrometrische kenmerken na te gaan, maakten wij gebruik van insuline als modelproteïne. Aangezien electrospray ionisatie een ‘zachte’ ionisatietechniek is, verkregen we in het massaspectrum steeds veelvuldig geladen ionen, in een typische envelopverdeling. Deze ladingsverdeling kon op verscheidene manieren gemoduleerd worden naar de hogere massa's wat een grotere selectiviteit biedt. Hiervoor kon de conespanning en/of de samenstelling van de spray (bvb. “wrong-way-round” ionisatie) veranderd worden. Een tweede manier om de selectiviteit te verhogen was gebruik maken van collisioneel geactiveerde dissociatie met hoge of lage collisioneel-energie.

Modulatie naar ionen in het hogere massabereik vereiste soms het gebruik van sterk basische oplossingen. Aangezien conventionele silica gebaseerde RP-kolommen niet bestand zijn tegen hoge pH-waarden ($\text{pH} > 8$), werd op zoek gegaan naar andere methoden om de basen (of zuren) post-kolom toe te voegen. Dit bracht ons op het idee een “bubble trap” in de “nebulizing” gasleiding te plaatsen. Hiermee werden telkens goede resultaten verkregen.

Vervolgens werd aandacht besteed aan de staalopzuiveringstechniek voor een LC-MS-analyse. Uit ons onderzoek is gebleken dat ultrafiltratie uitermate geschikt is, niet alleen vanuit het oogpunt van aanconcentrerend, maar ook van isolatie. Deze 2 effecten worden via ultrafiltratie inderdaad in 1 stap bereikt. Indien het gewenst is de analyt in het retentaat te isoleren, wordt aangeraden een ultrafilter met een cut-off waarde van de helft of een derde van het moleculair gewicht van de te bepalen substantie te gebruiken. Een nadeel is dat dit type filters soms extreem lange filtratietijden vereisen. Wij stelden echter vast dat door de toevoeging van 1% BSA aan de oplossing, filters met een grotere cut-off waarde te gebruiken zijn met een aanzienlijk verminderde filtratietijd.

In onze experimenten werden wij geconfronteerd met het fenomeen suppressie van de ionisatie en matrixeffecten. Dit veroorzaakte vaak problemen van sterk verminderde gevoeligheid of het verschijnen van ‘onzuiverheden’ in het chromatogram. We konden echter, via het verdunnen van het staal, deze problemen grotendeels oplossen. Al deze waarnemingen benadrukten echter het nut van het gebruik van een isotopisch gemerkte interne standaard.

Na deze voorexperimenten konden wij dan overgaan naar ons ultieme doel: de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor urinair C-peptide. Ultrafiltratie werd

Samenvatting

gebruikt om C-peptide uit de urinematrix te isoleren. Chromatografie werd uitgevoerd met gradiëntelutie op een korte polymeer RP-kolom. De massaspectrometrische detectie gebeurde onder negatieve ionisatie (wESI-) in de “multiple reaction monitoring” modus waarbij de volgende ionentransities werden gevolgd: m/z 1509>1500 en m/z 1517>1508. Evaluatie van de ontwikkelde meetprocedure liet ons toe te besluiten dat zij een goede precisie (<3%), nauwkeurigheid en robuustheid bezit. De chromatogrammen waren steeds interferentievrij. Bijgevolg kan ze voorgesteld worden als basis voor een referentiemeetprocedure.

In hoofdstuk V werd het belang van een referentiemeetprocedure geïllustreerd via een toepassing van het herleidbaarheidsmodel. De ontwikkelde meetprocedure werd nl. aangewend voor de evaluatie van de specificiteit en recalibratie van 5 routinemeetsystemen voor C-peptide in urine. Dit gebeurde door parallelle analyse van 45 urinestalen met de routinemeetprocedures en de referentiemeetprocedure. De methodevergelijking werd ter interpretatie aan regressie-analyse onderworpen en grafisch voorgesteld. Grote verschillen werden opgemerkt tussen de 5 routinesystemen en de ID-LC-MS/MS-meetprocedure, maar ook tussen de routinesystemen onderling. Dit laatste was heel opmerkelijk, aangezien alle fabrikanten dezelfde primaire standaard IRP 84/510 gebruikten om een waarde toe te kennen aan hun fabrikantenkalibrator. Dit wees er op dat gebruik van een gemeenschappelijke kalibrator niet voldoende is om routinemeetprocedures SI-herleidbaar te maken. Aangezien alle routinesystemen een goede tweedegraadscorrelatie ($r > 0.980$) vertoonden met de ID-LC-MS/MS-meetprocedure, wat een bewijs was van voldoende specificiteit, kon de ID-LC-MS/MS-meetprocedure aangewend worden om de routinesystemen te recalibreren. Dit gebeurde met succes en bewees dat de ID-LC-MS/MS-meetprocedure praktisch kan aangewend worden voor de recalibratie van routinesystemen. Toch moet er hier ook, zoals eerder reeds vermeld voor T3, opgewezen worden dat, aangezien er momenteel nog geen internationaal aanvaarde referentiestandaarden beschikbaar zijn, noch de mogelijkheid bestaat om deze meetprocedures te evalueren in een methodevergelijkingsstudie, onze meetprocedure nog niet officieel aanvaard kan worden als secundaire referentiemeetprocedure. Niettegenstaande dit denken wij toch dat onze meetprocedure een goede basis kan vormen voor de definitieve ontwikkeling van een referentiemeetsysteem om de nauwkeurigheid/juistheid te waarborgen van peptidenmeetprocedures.

SUMMARY

In clinical chemistry exists since long a widely accepted coherent measurement system to guarantee the accuracy/trueness of results produced by routine measurement procedures. The measurement system consists of a hierarchy of analytical measurement procedures and their materials. It starts with the SI-unit, realized by a primary calibrator. Further, the hierarchy consists of certain levels in which measurement procedures are ranged according their trueness, each accompanied with its calibration material.

The system is applied from top to bottom, so that every time the material/measurement procedure of a superior level is being applied to calibrate/assign a value to the measurement procedure/material of a lower level. Generally, it can be said that, with application of the coherent measurement system, the trueness, funded by the primary calibrator, as a realization of the SI-unit and the primary reference measurement procedure, is transferred to the routine measurement procedure.

First, the accuracy/trueness achievable with an analytical measurement procedure depends on the theoretical measurement principle. Therefore, it is widely accepted that for determination of thyroid hormones a secondary reference measurement procedure should be based on isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry (ID-GC-MS) or isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry (ID-LC-MS). On the other hand, for the class of analytes of peptides and proteins, for which chromatography is only accessible with LC, it is based on ID-LC-MS.

The objective of this thesis was to explore the possibilities of ID-LC-MS for the development of secondary reference measurement procedures. We decided to work gradually, which means that we opted, in the first instance, for a serum analyte, i.e., T3, for which it was also principally possible to develop an ID-GC-MS measurement procedure. Our consideration for this was that, by use of both techniques in parallel, we should have a good basis for comparison to evaluate the potential of ID-LC-MS with the well-known ID-GC-MS in our laboratory. Besides achieving this, the development of a secondary reference measurement procedure for serum T3 meant per se an analytical challenge for the laboratory. Until now, no secondary reference measurement procedures have been developed, presumably because of the low serum concentrations. Besides, special attention must be paid to deiodation due to chemical degradation. In this connection, we were successful with the development of our measurement procedures by taking adequate precautions for sample purification (masking

Summary

light and HPLC separation of T3 and T4). Moreover, a control mechanism based on $^{13}\text{C}_6$ -T4 was built in, which permitted a mass spectrometric detection of a possible conversion to $^{13}\text{C}_6$ -T3. Further, the developed measurement procedures had sufficient sensitivity for quantification of the clinical concentration of T3 in serum. Other analytical characteristics were sufficient selectivity, interference-free chromatograms, and a good recovery. Moreover, we were able to conclude, from the validation against the requirements for a candidate reference measurement procedure, predefined by a European working group, that our measurement procedures fulfilled the criteria of imprecision and bias, respectively with a maximum of 2.0% and 0.9%. We could also conclude that the ID-GC-MS and ID-LC-MS measurement procedures for the determination of serum T3 are equal in analytical quality. The advantage of the ID-LC-MS measurement procedure versus the ID-GC-MS measurement procedure is the absence of a derivatisation full of risks. Last not least, both measurement procedures can be presented as a candidate reference measurement procedure. However, to be recognized as a reference measurement procedure, there is a need for an internationally accepted primary standard, certified reference material and both procedures have to participate in a round-robin trial. Such a reference measurement system is now being established through a European project.

In the second instance, it was our intention in this thesis to start with the class of analytes, whose concentration is much lower in serum, e.g. the free fraction of T4 in serum. With this in mind, we performed a feasibility study. We made use of the ultrafiltration technique for the separation of the minimum quantity of free hormone (0.02%) of the predominant quantity of protein bound hormone. The adsorption of T4 at the filters and the possible protein leakage were evaluated. From these experiments, we could conclude that ultrafiltration devices with a membrane of regenerated cellulose (10K) are most suited for the separation free/bound hormone. The most critical step in the further development will be the optimization of a controlled ultrafiltration procedure so that the free T4 fraction can be separated from the bound fraction without disturbing the *in-vivo* equilibrium.

We used solid phase extraction for purification of the ultrafiltrate. This purification procedure was simple, allowed purification of several samples at the same time and required fewer steps than liquid-liquid extraction, what resulted in a higher recovery of the analyte. Finally, for the ID-GC-MS, as well as for the ID-LC-MS measurement procedure, the sensitivity was considerably improved so that detection of low concentration was feasible with enough sensitivity.

Summary

In Chapter III, the class of peptides and proteins, which can only be analyzed with LC-MS, was studied. Seeing that this was still an unknown area for us, we decided first to investigate more deeply the mass spectrometric behaviour of this class of analytes. For the study of the mass spectrometric characteristics, we used insulin as a model protein. As electrospray ionization is a 'soft' ionization technique, we obtained a typical envelope distribution of multiply charged ions in the mass spectrum. This charge distribution could be modulated to the higher mass range in different ways, resulting in a higher selectivity. Therefore, we could modulate the cone voltage and/or the composition of the spray (e.g. wrong-way-round ionization). A second way to improve selectivity was to make use of collision activated dissociation with low or high collision energy.

The modulation of ions to the high mass range required sometimes the use of strong basic solutions. Being aware that conventional silica-based RP-columns cannot allow those high pH-values (pH>8), we searched for other methods to add the basic or acid solutions post-column. This introduced the idea of placing a 'bubble trap' in the nebulizing gas line. With this, good results were obtained.

In further experiments, attention was paid to the sample purification preceding LC-MS analysis. From our research, it seemed that ultrafiltration is appropriate, not only from the point of view of concentration but also of isolation. These 2 effects were, indeed, with ultrafiltration, achieved in 1 step. If it is the intention to isolate the analyte in the retentate, the use of filters, with a cut-off value of a half or a third of the molecular weight of the substance to be determined is recommended. A disadvantage of these types of filters are the long filtration times which were required. However, we have noticed, by the addition of 1% BSA to the solution that filters with a greater cut-off value became useful with a considerable shorter filtration time.

In our experiments, we were confronted with the phenomenon of suppression of the ionization and matrix effects. This often caused problems of strongly reduced sensitivity or the appearance of 'impurities' in the chromatogram. However, we were able, by dilution of the samples, largely to resolve these problems. All these observations emphasized the advantage of using an isotopically labelled internal standard.

From these pre-experiments, we could start with our final objective: the development of a reference measurement procedure for the quantification of urinary C-peptide. Ultrafiltration was used for the isolation of C-peptide from the urine matrix. Chromatography was performed with gradient elution on a short polymer RP-column. For mass spectrometric detection in the negative ionization mode (wESI-) multiple reaction monitoring of the ion

Summary

transitions m/z 1509>1500 and m/z 1517>1508 was done. From the evaluation of the developed measurement procedure we could conclude that the procedure had good precision, accuracy and robustness. The chromatograms were always interference-free. Consequently, the developed measurement procedure can be proposed as a basis for a reference measurement procedure.

In Chapter V, the key function of a reference measurement procedure in the traceability model was demonstrated. Indeed, the developed measurement procedure was applied for the evaluation of the specificity and recalibration of 5 routine measurement systems. The evaluation was done through the measurement of 45 urine samples, with routine measurement procedures in parallel with the reference measurement procedure. For the interpretation of the method comparison, regression analysis was used. The comparability of the results was additionally illustrated with the respective graphical presentations. Striking differences were noticed between the 5 routine systems and the ID-LC-MS/MS measurement procedure and more important between the routine systems themselves. The latter was remarkable, knowing that all manufacturers used the same primary calibrator IRP 84/510 to assign a value to their manufacturer's product calibrator. This indicated that the use of a common calibrator is not enough to make the routine measurement procedures SI traceable. The fact that all routine systems had a good second order correlation ($r > 0.980$) with the ID-LC-MS/MS measurement procedure, which was proof of sufficient specificity, the ID-LC-MS/MS measurement procedure could be used for recalibration of the routine systems. This was performed successfully and proved that the ID-LC-MS measurement procedure can be applied practically for recalibration of the routine systems. However, as mentioned before for T3, it must here also be noticed that, in view of the fact that there are currently no internationally accepted reference materials available nor possibilities to evaluate the procedure in round-robin trials, our procedure can not yet be officially accepted as a secondary reference measurement procedure. Nevertheless, we are meaning that it can serve as a basis for the definitive development of a secondary reference measurement system to guarantee the accuracy/trueness of peptide measurement procedures.

RESUME

En biologie clinique, il existe depuis longtemps un système cohérent de dosage généralement admis pour garantir l'exactitude et la justesse des résultats obtenus par les différentes procédures d'analyse de routine. Ce système se compose d'une hiérarchie de procédures de mesure analytiques et de leurs matériaux. Il commence avec l'unité SI, réalisée par un standard primaire. La hiérarchie comprend ensuite certains niveaux dans lesquels les procédures de mesure sont classées selon leur exactitude et chacune d'elles est associée à son matériel de calibration.

Le système s'applique du haut vers le bas, de telle sorte que le matériel/la procédure de mesure d'un niveau supérieur est utilisé(e) pour calibrer/adjuger une valeur à la procédure de mesure/le matériel inférieur(e). D'une façon générale, on peut dire que, par l'application du système cohérent de dosage, l'exactitude, apportée par le standard primaire, basée sur la réalisation des unités SI et de la procédure de mesure primaire, est transférée à la procédure de mesure de routine.

L'exactitude, réalisable avec une procédure de mesure analytique, dépend, en premier lieu, du principe de mesure théorique. Il est généralement accepté que, dans le cas des hormones thyroïdiennes, les procédures de mesure de référence secondaire soient basées sur la dilution isotopique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (ID-GC-MS) ou sur la dilution isotopique couplée à la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse (ID-LC-MS). Par contre, la classe d'analytes de type peptide et protéine, uniquement accessible par la chromatographie en phase liquide, c'est l'ID-LC-MS.

L'objectif de cette thèse était d'explorer les possibilités d'ID-LC-MS pour le développement d'une procédure de mesure de référence secondaire. Nous avons décidé de travailler graduellement, ce qui signifie que nous avons opté, dans un premier temps, pour une analyse de T3 sérique. Pour cette mesure, il était également possible de développer une procédure de mesure basée sur l'ID-GC-MS. Ici, notre considération était qu'en utilisant les deux techniques en parallèle, nous pourrions obtenir une bonne base de comparaison pour évaluer le potentiel de l'ID-LC-MS vis-à-vis de l'ID-GC-MS, bien maîtrisée par notre laboratoire. Non seulement l'atteinte de cet objectif, mais aussi le développement d'une procédure de mesure de référence secondaire pour la T3 sérique représentaient un défi analytique majeur pour le laboratoire.

Résumé

A ce jour, aucune procédure de mesure de référence secondaire n'avait été développée, probablement en raison des très faibles concentrations sériques en T3. En outre, une attention spéciale doit être prêtée à la désiodation de T4 attribuée à une dégradation chimique.

A cet égard, nous avons connu le succès avec le développement des procédures de mesure, en prenant des précautions adéquates lors la purification des échantillons (lumière cachée et séparation par HPLC de T3 et T4) et en incorporant un mécanisme de contrôle particulier à base de $^{13}\text{C}_6\text{-T4}$, nous permettant de détecter une conversion éventuelle en $^{13}\text{C}_6\text{-T3}$ par spectrométrie de masse. En plus, les procédures de mesure développées disposaient d'une sensibilité suffisante pour la détermination quantitative des concentrations cliniques de T3 sérique. D'autres caractéristiques analytiques étaient, par exemple: une sélectivité suffisante, des chromatogrammes sans interférences et un bon recouvrement. Pour le reste nous pourrions conclure, dans le cadre de la validation des procédures candidates de mesure de référence répondant aux exigences supposées par un groupe de travail européen, que nos procédures de mesure rencontraient les critères d'imprécision et de 'bias' de 2.0% et de 0.9% au maximum. En outre, nous avons pu constater que les procédures de mesure basées sur l'ID-GC-MS et sur l'ID-LC-MS/MS pour la caractérisation de T3 sérique, étaient comparables. L'avantage de la procédure de mesure basée sur l'ID-LC-MS par rapport à la procédure de mesure basée sur l'ID-GC-MS, est l'absence d'une dérivation induisant de nombreux risques. Les deux procédures peuvent être proposées comme procédures de mesure de référence candidates. Avant de pouvoir être acceptées comme procédures de mesure de référence complètes, un standard primaire, approuvé au niveau international et des matériaux de référence certifiés seront réclamés et les procédures seront soumises à une étude de comparaison entre différents laboratoires. Momentanément, on est en train d'ériger un tel système de mesure de référence dans le cadre d'un projet Européen.

Dans un deuxième temps, l'intention de cette thèse était de procéder à la détermination de la classe d'analytes présents dans le sérum en concentrations plus basses, comme la fraction libre de T4. Dans cette perspective, nous avons élaboré une étude de faisabilité. Nous avons utilisé la technique d'ultrafiltration pour séparer la quantité minimale de l'hormone libre (0.02%) de la quantité majeure de l'hormone liée aux protéines. L'adsorption de T4 aux filtres et la possibilité de l'infiltration de protéines ont été évaluées. A partir de ces expérimentations, nous pouvions conclure que les ultrafiltres avec une membrane composée de cellulose régénérée (10K) sont les plus appropriés à la séparation de l'hormone libre/liée. L'étape la plus critique dans le développement futur de la procédure de mesure de référence,

Résumé

sera l'optimisation et le contrôle de la procédure d'ultrafiltration, pour que la T4 libre/liée puisse être séparée sans modification de l'équilibre *in vivo*. Ensuite, la purification du filtrat est réalisée par extraction sur phase solide. Cette purification était simple, permettait de purifier plusieurs échantillons en même temps et exigeait moins d'étapes qu'une extraction liquide, ce qui aboutait à un recouvrement plus haut pour l'analyte. Finalement, pour la procédure de mesure basée sur l'ID-GC-MS, tout comme la procédure de mesure basée sur l'ID-LC-MS, la sensibilité a été améliorée de sorte que la détection des concentrations basses était réalisable avec une sensibilité suffisante.

Dans le chapitre III, nous avons étudié la classe des peptides et protéines qui peut uniquement être analysée avec la LC-MS. Comme ce type d'analytes était, jusqu'à présent, inconnu pour nous, nous avons décidé d'étudier plus à fond leur comportement en spectrométrie de masse. Les caractéristiques de la spectrométrie de masse ont été examinées en utilisant de l'insuline comme protéine exemple. Comme l'ionisation électrospray est une technique d'ionisation "faible", nous obtenions toujours un ensemble de pics correspondants aux ions multichargés. Cette distribution d'ions pouvait être modulée de différentes manières vers les hautes masses ce qui nous offre une sélectivité plus étendue. Cela pouvait être réalisé par la variation du voltage de l'échantillonneur ou de la composition en solvant (par exemple, l'ionisation "wrong-way-round"). Une seconde manière d'augmenter la sélectivité était d'utiliser la dissociation induite par collision avec une énergie de collision basse ou haute.

La modulation des ions vers la gamme des hautes masses exigeait souvent l'utilisation de solutions très alcalines. Les colonnes phase inverse conventionnelles, construite en silice, ne supportant pas ces valeurs de pH élevées (pH>8), d'autres méthodes d'ajout de bases/acides post-colonne ont été recherchées. A cet effet, nous avons eu l'idée de placer un "bubble trap" dans la ligne de gaz "nebulizing". Cette petite invention nous a toujours permis d'obtenir de bons résultats.

Ensuite, nous avons porté toute l'attention sur la technique de purification pour une analyse LC-MS. Lors de notre recherche, nous avons constaté que l'ultrafiltration est extrêmement appropriée, non seulement du point de vue de la concentration mais aussi de l'isolation. Si l'on désire isoler l'analyte dans un concentré, il est opportun d'utiliser un filtre avec un seuil de coupure d'un demi ou d'un tiers du poids moléculaire de la substance que l'on veut analyser. Un désavantage de ce type de filtres est le temps de filtration relativement long. Nous avons remarqué qu'en ajoutant 1% de BSA, les filtres, avec un seuil de coupure

Résumé

supérieur, peuvent être utilisés, tout en réduisant fortement le temps de filtration pour un résultat identique.

Dans nos expérimentations, nous étions confrontés au phénomène de suppression d'ionisation et d'effets de matrice. Ceux-ci provoquaient souvent une réduction de la sensibilité ou l'apparition d'impuretés dans les chromatogrammes. Nous pourrions néanmoins résoudre ces problèmes dans la plupart des cas par dilution préalable de l'échantillon. Toutes ces observations ont renforcé l'avantage de l'utilisation d'un standard interne isotopiquement marqué.

Après ces pré-expérimentations, nous pouvions entamer notre sujet final: le développement d'une procédure de mesure de référence pour le peptide-C urinaire. Nous avons utilisé l'ultrafiltration pour isoler le peptide-C de l'urine. La chromatographie en mode gradient d'élution a été effectuée sur une colonne polymère phase inverse courte. La détection par la spectrométrie de masse a été effectuée avec le mode d'ionisation wESI- en «multiple réaction monitoring» dont les transitions d'ions suivantes étaient sélectionnées: m/z 1509>1500 et m/z 1517>1508. L'évaluation de la procédure de mesure développée nous permettait de conclure qu'elle possède une bonne précision, exactitude et robustesse. Les chromatogrammes obtenus étaient toujours sans interférences. Par conséquent, la procédure de mesure peut être proposée comme base pour une procédure de mesure de référence.

Au chapitre V, l'importance de la procédure de mesure de référence a été illustrée par l'application du modèle de traçage. La procédure de mesure développée a été appliquée à l'évaluation de la spécificité et de la recalibration de 5 systèmes de mesure de routine. Cette évaluation est faite par une analyse en parallèle de 45 échantillons d'urine avec les procédures de mesure de routine et de référence. La comparaison des méthodes a été soumise pour interprétation à une régression et illustrée graphiquement. Des écarts importants sont apparus entre les résultats obtenus par les 5 systèmes de routine et la procédure de mesure basée sur l'ID-LC-MS/MS et, plus particulièrement entre les systèmes de routine eux-mêmes. Ce dernier était très remarquable, du fait que tous les fabricants ont utilisé le même standard primaire pour adjuger une valeur à leur standard de produit. Ceci a indiqué que l'usage d'un standard commun n'est pas suffisant pour réaliser les procédures de mesure de routine SI-traçable. Comme tous les systèmes de routine montraient une bonne corrélation du second degré ($r > 0.980$) avec la procédure de mesure basée sur l'ID-LC-MS/MS, ce qui est la preuve d'une spécificité suffisante, la procédure de mesure basée sur l'ID-LC-MS/MS pouvait être appliquée pour recalibrer les systèmes de routine. Ceci a été effectué avec fruit et prouve que

Résumé

la procédure de mesure basée sur l'ID-LC-MS peut être appliquée en pratique pour la recalibration des systèmes de routine.

Néanmoins, comme pour T3, on doit également prêter attention au fait suivant: comme pour l'instant, il n'y a pas encore un standard de référence disponible généralement approuvé, ni est-il possible d'évaluer les procédures de mesure par une étude de comparaison entre différents laboratoires, notre procédure de mesure ne peut pas encore être acceptée officiellement comme procédure de mesure de référence secondaire. Par contre, nous estimons que notre procédure de mesure peut poser les bases pour le développement définitif d'un système de mesure de référence pour garantir l'exactitude des procédures de mesure pour la détermination des peptides.