



Universitetet
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

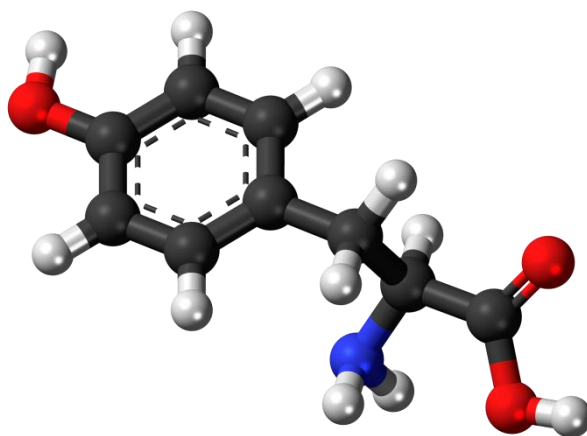
MASTEROPPGAVE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Studieprogram/spesialisering: Master i Biologisk Kjemi | Vår/høst semesteret, 2014/2015 Åpen |
| Forfatter: Rebecca Svela Johnsen | (signatur forfatter) |
| Fagansvarlig: Grete Jonsson Veileder(e): Grete Jonsson Kåre B. Jørgensen | |
| Tittel på masteroppgaven: Uttesting og validering av metoder for derivatisering og analyse ved hjelp av GC-EI/NCI-MS av tyrosin og nitrotyrosin. Engelsk tittel: Testing and validation of methods for derivatization and analysis with GC-EI/NCI-MS of tyrosine and nitro-tyrosine. | |
| Studiepoeng: 60 poeng | |
| Emneord: Nitrering av tyrosin Nitrotyrosin Nitro-oksidativt stress Fastfase ekstraksjon Derivatisering GC/MS | Sidetall: 83 + vedlegg: 4 Stavanger, 12/06/2015 dato/år |

Uttesting og validering av metoder for derivatisering og analyse ved hjelp av GC-EI/NCI-MS av tyrosin og nitrotyrosin.

Uttesting og validering av metoder for derivatisering og analyse ved hjelp av GC-EI/NCI-MS av tyrosin og nitrotyrosin.

Rebecca Sveta Johnsen
Masteroppgave i Biologisk Kjemi



Teknisk-Naturvitenskapelige Fakultet
Universitetet i Stavanger
Høst/Vår 2014/2015



Universitetet
i Stavanger

Uttesting og validering av metoder for derivatisering og analyse ved hjelp av GC-EI/NCI-MS av tyrosin og nitrotyrosin.

Forord

Denne oppgaven er en masteroppgave i biologisk kjemi ved Institutt for matematikk og naturvitenskap ved Universitetet i Stavanger. Den ble utført på laboratoriet ved avdeling for Medisinsk biokjemi og forskningslaben ved Stavanger Universitetssykehus (SUS).

Laboratoriearbeidet var et samarbeid med Irina Averkina, hvor deler av forsøkene ble utført sammen og andre utført individuelt.

Jeg vil rette en stor takk til Irina for et godt samarbeid, lærerike dager og gode lunsjer. Jeg vil også rette en stor takk til min hovedveileder fra Stavanger Universitetssykehus, Grete Jonsson, for god veiledning gjennom hele masteroppgaven. Jeg er svært takknemlig for gode ideer under oppgaven, for oppmuntring når ting ikke har gått slik vi ville på lab og for de gode og konstruktive tilbakemeldingene på skrivingen. Jeg vil også takke min veileder med Universitetet i Stavanger, Kåre B. Jørgensen, for veiledning ved den skriftlige delen og strukturen for oppgaven. Jeg vil også takke Ingeborg Kvivik for god opplæring på forskningslaben og for fine samtaler.

En tanke går også til min kjære farmor, som gikk bort under mitt arbeid med oppgaven. Til slutt vil jeg takke venner og familie for god støtte og oppmuntring under oppgaven.

Rebecca Svela Johnsen, Stavanger 2015

Sammendrag

3-Nitrotyrosin (3-NT) kan være en mulig biomarkør for å måle nitro-oksiderende stress, og det er derfor av interesse å etablere en metode for å måle konsentrasjonen i humant plasma. 3-NT blir produsert *in vivo* ved nitrering av tyrosin med reaktive nitrogen forbindelser som peroksynitritt (ONOO⁻), nitrylchlorid (NO₂Cl) eller nitrogenoksid radikal ([•]NO₂). Økt nitrering av tyrosin har blitt observert ved mange inflammatoriske og neurologiske sykdommer. Et annet resultat av nitrering av tyrosin er at den kan forandre de kjemiske og biologiske egenskapene til fritt og proteinbundet tyrosin. Mange ulike analysemetoder, som immunologiske og kromatografiske metoder, har blitt utarbeidet for å måle fritt og proteinbundet nitro-tyrosin i plasma. Men få metoder er blitt etablert for målinger av konsentrasjonen til nitro-tyrosin på grunn av mangel på sensitivitet og spesifisitet.

Hensikten med oppgaven var å utvikle en enkel derivatiseringsmetode for å måle fritt nitro-tyrosin og tyrosin i humant plasma. Tyrosin og 3-NT ble først ekstrahert med fastfase kolonnen Strata-X og deretter derivatisert med en kombinasjon av heptafluorbenzyl anhydrid (HFBA) og trimetylsilyl diazometan (TMSD). Metoden viste en god linearitet med $R^2 = 0,996$ for 3-NT og $R^2 = 0,9989$ for tyrosin. Deteksjonsgrensen var 0.2 µg/l for 3-NT og 20 µg/l for tyrosin mens kvantifiseringsgrensen var 0.73 µg/l for 3-NT og 0.17 mg/l for tyrosin. Denne deteksjonsgrensen er noe høyere enn rapportert konsentrasjon av fritt 3-NT og tyrosin i plasma fra friske personer. Rapporterte konsentrasjoner av fritt tyrosin og 3-NT er 12 mg/l og 14 µg/l. Analysemetodene som er utarbeidet er dermed ikke sensitive nok for å kunne måle 3-NT i plasma. Forskjellige ekstraksjons- og derivatiseringsmetoder ble testet, og derivatene av tyrosin og 3-NT ble deretter analysert med gasskromatografi / massespektrometri (GC/MS) for å finne den mest sensitive metoden.

Ekstraksjonen ble utført med ulike fastfase ekstraksjons (SPE) kolonner og med ultrafiltrering. SPE-kolonnene som ble testet var: Omvendt fase-kolonnene Bond Elut C18, Discovery DSC18, Strata-X og ionebytter-kolonnen Strata X-C. Derivatiseringsreagensene som ble testet var: Pentafluorbenzyl bromid (PFBBBr), *N,O*-bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), *N*-tert-butyltrimetylsilyl-*N*-metyltrifluoracetamid (MTBSTFA), heptafluorbutansyreanhydrid (HFBA) og TMSD. Oppgaven gir et innblikk i fordeler og ulemper med de forskjellige metodene og prosedyrene som ble testet og validert.

Innholdsfortegnelse

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Introduksjon | 1 |
| 2 | Teoretisk bakgrunn..... | 3 |
| 2.1 | Tyrosin og nitrotyrosin | 3 |
| 2.1.1 | Nitrering av tyrosin | 4 |
| 2.1.2 | Nitrooksidativt stress..... | 5 |
| 2.1.3 | Analyser av nitrotyrosin | 6 |
| 2.2 | Fastfase ekstraksjon..... | 8 |
| 2.2.1 | Omvendt fase..... | 9 |
| 2.2.2 | Ionebytter | 10 |
| 2.3 | Ultrafiltrering..... | 11 |
| 2.4 | Gasskromatografi – Massespektrometri | 12 |
| 2.5 | Derivatisering | 16 |
| 2.5.1 | Generell derivatisering av aminosyrer | 16 |
| 2.5.2 | Rapporterte derivatiseringsmetoder | 17 |
| 2.6 | Validering | 24 |
| 3 | Materialer og metoder | 26 |
| 3.1 | Kjemikalier | 26 |
| 3.2 | Plasmaprøve..... | 27 |
| 3.3 | Fastfase ekstraksjon | 28 |
| 3.4 | Ultrafiltrering | 30 |
| 3.5 | Derivatisering | 30 |
| 3.5.1 | Pentafluorbenzylbromid (PFBBr) | 30 |
| 3.5.2 | <i>N, O</i> -bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)..... | 31 |
| 3.5.3 | <i>N</i> -(<i>t</i> -butyldimetylsilyl)- <i>N</i> -metyltrifluoroacetamid (MTBSTFA)..... | 31 |
| 3.5.4 | Heptafluorbutansyreanhydrid (HFBA) og Trimetylsilyldiazometan (TMSD) .. | 32 |
| 3.6 | Gasskromatografi / massespektrometri analyser | 33 |
| 3.7 | Statistikk | 35 |
| 4 | Resultat og diskusjon | 36 |
| 4.1 | Fastfase ekstraksjon | 36 |
| 4.2 | Ultrafiltrering | 43 |
| 4.3 | Derivatisering | 44 |
| 4.3.1 | Pentafluorbenzyl bromid (PFBBr) | 44 |
| 4.3.2 | <i>N, O</i> -bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)..... | 45 |
| 4.3.3 | <i>N</i> -(<i>t</i> -butyldimetylsilyl)- <i>N</i> -metyltrifluoracetamid (MTBSTFA)..... | 47 |
| 4.3.4 | Heptafluorbutansyreanhydrid (HFBA) og Trimetylsilyldiazometan (TMSD) .. | 55 |
| 4.4 | Validering | 65 |

| | | |
|---|------------------|----|
| 5 | Konklusjon | 68 |
| 6 | Referanser..... | 69 |

Forkortelser

| | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------|
| BSTFA | <i>N,O</i> -bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid |
| C18 | Oktadecyl |
| CI | Kjemisk ionisering (Chemical ionization) |
| CV | Variasjonskoeffisient (Coefficient of variation) |
| DIPEA | Diisopropyletylamin |
| DTT | Ditionitt |
| EDTA | Etylendiamintetraacetat |
| EI | Elektronionisering (electron impact) |
| GC | Gasskromatografi |
| GC/MS | Gasskromatografi/ massespektrometri |
| GC/MS-MS | Gasskromatografi / tandem massespektrometri |
| HFB | Heptafluorbutyryl |
| HFBA | Heptafluorbutansyreanhydrid |
| HPLC | Væskekromatografi (High performance liquid chromatography) |
| LOD | Deteksjonsgrense (Limit of detektion) |
| LOQ | Kvantifiseringsgrense (Limit of quantification) |
| MPO | Myeloperoksidase |
| MS | Massespektrometer |
| MTBE | Metyl- <i>t</i> -butyleter |
| MTBSTFA | <i>N</i> -(<i>t</i> -butyldimetylsilyl)- <i>N</i> -metyltrifluoracetamid |
| <i>m/z</i> | masse-til-ladning (mass-to-charge ratio) |
| NCI | Negative kjemisk ionisering |
| 3-NT | 3-Nitrotyrosin |
| PBS | Fosfat bufret saltvann (Phosphate buffered saline) |
| PFB | Pentafluorbenzyl |
| PFBBr | Pentafluorbenzyl Bromid |
| pKa | Syrekonstant |
| R ² | Regresjonskoeffisienten |
| RNS | Reaktive nitrogenoksidforbindelser (Reactive nitrogen oxide species) |
| ROS | Reaktive oksygenforbindelser (Reactive oxygen species) |
| SD | Standardavvik |
| SIM | Enkelte-ion overvåkning (Selected-ion monitoring) |
| S/N | Signal-til-støy (signal to noise) |

| | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|
| SPAD | Fastfase analytisk derivatisering (Solid phase analytical derivatization) |
| SPE | Fastfase ekstraksjon (Solid phase extraction) |
| TBDMS | <i>t</i> -butyldimetylsilyl |
| TFA | trifluoreddiksyre |
| TIK | Total-ion kromatogram |
| TMS | trimetylsilyl |
| TMSD | Trimetylsilyldiazometan |

1 Introduksjon

Lite er kjent om den biologiske prosessen og mekanismen som omgjør tyrosin til 3-nitrotyrosin (3-NT) ved hjelp av nitring. En av grunnene er problemet med å kvantifisere slike lave konsentrasjoner av 3-NT som finnes i biologiske matriser. Det finnes flere artikler om etablering av metoder for å detektere og kvantifisere 3-NT, men ingen metoder er etablert ennå (Soderling et al., 2003). Analyser av 3-NT i biologiske prøver er av stor interesse av flere grunner: de kan f.eks. bli brukt som en indikator på nitro-oksidativt stress (Ryberg & Caidahl, 2007) som oppstår ved flere sykdommer, blant annet kronisk inflammasjon (Soderling et al., 2003). Nitring av tyrosin kan forandre de kjemiske og biologiske egenskapene til fritt og proteinbundet tyrosin (Ryberg & Caidahl, 2007).

Flere artikler har rapportert økt verdi av proteinbundet 3-NT ved mange sykdommer og patologiske tilstander som inflammasjon, Alzheimer (Jiang & Balazy, 1998) og Parkinson (Larsen et al., 2008). Fritt 3-NT har blitt detektert i pasienter med leddgikt (Kaur & Halliwell, 1994), i urinprøver fra pasienter som blir behandlet med nitroglyserin og plasma fra sigarettøkerne personer (Jiang & Balazy, 1998). Forskjellige opprensingsmetoder, som fast-fase ekstraksjon (SPE), væskechromatografi (HPLC) (Frost et al., 2000) og ultrafiltrering (Soderling et al., 2003) har blitt anvendt for å separere 3-NT fra plasmaprøver. Ulike analysemetoder er blitt brukt for å kvantifisere mengden av proteinbundet 3-NT og fritt 3-NT som immunohistokjemiske teknikker (Viera et al., 1999), HPLC (Kamisaki et al., 1996) og gasskromatografi / massespektrometri (GC/MS) og gasskromatografi - tandem massespektrometri (GC-MS/MS) (Tsikas et al., 2005). For å kunne analysere 3-NT er det nødvendig med derivatisering for å gjøre 3-NT mer egnet for analyse. Mange artikler har rapportert ulike metoder for å derivatisere 3-NT. Noen artikler har derivatisert med et steg, slik som med pentafluorbenzyl bromid (PFBBR) (Frost et al., 2000) og andre har brukt flere steg som f.eks. et akylerings- og et metyleringssteg (Soderling et al., 2003).

Målet for denne oppgaven var å finne en derivatiseringsmetode for å måle fritt og proteinbundet 3-NT og tyrosin i plasmaprøver ved hjelp av GC/MS. Mengden av 3-NT og tyrosin skulle bli sammenlignet for å se om det er en sammenheng mellom økt nivå av 3-NT i pasienter med ulik grad av nyresvikt og friske kontroller.

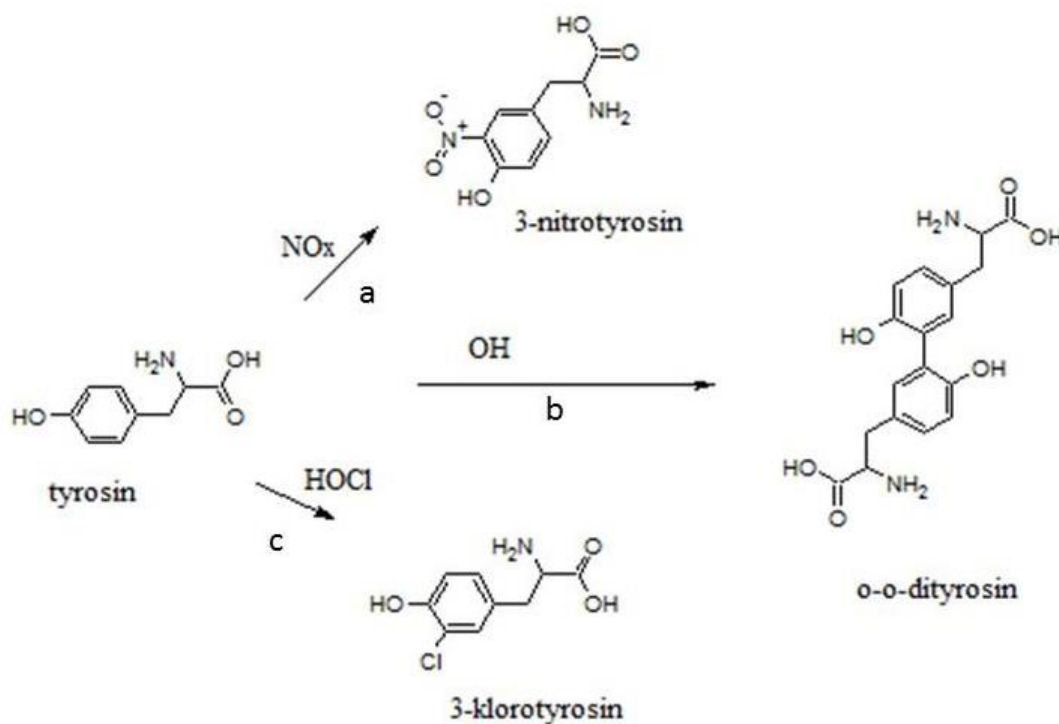
Opgaven er bygget opp med en teoretisk bakgrunnsdel om nitring av tyrosin til 3-NT, SPE, ultrafiltrering, ulike derivatiseringsteknikker og GC/MS. Dette etterfølges av et kapittel om

materialer og metoder som er brukt i det praktiske arbeidet. Deretter blir resultatene presentert og diskutert, inndelt etter eksperimentene som er blitt utført. Tilslutt er det en konklusjonsdel og liste over referanser, samt vedlegg med ekstra informasjon om deler av resultatene.

2 Teoretisk bakgrunn

2.1 Tyrosin og nitrotyrosin

Tyrosin, eller (2S)-2-amino-3-(4-hydroksyfenyl)propansyre, er en ikke-essensiell aminosyre (kroppen produserer aminosyren)(PubChem, 2015). Tyrosin er en polar aminosyre som består av en hydroksylgruppe på den hydrofobiske sidegruppen. Hydroksylgruppen gjør tyrosin mer hydrofil og reaktiv enn dens analog, fenylalanin (Berg et al., 2012). Nitring av tyrosin innebærer en substitusjon av et hydrogenatom med en nitro-gruppe på den tredje posisjonen på den aromatiske ringen. Nitring av tyrosin består av to reaksjoner hvor den første reaksjonen er en oksidasjon av den aromatiske ringen på tyrosin. Det andre steget er en substitusjonsreaksjon mellom det oksiderte hydrogenatomet på den aromatiske ringen og nitrogenoksider som peroksintritt (ONOO-) eller nitrogendioksid radikal (Erkoc et al., 2010).



Figur 2.1.1 - Reaksjoner mellom tyrosin og NO_x, OH⁻ og HOCl som danner 3-nitrotyrosine (a), o-o-dityrosin (b) og 3-klorotyrosin (c).

Når ulike forbindelser reagerer med tyrosin kan det dannes mange forskjellige produkter (Figur 2.1.1). 3-Klorotyrosin, 3-bromotyrosin og 3-nitrotyrosin har alle blitt brukt som spesifikke markører for klorering, bromering og nitring (Gaut et al., 2002).

2.1.1 Nitring av tyrosin

Nitring av tyrosin er substitusjon av et nitroniumion (${}^+\text{NO}_2$) permanent til orto-posisjonen til hydroksylgruppen på den aromatiske ringen som resulterer i fritt eller proteinbundet 3-NT (Ryberg & Caidahl, 2007). Nitring av tyrosin har blitt observert i mange inflammatoriske (Soderling et al., 2007) og neurologiske sykdommer (Celio et al., 2006). Nitring kan forandre den kjemiske og biologiske egenskapen for fritt og proteinbundet tyrosin (Erkoc et al., 2010), som kan ha en stor betydning for cellefunksjonen (Erkoc et al., 2010; Frost et al., 2000). Forekomsten av 3-NT *in vivo* har blitt linket som en biokjemisk markør for eksponering av reaktive nitrogenforbindelser (RNS) (Jiang & Balazy, 1998) og reaktive oksygenforbindelser (ROS) (Soderling et al., 2007). Måling av 3-NT i biologiske væsker og vev har økt og blir brukt for å overvåke produksjonen av RNS (Frost et al., 2000) og nitrogenoksid metabolismen *in vivo* (Pannala et al., 2003). 3-NT er en relativ stor aminosyre (Erkoc et al., 2010) og nitrogruppen gir den en høy polaritet, noe som fører til at 3-NT er mer hydrofil enn tyrosin (Pavlovic et al., 2012).

Det ble lenge trodd at 3-NT ble produsert når tyrosin reagerte med peroksintritt superoxid anion (Frost et al., 2000; Jiang & Balazy, 1998). Men nyere studier viser at nitring *in vivo* også kan oppstå via andre reaksjoner, som inkluderer hypokloritt syre eller peroksidase enzym reaksjoner (Frost et al., 2000). Mange biokjemiske prosesser kan føre til nitring av tyrosin til 3-NT. Proteintyrosin kan bli nitret av peroksintritt (ONOO^-) og myeloperoksidase (MPO) (Celio et al., 2006). Peroksintritt har en kort levetid og er produktet av reaksjonen mellom nitrittoksid og superoksid (likning 1) (Jiang & Balazy, 1998). MPO er et hemprotein og er involvert i produksjonen av ROS og RNS (Wang et al., 2014). Nitrylklorid (NO_2Cl) har også blitt påvist til å nitre tyrosin (Jiang & Balazy, 1998). Forekomsten av nitrat og nitritt i biologiske prøver kan under sure forhold føre til *in vitro* nitring av aminosyrer, spesielt aromatiske aminosyrer som tyrosin (Soderling et al., 2003).

Dannelse av 3-NT fra tyrosin kan også oppstå *in vitro* som under prøveopparbeidingen (Frost et al., 2000).



I proteiner oppstår de fleste nitrete reaksjoner ved å omdanne tyrosin til 3-NT, som er en stabil aminosyre. Proteinfunksjonen kan bli forandret med nitring av tyrosin, fordi nitringen reduserer syrekonstant (pKa) verdien av fenolgruppen (Mani et al., 2003)

(fra 10.0 – 10.3 til 7.2 – 7.5 for fritt tyrosin og 3-NT) (Radi, 2013) og vil påvirke opprettholdelsen av proteinkonformasjonen (Mani et al., 2003).

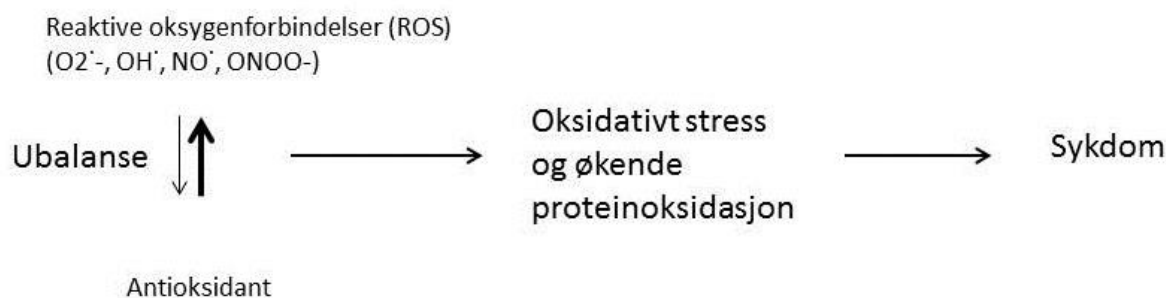
Analyse av 3-NT i biologiske prøver er av stor interesse av flere grunner. For det første, endringen av tyrosin til NT kan bli brukt som en indikator på nitro-oksiderende stress i en prøve fra et spesielt biologisk system. For det andre, 3-NT er en relativt stor og klumpete aminosyre, og nitring av tyrosin kan forandre de kjemiske og biologiske egenskapene for fritt og proteinbundet tyrosin. Måling av 3-NT konsentrasjonen i humant plasma er av stor interesse fordi økt nitring av proteiner har sammenheng med mange sykdommer. Selv om kvantitative metoder nesten utelukkende er begrenset til analyse av fritt 3-NT kan også proteinbundet 3-NT bli bestemt etter enzymatisk eller kjemisk hydrolyse av proteiner til aminosyrer (Ryberg & Caidahl, 2007).

2.1.2 Nitrooksiderende stress

Nitring av proteintyrosin til 3-NT er et resultat av forstyrrelsen av nitrogenoksid ($\cdot\text{NO}$) signalisering og metabolisme mot pro-oksiderende prosesser. Tilstanden er definert som nitro oksiderende stress (Radi, 2013). Den cellulære funksjonen kan bli skadet på grunn av den post-translasjonelle nitringen av tyrosin som oppstår ved oksiderende stress eller inflammasjon (Soderling et al., 2003). Dette kan forandre proteinkonformasjonen, løseligheten og følsomheten, og kan være årsaken til økt proteindegradering. Økt konsentrasjon av 3-NT har blitt brukt som en indikator på nitrooksiderende stress i biologiske systemer (Pavlovic et al., 2012). 3-NT har også blitt ansett som en biomarkør for oksiderende stress, siden produksjonen av 3-NT involverer ROS, som superoksid og hydrogen peroksid og RNS (Sun et al., 2007). Begrepene nitro-oksiderende- og oksiderende stress kan skilles med at oksiderende stress er resultater av reaksjoner med $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 og $\cdot\text{OH}$. Nitrooksiderende stress er resultat av reaksjoner med ONOO^- , $\text{CO}_3^{\cdot-}$ og $\cdot\text{NO}_2$. Selv om oksiderende stress dominerer RNS aktiviteten under biologiske forhold, blir oksiderende prosesser forårsaket av RNS kalt nitrooksiderende stress (Lancaster, 2006).

Oksiderende stress er en tilstand hvor det er ubalanse mellom produksjonen av ROS og evnen til organismens naturlige forsvarsmekanisme (antioksidanter) til å takle de reaktive forbindelsene og forhindre uønsket effekt (Figur 2.1.2). ROS, som består av blant annet RNS, kan reagere med forskjellige substrater i kroppen slik som lipider, nukleinsyrer og proteiner. Oksidasjon

av hvilken som helst av disse substansene kan teoretisk føre til kroniske sykdommer som kreft, hjerte- og karsykdommer, gråstær og generell aldring (Mayne, 2003).



Figur 2.1.2 - Oksidativt stress er en tilstand der konsentrasjonen av reaktive oksygenforbindelser (ROS) er høyere enn antioksidant. Denne tilstanden fører til økende proteinoksidasjon (som igjen fører til sykdom).

2.1.3 Analyser av nitrotyrosin

Økt konsentrasjon av proteinbundet 3-NT har blitt detektert i mange sykdommer og patologiske tilstander som inflammasjon, Alzheimer (Jiang & Balazy, 1998) og Parkinson (Larsen et al., 2008). Fritt 3-NT er blitt detektert hos pasienter med leddgikt (Kaur & Halliwell, 1994), i lever som blir klargjort for eksperimentell transplantasjon, i urin fra mennesker som blir behandlet med nitroglyserin og i plasma fra sigaretttrøkere (Jiang & Balazy, 1998).

Det er vanskelig å måle mengden av fritt og proteinbundet 3-NT på grunn av de små konsentrasjoner som finnes i biologiske materialer. Det finnes mange metoder for å måle 3-NT, men disse metodene er ikke sensitive og/eller spesifikke nok (Jiang & Balazy, 1998). Konsentrasjonen av fritt tyrosin og 3-NT er funnet til å være rundt 12 µg/ml og 14 ng/ml. Og proteinbundet tyrosin og 3-NT i plasmaproteiner er funnet til å være rundt 60 µg/mg og 2.7 ng/mg hos friske personer (Frost et al., 2000). Fra analytiske metoder, som er basert på GC/MS, er den basale plasma konsentrasjonen for fritt 3-NT målt til å være 0.16 – 14.5 ng/ml (Tsikas et al., 2005).

3-NT i humant plasma er rapportert i forskjellige studier og konsentrasjonene varierer med en faktor på 86 mellom den laveste og den høyeste konsentrasjonen fra ulike metoder (Tabell 2.1.1). En grunn for stor variasjon er at tyrosin lett kan bli nitrert til 3-NT under prøveopparbeidingen og analyser *in vitro* (Gaut et al., 2002). Prøveopparbeiding med

protolyse med syre eller derivatisering med enten esterifisering eller eterifisering kan forårsake dannelse av 3-NT *in vitro* eller *ex vivo* (Tsikas & Duncan, 2014). Mange eksperimenter *in vitro*, har vist at nitrering av tyrosin i proteiner kan ha en effekt på enzymfunksjonen og kan føre til sykdommer (Soderling et al., 2007). Selv med samme derivatiseringsmetode (Frost et al., 2000; Gaut et al., 2002) er konsentrasjonene som er detektert i massespektrometeret forskjellige med en faktor på 5.6.

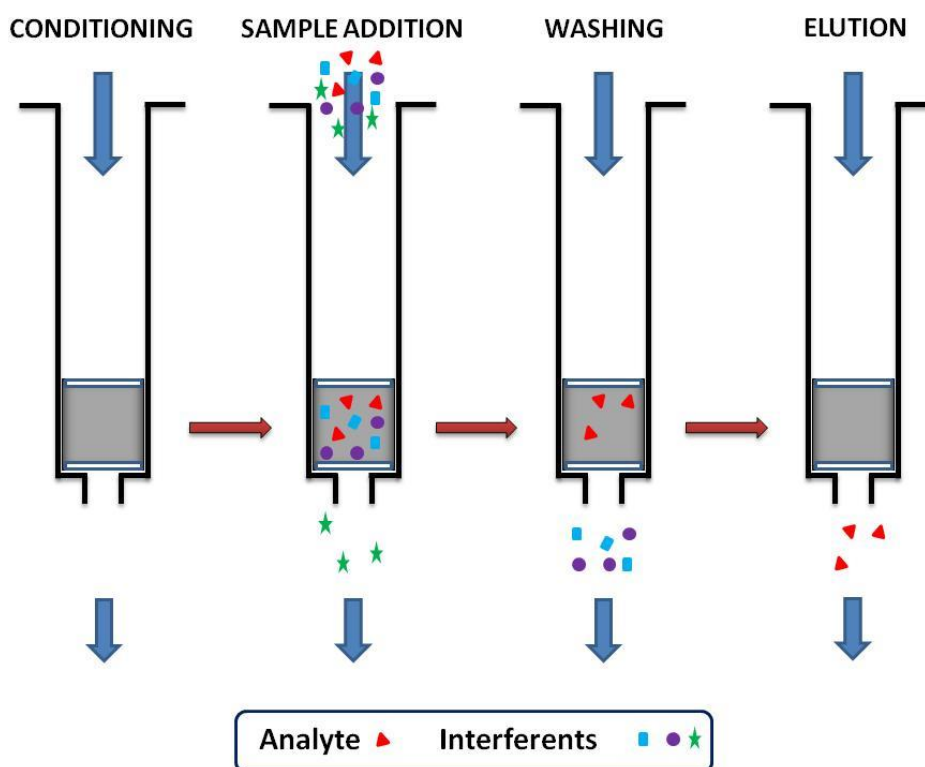
Tabell 2.1.1 - Rapporterte konsentrasjoner (gjennomsnitt \pm SD) av fritt NT i humant plasma fra friske kontrollere analysert ved hjelp av GC/MS eller GC/MS-MS.

| Metode | LOQ (nM) | 3-NT konsentrasjon (nM) | Antall individer | Referanse |
|----------|----------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|
| GC/MS | 6.5 fmol (LOD) | 11 ± 2 | 3 | (Gaut et al., 2002) |
| GC-MS/MS | 0.125 | 2.8 ± 0.84 | 11 | (Schwedhelm et al., 1999) |
| GC/MS | 1 fmol (LOD) | – ^a | 6 | (Yi et al., 2000) |
| GC/MS | – ^a | 64 ± 3.1 | 8 | (Frost et al., 2000) |
| GC/MS-MS | 0.3 | 0.74 ± 0.03 | 12 | (Soderling et al., 2003) |
| GC/MS | – ^a | 5.44 ± 1.19 | 29 | (Pannala et al., 2003) |

^a Ikke oppgitt

2.2 Fastfase ekstraksjon

En vanlig brukt opprensingsmetode av biologisk materiale før kjemisk analyse er fastfase ekstraksjon (SPE) (Moein et al., 2014). SPE er basert på et stoffs fordeling mellom overflaten til et fast materiale, (sorbent), og en væske (eluent). Stoff som skal isoleres på overflaten til en fast sorbent, må ha kjemiske grupper på overflaten som gir en interaksjon med stoffet som er sterkere enn interaksjonen mellom stoffet og væsken det er løst i. Sorbenten i SPE er vanligvis silika-basert. Silika er et fast materiale som ikke sveller eller krymper i ulike løsemidler. Ekstaksjoner med silikabasert sorbent kan utføres i hele pH området 1-14, siden det er kort kontaktid mellom sorbenten og løsningsmiddel (Greibrokk et al., 1994). Hydrofobiske forbindelser i en prøve blir retardert med den funksjonelle gruppen til kolonnen med van der Waals bindinger og kan bli ekstrahert fra den vandige løsningen (Figur 2.2.1). Forbindelsene blir ekstrahert gjennom kolonnen ved hjelp av vakuum som suger eluenten igjennom (Skoog et al., 2004).



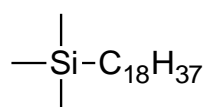
Figur 2.2.1 – De 4 ulike trinn som SPE består av: kondisjonering av sorbent, tilsetning av prøve, utvasking av forurensninger og tilslutt eluering av aktuelt stoff (Paolo Lucci et al., 2012).

Kondisjoneringen gjør sorbenten klar til å ta imot prøven. Kondisjoneringen utføres ved å la et løsemiddel som fukter både silikaoverflaten og de funksjonelle gruppene passere gjennom kolonnen. Et effektivt kondisjoneringsmiddel er metanol, fordi den gir interaksjon både med

silanolgruppene på overflaten og med karbonatomene i de funksjonelle gruppene. Aktuelle stoffer blir retardert når prøveløsningen suges igjennom kolonnen. Vaskeløsningen vasker ut komponenter i prøven som har svak interaksjon med sorbenten. Aktuelle stoffer blir så eluert fra kolonnen med et elueringsmiddel (Greibrokk et al., 1994). Aminosyrer kan reagere som kationer, anioner eller som nøytrale stoffer fordi de består av minst en karboksylsyre og en aminogruppe, og pH i løsningen har mye å si. Nøytrale forbindelser kan bli anvendt av omvendt fase ekstraksjon mekanisme med å bruke svake Van der Waals bindinger (Spanik et al., 2007). To forskjellige SPE prinsipper ble brukt i denne oppgaven, ionebytter- og omvendt fase.

2.2.1 Omvendt fase

Omvendt fase ekstraksjon blir brukt for å konsentrere og rense upolare stoffer fra polare prøveløsninger. Ekstraksjonen er basert på interaksjoner mellom karbon-hydrogen bindingene i stoffene og karbon-hydrogen bindingene på sorbenten. Kraftene som virker mellom stoffene og sorbenten er Van der Waals krefter (Greibrokk et al., 1994). Den vanligste sorbenten i omvendt fase er oktadecyl (C18)(Figur 2.2.2).



Figur 2.2.2 – Den funksjonelle gruppen til Oktadecyl (C18) sorbent

Bond elut C18 (Varian)

Bond Elut C18 er en hydrofobisk silika bundet sorbent. Den har en stor evne til å holde på ikke-polare komponenter og de fleste organiske analyttene fra vandig matriks (Agilent Technologies, 2015). Mekanismen for retensjon med C18 sorbent henger sammen med Van der Waals krefter, hydrogenbindinger eller dipol-dipol interaksjoner (Biesaga et al., 2005).

Discovery C18 (Supelco)

Discovery C18 har en polymerisk C18 bundet med et høyt karbonantall for bedre bindingskapasitet. Kolonnen absorberer de fleste organiske analytter fra vandige løsninger, og brukes for å avsalte vandige matrikser og for ekstrahering av forskjellige strukturelle analytter fra den samme prøven (Sigma-Aldrich, 2015).

Strata-X polymerisk (Phenomenex)

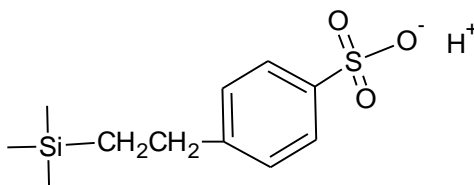
Polymerisk sorbent har fordelen med at den binder mer selektivt med analytter som består av en aromatisk ring enn andre silika baserte kolonner (Biesaga et al., 2005). Strata-X har også en sterk retensjon for nøytrale, sure eller basiske komponenter under aggressive, høy prosentvis organisk vaskeløsning (Phenomenex, 2015). Den polymeriske sorbenten, hos Strata X, har et høyere stabilt pH-område for interaksjoner enn C18 sorbenter og styrene-divinylbenzen polymeren til Strata-X har en stor overflate som resulterer i en ekstrem høy analyttkapasitet (Michalkiewicz et al., 2008). Sorbenten bygger på 3 mekanismer for retensjon: pi-pi bindinger, hydrogenbindinger (dipol-dipol interaksjon) og hydrofobiske interaksjoner (Phenomenex, 2015).

2.2.2 Ionebytter

Ionebytter-kolonner blir mest brukt til å isolere ioniserte stoffer fra vandige prøveløsninger (Greibrokk et al., 1994) og er vanlig å bruke på aminosyrer i vannløsninger. Ionebytter ekstraksjon er basert på spesifikke ioniske interaksjoner mellom sorbenten og stoffet (Spanik et al., 2007). Negativt ladede kationbyttere ekstraherer positivt ladede kationer og positivt ladede anionbyttere ekstraherer negativt ladede anioner (Greibrokk et al., 1994). En skiller mellom sterke og svake ionebyttere. De svake ionebytterne har funksjonelle grupper som er ionisert i pH-området som tilsvarer pKa verdien. De sterke ionebytterne har funksjonelle grupper som er ionisert i hele pH-området.

Strata X-C polymerisk sterk kation (Phenomenex)

Strata X-C er en silika basert kolonne som består av en styren-divinylbenzen ryggrad og bærer en sulfonsyrefunksjonalitet (Figur 2.2.3). Kolonnen har også evnen til å danne hydrogenbindinger og dipolare forbindelser (Huq et al., 2005). Strata X-C gir fullstendig retensjon for basiske komponenter med pKa < 10.5, som gjør det mulig å vaske med 100 % organisk løsemiddel. Vask med en 100 % organisk løsning fører til at en maksimal mengde av forstyrrende stoffer blir fjernet fra de ønskede komponentene (Phenomenex, 2015).



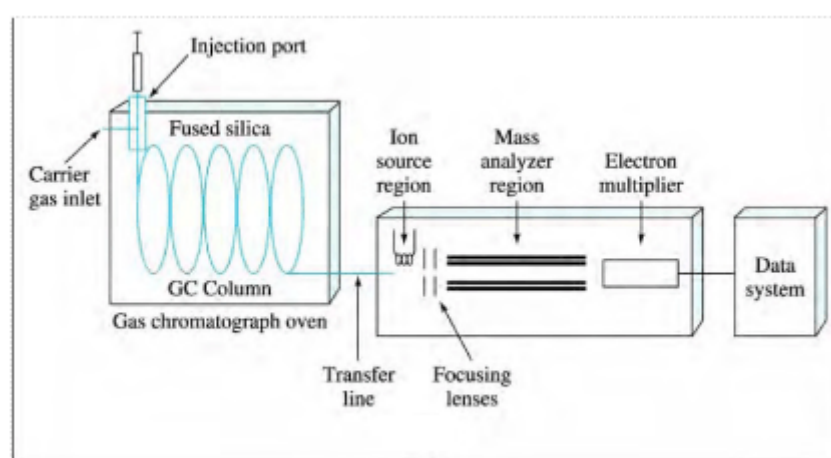
Figur 2.2.3 - Den funksjonelle gruppen til Strata X-C, med en styren-dicinylbenzen ryggrad og en sulfonsyre.

2.3 Ultrafiltrering

Ultrafiltrering blir definert som en separasjon mellom to eller flere komponenter fra en væske og komponentene blir separert basert på størrelse. Ultrafiltrering består av en membran som virker som en selektiv barriere. Membranen skal slippe igjennom noen komponenter og holde fast på andre komponenter. Ultrafiltrering slipper igjennom små molekyler og holder igjen makromolekyler som er større enn 10-200 Å, som proteiner og stivelse (Cheryan, 1998). Det finnes forskjellige typer membraner og størrelsen på membranen avgjør hvor store molekyler som holdes igjen.

2.4 Gasskromatografi – Massespektrometri

For kvalitativ og kvantitativ analyse av ukjente forbindelser er gasskromatografi (GC) en av de mest brukte teknikkene (Skoog et al., 2004). En GC er et instrument for effektiv separering av en blanding av stoffer, men det er ikke egnet for å identifisere dem (Herbert & Johnstone, 2003). GC kan videre kobles til et massespektrometer (MS) som kan brukes til kvalitativ analyse av stoffene som blir eluert fra kolonnen eller brukes som en veldig følsom spesifikk detektor for kvantitativ analyse (Greibrokk et al., 1994). En kombinasjon mellom disse instrumentene danner et instrument (GC/MS) som kan separere, identifisere og kvantifisere komplekse forbindelser (Figur 2.4.1) (Herbert & Johnstone, 2003).



Figur 2.4.1 - Gasskromatografi / massespektrometer (Repository, 2015).

Separasjon

Kromatografi består av en mobilfase og en stasjonærfase. I GC er den mobile fasen en gass (bæregass) og den stasjonære fasen er et fast stoff/væske inne i en kolonne (Herbert & Johnstone, 2003). Med utgangspunkt i den stasjonære fasen skilles det mellom 2 typer GC: gass-fast stoff kromatografi, hvor den stasjonære fasen er et adsorpsjonsmiddel, og gass-væske kromatografi hvor den stasjonære fasen er en ikke-flyktig væske (Greibrokk et al., 1994). I begynnelsen av kolonnen er det en injektor (et lite oppvarmet rom), hvor prøven som skal bli analysert blir injisert direkte inn i kolonne (Herbert & Johnstone, 2003). Bæregassen strømmer gjennom injektoren, kolonnen og til detektoren. I injektoren blir prøven fordampet og bæregassen tar med prøven til kolonnen (Greibrokk et al., 1994). Kolonnen er plassert inne i en temperaturstyrt ovn (Herbert & Johnstone, 2003), hvor stoffene i prøven blir separert (Greibrokk et al., 1994). Bevegeligheten til blandingen gjennom kolonnen henger sammen

med stoffene sin flyktighet; jo mer flyktig en komponent er jo lenger tid er den i gassfasen, og forttere går den igjennom (Herbert & Johnstone, 2003). Hastigheten til stoffene bestemmes også av løseligheten i stasjonærfasen og temperaturen (Greibrokk et al., 1994). Separasjonen i den stasjonære fasen avhenger av den kjemiske sammensetningen av blandingen. To komponenter som har samme flyktighet men forskjellig polaritet vil passere kolonnen forskjellig. Polare komponenter vil gå saktere igjennom en polar kolonne og upolare komponenter vil gå senere igjennom en upolar kolonne. Under passeringen gjennom kolonnen vil en mikstur bli gradvis separert til individuelle forbindelser, noen passerer kolonnen forttere enn andre og blir eluert tidligere. Separasjonen av en blanding av komponenter blir bedre jo lenger kolonnen er (Herbert & Johnstone, 2003).

Massespektrometer

Et massespektrometer består vanligvis av tre hovedkomponenter: ionekilde, masseanalysator og detektor. MS blir ofte brukt som en detektor og kan gi informasjon om strukturen til analyttene i tillegg til kvantifisering. I MS blir molekylene ionisert i ionekilden og molekylene som er ionisert kan nedbrytes (fragmenteres) i mindre deler. Graden av fragmentering er avhengig av strukturen til molekylet og hvor mye energi som blir tilført under ioniseringen. Massen til de ioniserte molekylene og eventuelle fragmentioner kan bestemmes ved en separasjon i en analysator etter masse / ladning forhold (m/z) og detekteres i en detektor (Greibrokk et al., 1994).

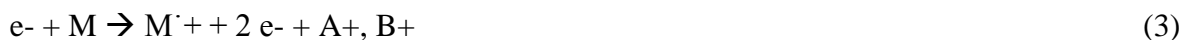
Ionisering

I ionekilden kan både positive og negative molekylioner og fragmenter dannes. Fragmentering av et molekyl er strukturavhengig slik at massespektrumet kan brukes for å identifisere forbindelsen. Hvor mye fragmentering som skjer ved ioniseringen avhenger av hvilken ioniseringsteknikk som blir brukt (Greibrokk et al., 1994).

Elektronionisering

Elektronionisering (EI) også kalt elektronstøtionisering, er den mest vanlige ioniseringsteknikken i MS. Elektroner dannes fra en glødetråd (filament) som blir akselerert gjennom ionekilden med en energi på 70 eV (Greibrokk et al., 1994). Elektronet kan påvirke nøytrale molekyler [M] med å passere nærme eller gå rett igjennom molekylet, slik at et elektron fra molekylet blir spaltet av. Passerer elektronet nærme blir det dannet positive molekylioner (ligning 2), men hvis elektronet går rett igjennom molekylet blir molekylet

fragmentert i ioner med mindre masse (ligning 3). I EI er det et høyt vakuum (lavt trykk), rundt 10^{-5} mbar som blir holdt konstant. På grunn av det høye vakuomet vil ionene som blir dannet i EI ikke reagerer med andre ioner, før de blir løslatt fra ionekilden inn til massespektrometeret for analyse. EI spekteret består av signaler fra både molekyl- og fragmenterings-ioner.



Negativ kjemisk ionisering

Kjemisk ionisering (CI) er en mykere ioniseringsteknikk enn EI (Greibrokk et al., 1994). Gasstrykket i ionekilde er høyere, opp til 10^{-3} mbar (noen ganger opp til atmosfærisk trykk) (Herbert & Johnstone, 2003). Molekyler ioniseres i CI ved ion / nøytrale reaksjoner mellom molekyl og ioner fra en reagensgass. Vanlige reagensgasser som blir brukt er metan, isobutan og ammoniakk. Ved CI dannes det hovedsakelig protonerte molekyler (MH^{+}), og relativt lite fragmentioner. Negative ioner dannes når det benyttes en relativt tett ionekilde med høyt trykk av en reagensgass. Dannelsen av negative ioner skjer ved ion-molekyl reaksjoner mellom analytten og reagensgassens negative ioner (Greibrokk et al., 1994). Negative kjemisk ionisering (NCI) er en sensitiv teknikk brukt for å analysere stoffer som har høy elektronaffinitet som polysykliske aromatiske hydrokarboner og polyfluoreerte organiske forbindelser (Herbert & Johnstone, 2003).

Deteksjon

Ionene som forlater ionekilden er molekylioner, fragmentioner og ikke ioniserte molekyler. MS analyserer ionene fra ionekilden og sorterer dem etter m/z verdier (Skoog et al., 2004). m/z verdien er definert som: et ion som har en gitt masse (m) og en enkel ladning ($z = 1$) gir m/z verdien: $m/z = m/1 = m$ (Herbert & Johnstone, 2003). De separerte ionene blir detektert og signalene blir forsterket av en elektronmultiplikator (Skoog et al., 2004). Realtiv intensitet av ioner som funksjon av m/z -verdi plottes vanligvis i et histogram og kalles et massespektrum. MS kan benyttes som en detektoren i et kromatografisk system og da vil analyttene introduseres i massespektrometeret en etter en. Massespektrometeret kan innstilles til å sveipe(scanne) over et valgt masseområde under kromatograferingen, da vil hvert sveip få et massespektrum. Total-ion kromatogram (TIK) er når kromatogrammet baserer seg på den totale ionestrømmen (summen av alle ione intensitetene som treffer detektoren i et sveip)

som funksjon av tiden. MS kan bli programmert til å detektere en eller noen få m/z verdier og gi kromatogram basert på enkelte-ion overvåkning (SIM) (Greibrokk et al., 1994).

Basetoppen er den toppen som korresponderer til det ionet som har høyest intensitet og kan være molekylærionet eller et fragmention. Massespekteret er ulikt for forskjellige stoff og kan brukes som fingeravtrykk for å identifisere forskjellige molekyler (Herbert & Johnstone, 2003).

2.5 Derivatisering

2.5.1 Generell derivatisering av aminosyrer

Mange stoffer er lite flyktige og har polare funksjonelle grupper som gjør dem lite egnet for gaskromatografiske metoder. Hensikten med derivatisering er å lage flyktige stabile derivater av de aktuelle stoffene slik at de blir velegnet for GC (Greibrokk et al., 1994). Molekyler som består av funksjonelle grupper som -COOH, -OH, -NH og -SH blir ofte derivatisert på grunn av deres evne til å danne hydrogenbindinger til derivatiseringsreagensene. Som fører til at derivatene får bedre flyktighet og bedre interaksjoner mellom komponentene og GC kolonnen (Schummer et al., 2009).

De mest vanlige derivatiseringsreaksjonene er alkylering, acylering og silylering. Alle reaksjonene skjer ved substitusjon av et aktivt hydrogen i molekylet. Alkyleringreagenset blir byttet med det aktive hydrogenatomet fra en alifatisk eller aromatisk gruppe, som igjen fører til at polariteten til forbindelsen svekkes. Alkylering blir ofte brukt på forbindelser som har aktive hydrogenatomer, som fenoler og karboksylsyrer, som blir omdannet til enten ester eller eter under reaksjonen (Schummer et al., 2009).

I acyleringsreaksjoner kan anhydrider, syreklorider og halogenholdige reagenser reagere med aktive hydrogenatomer og danne stabile og flyktige derivater velegnet for GC (Greibrokk et al., 1994). Et opprensingssteg er nødvendig før injeksjon til GC/MS, fordi prøven inneholder en syrerest.

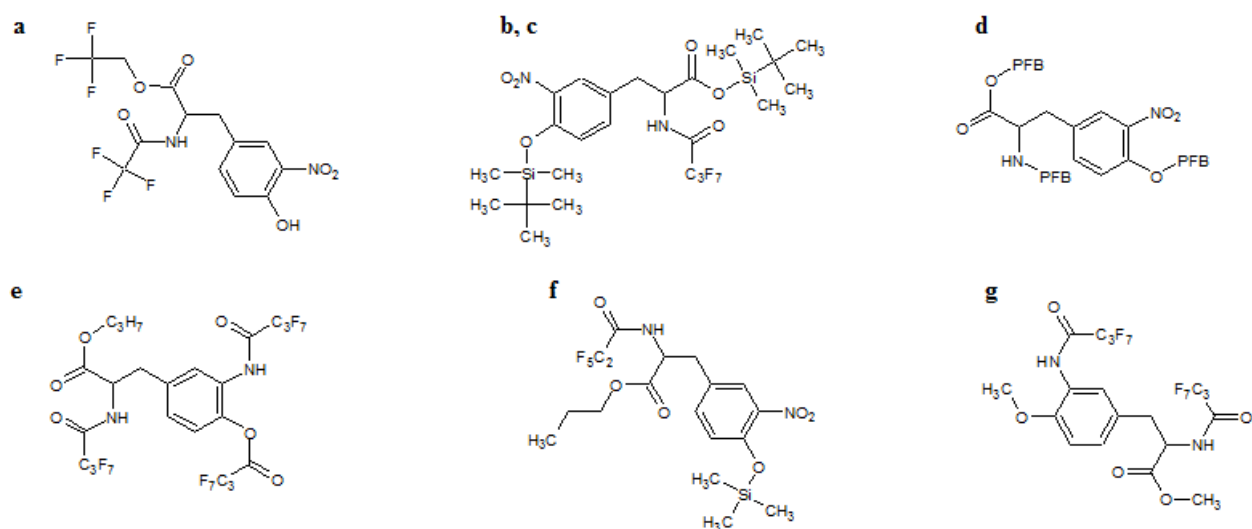
Den siste derivatiseringsreaksjonen er silylering (Schummer et al., 2009). Silylering er en derivatiseringsprosedyre som er egnet for forskjellige polare molekyler (Jimenez-Martin et al., 2012). I denne reaksjonen blir aktive hydrogenatomer fra syrer, alkoholer, tioler, aminer, amider, ketoner eller aldehyder erstattet med en trimetylsilyl (TMS) gruppe (Jimenez-Martin et al., 2012; Schummer et al., 2009). Reaksjonen oppstår via substitusjon og reaksjonsutbytte er ofte bedret med tilstedeværelsen av en sterk utgående gruppe. Produktet fra en silyleringsreaksjon er ofte mer flyktig og varmestabilt. Det er ikke nødvendig med et opprensningstrinn før injeksjon til GC (Schummer et al., 2009).

2.5.2 Rapporterte derivatiseringsmetoder

Forskjellige analytiske metoder har blitt utviklet for å bestemme mengden av proteinbundet og fritt 3-NT i biologiske prøver. 3-NT har blitt målt ved hjelp av immunohistokjemiske teknikker (Viera et al., 1999), væskechromatografi (HPLC) (Kamisaki et al., 1996) og med GC/MS og GC/MS-MS (Tsikas et al., 2005). For å detektere 3-NT i biologisk vev er kromatografiske metoder mer foretrukket enn immunokjemiske metoder. Immunokjemiske metoder er en semikvantitativ metode og resultatet kan bli forvekslet med kryssreagerte men strukturelt forskjellige molekyler (Crowley et al., 1998).

Forskjellige artikler har rapportert deteksjon av 3-NT med forskjellige derivatiseringsmetoder. En metode var å derivatisere 3-NT og tyrosin med trifluoractic anhydrid (TFAA) og trifluoretanol (TFE). Derivatene ble analysert ved hjelp av GC/MS (Yi et al., 2000). Produktet ble N-trifluoracetyl trifluorethyl ester av 3-NT (Figur 2.5.1 a).

Gaut et al (2002) brukte en metode som bestod av tre steg. Første steg bestod av derivatisering med dimetylformamid og diisopropyletylamin (DIPEA). I andre steg ble det tilsatt etyl heptafluorbutyrat og i det siste steget ble det tilsatt *N*-(*t*-butyldimetylsilyl)-*N*-metyltrifluoracetamid (MTBSTFA) og trimetylklorosilan (Figur 2.5.1 b). Derivatene ble analysert ved hjelp av GC/MS i NCI. Denne metoden var basert på artikkelen fra Frost et al (2000) som også analyserte 3-NT og tyrosin i NCI (Figur 2.5.1 c). En annen metode som har blitt rapportert er å derivatisere 3-NT med Pentafluorbenzyl bromid (PFBBBr) (Figur 2.5.1 d) (Jiang & Balazy, 1998). Crowley et al (1998) analyserte 3-NT i dens *n*-propyl heptafluorobutyryl (HFB) derivat med GC/MS (Figur 2.5.1 e). Produktet med denne metoden er *n*-propyl-tri-HFB og signalet for derivatene i kromatogrammet har blitt rapportert for å være 15 ganger sterkere enn *n*-propyl-HFB derivater (Tsikas & Duncan, 2014). Tyrosin og 3-NT har også blitt derivatisert til *n*-propyl TMS pentafluorpropionyl derivater (Figur 2.5.1 f). Analysemetoden som ble brukt var en GC/MS-MS (Schwedhelm et al., 1999). Söderling et al (2003) analyserte dimetyl-di-HFB derivatet til 3-NT ved hjelp av GC/MS-MS (Figur 2.5.1 g).



Figur 2.5.1 - Hovedderivatene av 3-nitrotyrosin og 3-aminotyrosin (fra redusert 3-nitro-tyrosin) rapportert for kvantitative analyser av 3-nitro-tyrosin i forskjellige biologiske prøver på GC/MS og GC-MS/MS i NCI.

I denne oppgaven ble tyrosin og 3-NT derivatisert med PFBBBr, *N,O*-bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), MTBSTFA og Heptafluorbutansyre anhydrid (HFBA) / Trimetylsilyldiazometan (TMSD).

De ulike metodene som er blitt nevnt over er alle blitt analysert i NCI. De ulike derivatiseringsreagensene, analysemetodene, konsentrasjon, LOD/LOQ og artikkel er nevnt i Tabell 2.5.1.

Tabell 2.5.1 – Oversikt over ulike derivatiseringsmetoder som er blitt testet for analyse av 3-NT. Alle analysemetodene ble analysert i NCI.

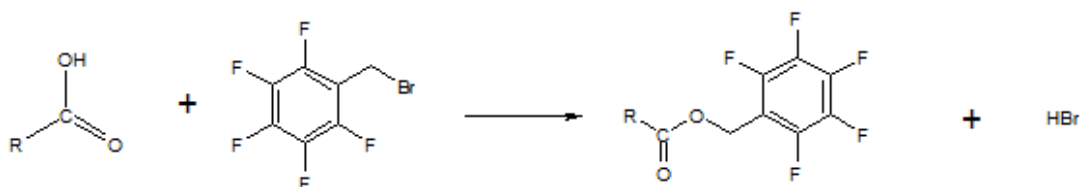
| Derivatiseringsreagenser | Konsentrasjon | Analysemetode | LOD/LOQ | Referanse |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------|---------------------------|
| TFAA/TFE | – ^a | GC/MS | 752 nM / – ^a | (Yi et al., 2000) |
| Dimetylforamide DIPEA Etyl HFB MTBSTFA | 11 nM | GC/MS | 6.5 nM / – ^a | (Gaut et al., 2002) |
| Dimetylforamide DIPEA Etyl HFB MTBSTFA | 6.4 nM | GC/MS | – ^a | (Frost et al., 2000) |
| PFBBBr | 6.2 pmol/mg ^b | GC/MS | 44 nM / – ^a | (Jiang & Balazy, 1998) |
| 1-propanol: HCl HFBA | – ^a | GC/MS | – ^a | (Crowley et al., 1998) |
| 1-propanol: HCl Pentafluoropropionic-anhydrid BSTFA | 2.8 nM | GC/MS-MS | 4 pM / 0.125 nM | (Schwedhelm et al., 1999) |
| HFBA TMSD | 0.74 nM | GC/MS-MS | 0.03 nM / 0.3 nM | (Soderling et al., 2003) |

^a Ikke oppgitt

^b målt i blodplater

Pentafluorbenzyl bromid (PFBBr)

PFBBr er en derivatiseringsreagens som har vært vellykket for å gi rikelig med karboksylat anioner i GC-NCI-MS (Jiang & Balazy, 1998).



Figur 2.5.2 - Reaksjonsmekanismen mellom karboksylsyre delen av aminosyren og PFBBr. Hvor PFB substitueres med hydrogenatomet og danner PFB-ester og HBr.

Derivatisering med PFBBr til dens PFB derivater (Figur 2.5.2) gir en meget sensitiv analyse med GC/MS i NCI, fordi den danner det sterkt intense anionet $[M - PFB]^-$. PFBBr er et allsidig derivatiseringsreagens og er egnet for mange forskjellige klasser av organiske forbindelser og mange uorganiske anioner (Tsikas et al., 2011). PFB består av mange fluoratomer som gir derivatet en sterk elektrontiltrekkende egenskap, og dermed høy følsomhet ved GC/MS-NCI analyse (Greibrokk et al., 1994). Derivatisering kan bli utført i både vandige faser, som uorganiske anion og som nitrat under et bredt pH område, og i vannfrie organiske løsemidler sånn som acetonitril. Derivatisering med PFBBr av stoffer, løst i et vannfritt organiskløsemiddel, er det nødvendig å bruke en base. Basen virke som en katalysator for reaksjonen med PFBBr og analytten (Tsikas et al., 2011).

N,O-bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) og

N-(*t*-butyldimetylsilyl)-*N*-metyltrifluoracetamid (MTBSTFA)

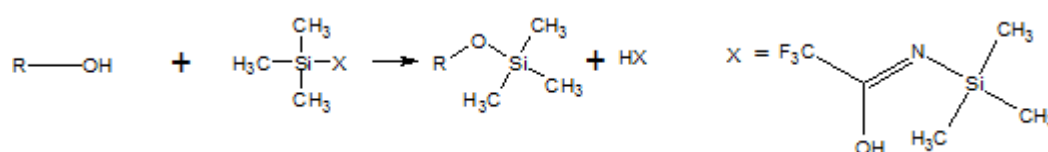
For å gjøre amino- og karboksyl-grupper på aminosyrer silylert i et enkelt steg kan BSTFA eller MTBSTFA brukes som derivatiseringsreagenser.

BSTFA har tidligere blitt brukt under klinisk diagnostikk for å modifisere organiske syrer og aminosyrer (Deng et al., 2002). Derivatene fra MTBSTFA er tert-butyl-dimethyl-silyl (TBDMS), som gir en høyere molekylvekt sammenlignet med TMS-derivater fra BSTFA. Den høye molekylvekten er grunnen til at TBDMS-derivatene tar lenger tid å eluere ut fra GC-kolonnen enn TMS-derivatene (Jimenez-Martin et al., 2012).

Derivatisering med MTBSTFA resulterer i mer stabile og enkle aminosyrederivater enn

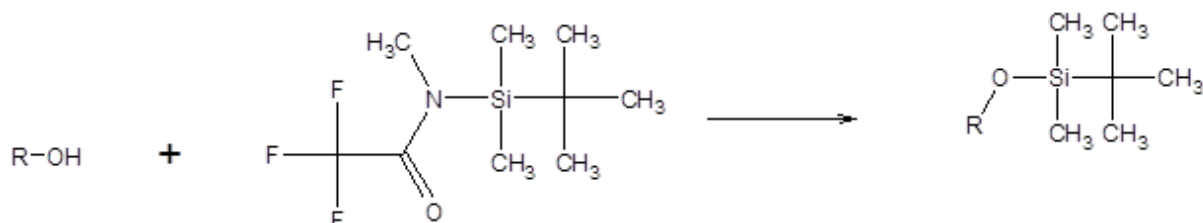
BSTFA, under mildere reaksjonsforhold (Deng et al., 2002). Fordelen med TBDMS-derivater i forhold til TMS er at de har en økt stabilitet mot fuktighet, hydrolyse, hydrogenolyse, mild reduksjon og oksidasjonsreaksjoner. Reaksjonen kan utføres i romtemperatur og tillater bruken av mildere betingelser under derivatiseringen. Mer basiske aminosyrer (lysin, arginin, histidin, glutamin og asparagin) er unntak; De trenger en katalysator som acetonitril for å bli derivatisert (Jimenez-Martin et al., 2012).

BSTFA reagerer med et aktivt hydrogenatom, som blir substituert med TMS fra BSTFA (Figur 2.5.3).



Figur 2.5.3 - Reaksjonsmekanismen mellom en hydroksylgruppe og BSTFA, som danner TMS-derivat.

Reaksjonsmekanismen for MTBSTFA går ut på at MTBSTFA reagerer med for eksempel hydroksylgruppen, hvor hydrogenatomet blir byttet ut med TBDMS (Figur 2.5.4).



Figur 2.5.4 - Reaksjonsmekanismen mellom MTBSTFA med en hydroksylgruppe, som danner TBDMS-derivat.

Fragmenteringsmønsteret for derivatisering med MTBSTFA har blitt rapportert i tidligere artikler (Deng et al., 2002; Kitson et al., 1996). m/z -verdiene for 3-NT og tyrosin ble funnet ut fra fragmenteringsmønsteret (Tabell 2.5.2).

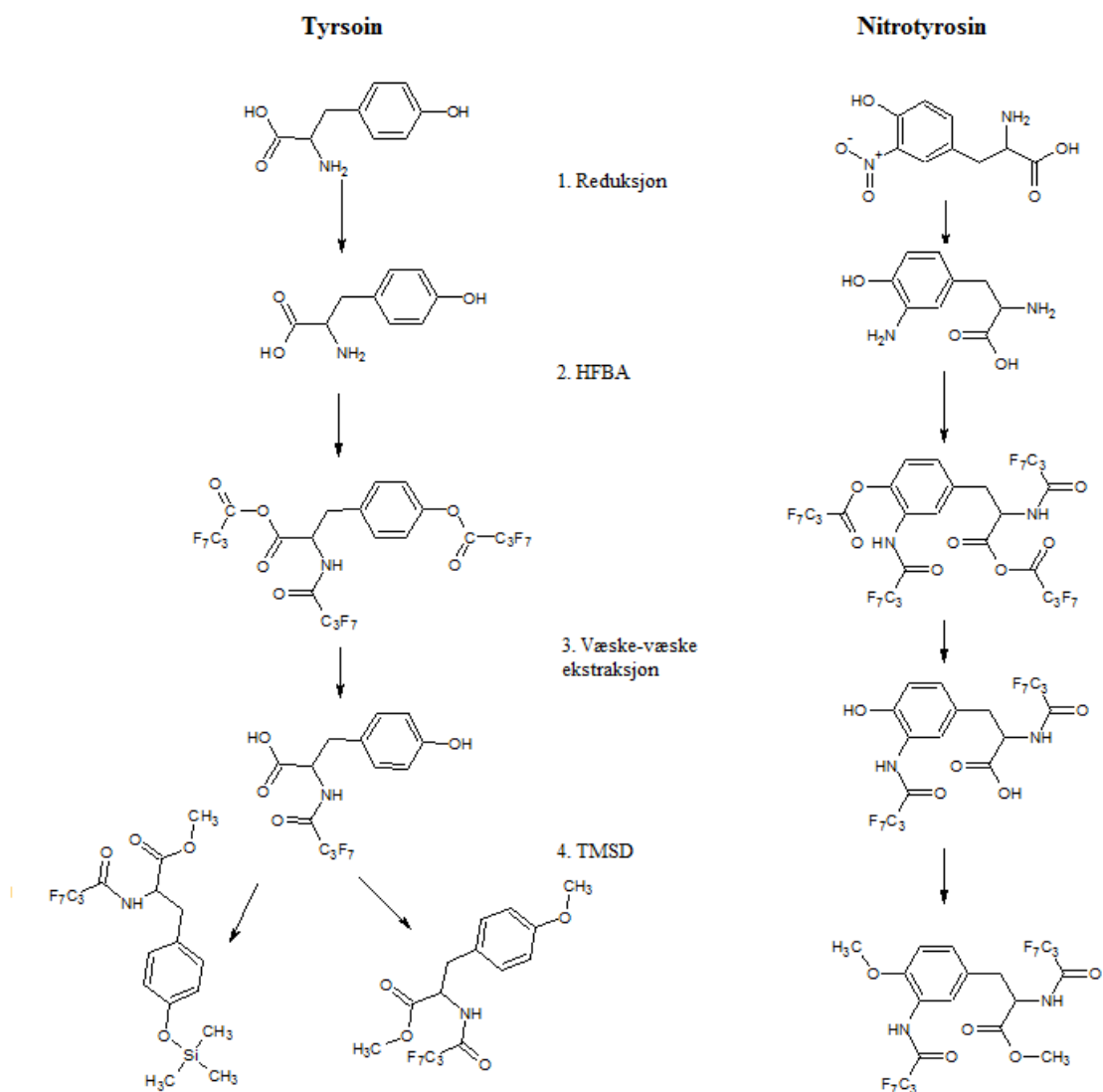
Tabell 2.5.2 - Oversikten av de mest vanlige m/z ionene for TMDS-derivater for 3-NT og tyrosin.

| m/z | Fragmentert vekk (Da) | Kjemisk gruppe |
|--------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 3-NT/tyrosin | | |
| 409/364 | - 159 | -C(O)-O-TBDMS |
| 483/ 438 | - 85 | -C ₄ H ₉ + CO |
| 511/466 | - 57 | -(C ₄ H ₉) |
| 553/ 508 | - 15 | -CH ₃ |

Tidligere artikler har testet derivatisering med BSTFA og MTBSTFA på seks forskjellige grupper av polare forbindelser. Resultatene viser at molekylmassen til de analyserte forbindelsene spiller en viktig rolle for derivatiseringen. Små forbindelser viser ingen viktig forandring i derivatiseringseffektivitet ved derivatisering med BSTFA eller MTBSTFA. Store molekyler produserer bare karakteristiske fragmenteringsmønster når dem blir derivatisert med MTBSTFA. Sterisk hindring spiller også en viktig rolle for derivatiseringen. Hvis forbindelsen har en sterisk hindring er derivatisering med BSTFA mer egnet. Forbindelser med en sterisk hindring, derivatisert med MTBSTFA, vil utbyttet av derivatene dramatisk bli redusert som vil resultere i en høy deteksjonsgrense (LOD) eller derivatiseringen kan bli inhibert (Schummer et al., 2009).

***O-O*-dimetyl-*N,N*-diheptafluorbutyryl-substitusjon**

Derivatisering med HFBA og TMSD er basert på at nitrogruppen blir redusert til amin ved hjelp av ditionitt (DTT). Amin- og hydroksyl-gruppen blir heptafluorbutyrylert med HFBA. For å fjerne HFB fra hydroksylgruppen ble en væske-væske ekstraksjon utført. Det siste derivatiseringstrinnet var O-metylering av de frie hydroksyl- og karboksyl-gruppene med TMSD (Figur 2.5.5). Tidligere artikler har rapportert at de mest karakteristiske m/z ionene for derivatiseringen er m/z 596 og m/z 576, som korresponderer til [M-HF]⁻ og [M-2HF]⁻ for 3-NT. For tyrosin er de mest vanlige ionene m/z 443 som er [M-HF]⁻ og m/z 371 som er [M - HF - SiCH(CH₃)₂]⁻ (Soderling et al., 2003).



Figur 2.5.5 - Reaksjonsmekanismen mellom HFBA/TMSD og tyrosin og 3-NT. Består av 4 steg, 1. redusering av 3-NT til 3-aminotyrosin, 2. derivatisering med HFBA, 3. Væske-væske ekstraksjon og 4. derivatisering med TMSD. Tyrosin får to produkter, et som blir metylert og et som blir silylert i steg 4.

2.6 Validering

Validering av en analysemetode gjøres med hensyn på flere parametere. Metoder som skal bli brukt til analysearbeid må valideres for å finne ut hvor pålitelig den er, om metoden er stabil over lenger tid og om resultatene ligger nær den sanne verdien av prøven. De ulike parametere for validering er nøyaktighet, presisjon, gjenfinning, LOD og dynamisk linearitet (Armbruster et al., 1994).

Nøyaktighet

Nøyaktigheten til en analysemetode blir evaluert med å beregne variasjonskoeffisient i prosent (CV) av minimum 3 måleparallelere av en prøve og for samme prøve over en lengre periode. Variasjonskoeffisienten er definert som standardavvik (SD) delt på middelveiden (gjennomsnitt)(Helbæk & Godejord, 2001). For at en metode skal være nøyaktig skal CV være lavest mulig. CV er veldig metodeavhengig, for noen metoder er CV < 5 % og for andre 15-25 %.

$$\% \text{ CV} = \frac{SD}{\text{Gjennomsnitt}} * 100 \% \quad (4)$$

Hvor,

CV er variasjonskoeffisienten i prosent

SD er standardavvik

Gjennomsnitt er middelveiden av analyseparallelene

Presisjon

Presisjonen av en analysemetode vil si hvor stabil metoden er over tid. Presisjonen kan måles ved dag til dag variasjon eller innenfor samme dag. Innenfor samme dag blir variasjonen målt med å analysere samme prøve i flere parallelere. Dag til dag variasjonen blir målt med å analysere samme prøve over flere dager.

Gjenfinning

Gjenfinning er et mål på hvor mye av kjent mengde av et stoff som blir tilsatt til en prøve som metoden klarer å kvantifisere.

$$\% \text{ Gjenfinning} = \frac{\text{Målt mengde analytt}}{\text{Tilsatt mengde analytt}} * 100 \% \quad (5)$$

Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

Den eksperimentelle metoden for å definere LOD består av å analysere en fortynningsrekke av en prøve hvor konsentrasjonen av analytten minker. Definisjonen på LOD er den laveste konsentrasjonen som kan detekteres og som har en signal-til-støy (S/N) verdi høyere enn 3. Signalet skal være minimum 3 ganger høyere enn bakgrunnsstøyen. LOD kan også beregnes med å bruke gjennomsnittsverdien av en rekke blanke prøver pluss 3 SD for den blankeprøven.

$$\text{LOD} = \text{Gjennomsnitt} + 3 * \text{SD} \quad (6)$$

Kvantifiseringsgrense (LOQ) er et mål som er satt høyere enn LOD og er beskrevet for å være $S/N = 10$. Den statistiske metoden for å beregne LOQ er definert som 10 SD over gjennomsnittlig verdi av blankprøve (Armbruster et al., 1994).

$$\text{LOQ} = \text{Gjennomsnitt} + 10 * \text{SD} \quad (7)$$

Linearitet

Lineariteten til en metode bestemmes ved å analysere ulike konsentrasjoner av analytten. Målingspunktene blir plottet og det blir laget en kalibreringskurve. Ut fra kalibreringskurven blir det trukket en trendlinje gjennom målepunktene. Ligningen til trendlinjen blir beregnet fra et dataprogram og regresjonskoeffisienten (R^2) blir funnet. R^2 sier noe om hvor bra trendlinjen treffer målepunktene og skal være nærmest 1 som mulig. Ligning for trendlinjen brukes for å beregne konsentrasjonen av analytten i prøven.

3 Materialer og metoder

For å kunne analysere tyrosin og 3-NT fra plasma, må plasmaet bli renset/ekstrahert. Metodene som ble testet for opprensing var SPE og ultrafiltrering. For å kunne analysere tyrosin og 3-NT ved hjelp av GC/MS, må aminosyrene derivatiseres. Forskjellige derivatiseringsteknikker ble testet og derivatene ble analysert på GC/MS i både NCI og EI.

3.1 Kjemikalier

1. Aceton, 100% for HPLC (Fisher chemical, UK)
2. Acetonitril > 99.9%, LC-MS grad (Fisher chemical, UK)
3. Ammonium, 25% (Merck KGaA, Germany)
4. Ammonium acetat, 98% for molekylær biologi
5. *N,O*-bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid, derivatiseringsgrad (Supelco)
6. Diklormetan, 99.5% for analyse (Merck KGaA, Germany)
7. Di-natrium hydrogenfosfat, 99% (Sigma-Aldrich)
8. Eddiksyre, 100%, for GR analyse (Merck KGaA, Germany)
9. Etylacetat, 99.9%, (VWR, prolabo chemicals)
10. Fosfat Bufret Saltvann (Termo scientific)
11. HCl, 37% (VWR, prolabo chemicals)
12. Heptafluorbutansyreanhydrid $\geq 99.0\%$, for GC derivatisering (Sigma-Aldrich)
13. *L*-4-Hydroksyfenyl- d_4 -alanin 99.1% atom % D (CDN isotopes, Canada)
14. *L*-tyrosin min 99% (Merck, Germany)
15. Metanol, >99.9% LC-MS grad (Fisher chemical, UK)
16. Metyl-*t*-butyleter, 99.5% HPLC grad (VWR, prolabo chemicals)
17. Natriumhydrosulfitt, 85% (Sigma-Aldrich)
18. 3-nitro-*L*-tyrosin- d_3 (Toronto research chemicals inc, Canada)
19. 3-nitro-*L*-tyrosin >98% (Carl Roth GmbH)
20. *N*-tert-Butyldimetylsilyl *N*-metyltrifluoracetamid, for syntese (Merck KGaA, Germany)
21. Pyridin, vannfri 99.8% (Sigma-Aldrich)
22. Toluen, 100%, analaR Normapur (VWR, prolabo chemicals)
23. Trifluoreddiksyre >99.8% (Merck KGaA, Germany)
24. Trimetylsilyldiazonmetane løsning, 2.0 M i heksan (Sigma-Aldrich)

Destillert vann ble brukt for alle løsningene.

Ammoniumacetat buffer (2 mM):

153 mg ammoniumacetat ble veiet inn, løst i vann, justert til pH 4 med konsentrert HCl og justert til sluttvolum 1 liter.

Di-natriumhydrogenfosfat buffer (50 mM):

7.1 g di-natriumhydrogenfosfat ble veiet inn, løst i vann, justert til pH 9 med konsentrert NaOH og justert til sluttvolum 1 liter.

Natriumditionitt løsning (50 mM):

1 g av natriumditionitt ble veiet inn og løst i 100 ml di-natriumhydrogenfosfat.

PBS buffer (0.1 mM):

En pakke fosfat bufret saltvann (PBS) ble løst i 500 ml vann.

Løsninger av tyrosin og 3-NT ble laget i vann. Tyrosin og 3-NT ble forsøkt å løse i andre løsemidler som metanol, ammoniumacetat buffer, PBS, acetonitril, toluen og pyridin.

3.2 Plasmaprøve

Plasmaprøve til metodeutvikling og validering ble tatt fra en frisk 23 år gammel dame. Plasma ble tappet på etylendiamintetraacetat (EDTA) glass (9 ml), sentrifugert på 2500 g i 20 minutter på 4 °C. Plasma ble blandet og fordelt på eppendorfrør og lagret på -80 °C frem til bruk.

3.3 Fastfase ekstraksjon

3-NT og tyrosin ble ekstrahert fra plasma med SPE. Fire forskjellige SPE-kolonner ble testet for optimal ekstraksjon, ved bruk av ulike kombinasjoner av løsemidler for vask, kondisjonering og eluering (Tabell 3.3.1). For mer utfyllende tabell med de ulike kombinasjonene testet for hver av de fire kolonnene, se Vedlegg A.

Tabell 3.3.1 - SPE prosedyrer for de ulike SPE-kolonnene som ble testet med forskjellige kombinasjoner av løsninger for, vask, kondisjonering og eluering. Metanol og trifluoreddiksyre (TFA) ble løst i vann. Kondisjoneringssteget ble alltid gjennomført med 2 ml metanol og 2 ml H₂O.

| SPE steg | Bond Elut C18 ^a | Discovery DSC-18 ^b | Strata X-C ^c | Strata X ^d |
|---------------------|---------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1: Kondisjonering | 6 ml eddiksyre (0.1%) | 6 ml 0.1% TFA (pH 5) | 2 ml 1% TFA (pH 3) | 3 ml 0.1% TFA (pH 2) |
| 2: Prøve tilsetning | 3 ml tyrosin i PBS buffer | 3 ml tyrosin i PBS og 1% TFA (3:2) | 200 µl plasma og 1 ml 1% TFA | 200 µl plasma, 450 µl vann, 450 µl 1% TFA |
| 3: Vask | Ikke utført | 3 ml 0.1% TFA | 3 ml 1% TFA / 25% metanol (3:1) | 1.5 ml 0.1% TFA |
| 4: Eluering | 3 ml 25% metanol | 2 ml 25% metanol | 1.5 ml 5% NH ₄ OH i 25% metanol | 1.5 ml MeOH/H ₂ O (1:1, v/v) |

^aBond elut C18 (200 mg, 3 ml, Varian)

^bDiscovery DSC-18 (500 mg, 3 ml, Supelco)

^cStrata X-C, kation mixed-mode polymer (60 mg, 3 ml, Phenomenex)

^dStrata-X polymeric sorbent (60 mg, 3 ml, Phenomenex)

Eluerte løsemidler (prøveløsning, vaskeløsning og slutteluatet) ble målt med et UV-spektrofotometer (UV-1700 PharmaSpec, Shimadu) ved bølglengde 223, 275 (nøytrale) og 293 cm⁻¹ (basisk) for tyrosin og 357 og 235 cm⁻¹ for 3-NT som en semikvantitativ måling av 3-NT og tyrosin innhold.

De forskjellige parameterne som ble endret for de forskjellige kolonnene er:

Discovery DSC-18 (Supelco)

Prosedyren for kolonnen Bond elut (Tabell 3.3.1) ble også testet for Discovery DSC-18, for å teste hvilken kolonne som er best egnet for separasjon av tyrosin og 3-NT.

Ekstraksjon ved Discovery DSC-18 kolonnen ble optimalisert og ble tatt utgangspunkt i metoden fra Frost et al (2000) med endringer i prøveløsningen (steg 2) og vaskeløsningen (steg 3).

Prøveløsningen (steg 2) ble endret med å tilsette 3 deler med 1% TFA og 2 deler tyrosin i PBS buffer. Det ble også testet med å tilsette tyrosin i PBS buffer uten å justere pH.

Forskjellige vaskeløsninger ble testet (steg 3); TFA (1, 0.5 og 0.05%), 1:10 ammoniumacetat: H₂O (pH 4) og H₂O.

Strata X-C, kation mixed-mode polymer (phenomenex)

Det ble forsøkt alternative vaskeløsninger; 100% metanol, 100% aceton, 0.01% HCl i 100% metanol, 0.1 M HCl i 100% metanol og 0.5% TFA i 100% metanol.

Eluatet fra Strata X-C ble forsøkt nøytralisert ved å justere pH til 7 ved hjelp av HCl.

Strata-X, polymer sorbent (Phenomenex)

Forskjellige konsentrasjoner av TFA og dermed endring i kondisjoneringsløsningens pH-verdi ble testet (pH 2-5, steg 1).

Forskjellige konsentrasjoner av TFA og dermed endring i prøveløsningens pH-verdi ble testet (pH 2-5, steg 2).

Forskjellige konsentrasjoner av metanol i TFA ble testet for vaskeløsning (10, 5 og 1%, steg 3).

Forskjellige elueringsvolumer ble testet (3 ml og 1.5 ml, steg 4). Forsøkene ble utført i triplikat (1.5 ml) og kvadruplikat (3 ml).

3.4 Ultrafiltrering

3-NT og tyrosin fra plasma ble rensert med ultrafiltrering. Dette ble utført ved å tilsette 3 µl d₃-3-NT (1mg/L) til 500 µl av EDTA plasma fortynnet 1:1 i PBS buffer. Ultrafiltreringsrør (Biomax – 10K NMWL membran 0.5 ml vol) ble først sterilisert/vasket med metanol og ble så vasket med 500 µl PBS buffer før plasmaprøvene ble tilsatt. Prøvene ble sentrifugert (60 min, 10000 g, 4 °C) og filtratet ble så fordelt på tre 1.6 ml mikrosentrifuge rør (100 µl i hver).

3.5 Derivatisering

Derivatene av 3-NT og tyrosin ble analysert ved hjelp av GC/MS. For å analysere 3-NT og tyrosin på GC/MS var det nødvendig med derivatisering, slik at de kunne bli detektert.

Derivatiseringsreagensene som ble testet for tyrosin og 3-NT var PFBBBr, BSTFA, MTBSTFA og HFBA/TMSD.

3.5.1 Pentafluorbenzylbromid (PFBBBr)

Den første derivatiseringsmetoden ble utført med utgangspunkt i metoden beskrevet i Jiang et al (1998) unntatt opprensingssteget ved hjelp av HPLC som brukt hos Jiang. 200 µl 3-NT og tyrosin løst i acetonitril (0,25 mg/l), ble tilsatt 40 µl av 10% PFBBBr i acetonitril og 40 µl av 10% DiPEA i acetonitril. Løsningen ble vortexet og varmet på 70 °C i 40 minutter.

Overskudd reagenser og biprodukter ble fjernet ved inndamping og PFB-derivatene ble løst i 1 ml metyl-*t*-butyleter (MTBE).

PFB-derivatene ble tilsatt 1% BSTFA i MTBE og ble varmet på 70 °C i 40 minutter og i 60 minutter.

3.5.2 *N, O*-bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)

Derivatisering av 3-NT og tyrosin med BSTFA ble testet med forskjellige kombinasjoner av BSTFA og katalysatorer (Tabell 3.5.1). Derivatene fra forsøk 1-5 ble analysert ved GC-NCI-MS, mens derivatene fra forsøk 6 og 7 ble analysert ved GC-EI-MS.

Tabell 3.5.1 - Ulike derivatiseringsforsøk som ble testet ut på 3-NT og tyrosin med BSTFA. Mengde BSTFA, katalysatorer, reaksjonstemperatur og reaksjonstid er testet.

| Forsøk | BSTFA (μ l) | Katalysator 1 | Katalysator 2 | Oppvarming ($^{\circ}$ C) | Reaksjonstid (minutt) |
|--------|---------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 1 | 10 | 10 μ l 1% BSTFA i MTBE | - | 70 | 150 |
| 2 | 10 | 90 μ l 1% BSTFA i MTBE | 10 μ l TFA | 70 | 24 timer |
| 3 | 100 | 900 μ l pyridin | - | 70 | 30 |
| 4 | 50 | 50 μ l pyridin | - | 70 | 60 |
| 5 | 50 | 50 μ l acetonitril | - | 70 | 60 |
| 6* | 100 | - | - | 60 | 30 |
| 7* | 100 | - | - | 60 | 60 |
| 8 | 100 | 250 μ l acetonitril | 650 μ l MTBE | 60 | 60 |

*forsøkene ble utført på 3-NT og tyrosin løst i pyridin, ble ikke tilsatt katalysator i disse prøvene.

For å se om BSTFA fungerte som reagenset skulle, ble to benzosyrer forsøkt silylert (Nilsen, 2010). 1 μ l av 3,4-dihydroksybenzoesyre og 4-hydroksybenzoesyre ble overført til prøverør og det ble tilsatt 100 μ l BSTFA, 250 μ l acetonitril og 650 μ l MTBE. Løsningen ble oppvarmet på 60 $^{\circ}$ C i 60 minutter.

3.5.3 *N*-(*t*-butyldimetylsilyl)-*N*-metyltrifluoroacetamid (MTBSTFA)

Derivatisering med MTBSTFA ble utført med utgangspunktet i metoden til Deng et al (2002) med noen forandringer. 1ml av 3-NT og tyrosin løst i H₂O (20 mg/l) ble tilsatt til en 2 ml glassflaske og ble dampet inn til tørrhet under vakuu. 100 μ l MTBSTFA/acetonitril (1:1, v/v) ble tilsatt det tørre stoffet, vortex og varmet på 60 $^{\circ}$ C i 30 minutter. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under vakuu og løst opp i 200 μ l MTBE.

For optimalisering av metoden, følgende parametere ble testet:

- MTBSTFA ble testet i ulike konsentrasjoner 15, 20, 25, 30 og 35% i acetonitril, i tillegg til den originale 50% konsentrasjonen. Prøvene ble analysert i triplikater.
- Derivatiseringstemperaturer på 60, 90 og 120 °C. 60 og 90 °C ble analysert i triplikater, mens 120 °C ble analysert i duplikat.
- Reaksjonstiden ble testet med 30, 60, 90 og 120 minutter.
- GC/MS-temperaturer: Ionekilde ble endret fra 200 til 210 °C, injektortemperatur og interfacetemperatur ble endret fra 250 til 280 °C.
- Natriumsulfat ble tilsatt prøver for å se om det var mer vann igjen i glassflasken etter inndamp.
- Utvidet inndampingstid i det siste steget.
- Reduksjon av 3-NT til amino-tyrosin.
- Løsemiddel for derivatiseringen, acetonitril, MTBE, metanol, etyl acetat og diklormetan.

En annen metode som ble utført med MTBSTFA var; 100 µl tyrosin og 3-NT løst i vann (20 mg/L) ble dampet inn til tørrhet og ble tilsatt MTBSTFA (10%), acetonitril (25%) og MTBE (65%). Løsningen ble varmet på 60 °C i 60 minutter, dampet inn til tørrhet og løst opp i 100 µl acetonitril.

Derivatisering av 3-NT og tyrosin med BSTFA og MTBSTFA ble også testet med fastfase analytisk derivatisering (SPAD). Prinsippet går ut på å derivatisere aminosyrene rett på SPE kolonnen slik at ferdig derivater av 3-NT og tyrosin blir eluert ut og kan analyseres rett på GC/MS.

3.5.4 Heptafluorbutansyreanhydrid (HFBA) og Trimetylsilyldiazometan (TMSD)

Derivatisering med HFBA og TMSD er basert på metoden fra Söderling et al (2003), med noen endringer. Prosedyren bestod av 4 steg, hvor steg 1 var et reduksjonssteg. En alikvote på 100 µl prøve (i et 1.6 ml mikro-sentrifuge rør) ble tilsatt 20 µl av 50 mM DTT-løsning som ble fortynnet i en 50 mM di-natriumhydrogenfosfat buffer, pH 9. Prøven ble blandet og dampet inn til tørrhet under vakuum. Det andre steget var et derivatiseringssteg, hvor det tørre stoffet ble løst 300 µl av 10% HFBA i acetonitril (v/v) og ble sonikert i 30 minutter.

Overskudd reagenser og løsemiddel ble fjernet ved inndamping under vakuum. Det tredje steget var væske-væske ekstraksjon. Prøven ble tilsatt fire deler diklormetan og en del 0.5 M

HCl og glassflaskene ble rotert (360 °) i 30 minutter. Flaskene ble sentrifugert (1 min, 3000 rpm) og 750 µl av den nederste fasen (organiske fase) ble pipettert over til en annen flaske og dampet inn til tørrhet under vakuum. Derivatet ble løst i 100 µl av en metanol-toluen løsning (4:1, v/v). Det siste og fjerde steget var metylering. 20 µl TMSD ble tilsatt prøven og reaksjonen stod i romtemperatur i 10 minutter før den ble stoppet ved inndamping. Derivatene ble løst opp i 100 µl acetonitril.

For å optimalisere metoden, ble følgende parametre testet ut:

- Reduksjonssteget (steg 1) ble utført på 60 °C i 15 minutter og ved å la løsningen stå i romtemperatur i 15 minutter.
- Sonikering (steg 2) ble utført ved 40 °C og 25 °C.
- Metyleringssteget (steg 4) ble utført ved sonikering i 10 minutter.

Plasmaprøver og løsninger av tyrosin og 3-NT i vann, derivatisert med HFBA/TMSD, ble tilsatt internstandard løst i H₂O (1 mg/L), d₃-3-NT og d₄-tyrosin. Internstandard ble tilsatt i starten av prøveopparbeidingen, før opprensing på SPE. Internstandard er et stoff som med kjent mengde blir tilsatt en prøveløsning for å korrigere for tap ved prøveopparbeidingen, endringen i injisert volum eller endringen under kromatografisk analyse (Greibrokk et al., 1994).

3.6 Gasskromatografi / massespektrometri analyser

GC/MS analysene ble utført på GCMS-QP2010 (Shimadzu). Helium ble brukt som bæregass med et konstant trykk på 26.7 kPa. Prøven (1 µl) ble injisert på en RXI-5 Silms kolonne (Restek, Teknolab AS), (30.0 m lang, 0.25 µm filmtykkelse og en diameter på 0.25 mm).

De forskjellige derivatene ble analysert med forskjellige GC/MS innstillinger og programmer:

Pentafluorbenzyl derivater

Analyser av PFB-derivater ble analysert i NCI med bruk av metan som kjemisk ioniseringsgass og med en total analysetid på 24 minutter (Tabell 3.6.1).

Injektor-, ionekilde- og interface-temperatur ble satt til 250, 200 og 250 °C. Derivatene av 3-NT og tyrosin ble tatt opp i full scan fra m/z 45 til m/z 850 med en scan hastighet på 0.3 s per ion.

Tabell 3.6.1 - GC/MS program for PFB-derivater

| Økning (°C/min) | Temperatur (°C) | Holdetid (min) |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| - | 50 | 1 |
| 25 | 120 | 0 |
| 15 | 330 | 3 |

Trimetylsilyl-derivat

Analyse av TMS-derivater ble analysert i NCI og EI. NCI temperaturprogrammet var likt som beskrevet for PFBBr og EI programmet var like som beskrevet i MTBSTFA.

t-butyldimetylsilyl-derivater

GC/MS-analyser av TBDMS-derivater ble analysert i EI. Prøvene ble først analysert i full scan og deretter i SIM med m/z ionene 466, 438 og 364 for tyrosin og 511, 483 og 409 for 3-NT. Ionet 302 ble også brukt for å identifisere tyrosin og 3-NT.

TBDMS-derivater ble analysert i Scan og SIM med samme temperaturprogram (Tabell 3.6.2).

Tabell 3.6.2 - GC/MS program for TBDMS-derivat

| Økning (°C/min) | Temperatur (°C) | Holdetid (min) |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| - | 50 | 5 |
| 25 | 120 | 1 |
| 15 | 330 | 6 |

Injektor-, ionekilde- og interface-temperatur ble programmert til 250, 200 og 250 °C.

Derivatene av 3-NT og tyrosin ble tatt opp i full scan fra m/z 45 til m/z 850 med en scan hastighet på 0.3 s per ion. I SIM ble utvalgte m/z verdier ble tatt opp med en scan hastighet på 0.3 s per ion.

Temperaturen for injektor, ionekilde og interface ble endret til 280, 280 og 210 °C for å se om metoden ble mer sensitive.

***O,O*-dimetyl-*N*-heptafluorbutyryl-derivater**

GC/MS analyser av tyrosin, 3-NT og internstandarden d_3 -3-NT derivatisert med HFBA/TMSD ble utført i NCI. Prøvene ble først analysert i Scan og deretter i SIM med m/z ionene 576 og 596 for 3-NT, 579 for d_3 -3-NT og 443 og 371 for tyrosin. Det ble brukt to forskjellige GC/MS programmer for analysene (Tabell 3.6.3 og Tabell 3.6.4). Hvor det første programmet (Tabell 3.6.3) tar kortere tid for å komme til slutttemperaturen 320 °C enn det andre programmet (Tabell 3.6.4). Injeksjon-, ionekilde- og interface-temperatur ble holdt konstant i de to programmene (250, 180 og 260 °C). Derivatene av 3-NT og tyrosin ble tatt opp i full scan fra m/z 45 til m/z 850 med en scan hastighet på 0.3 s per ion. I SIM ble utvalgte m/z verdier ble tatt opp med en scan hastighet på 0.3 s per ion.

Tabell 3.6.3 - GC/MS program nummer 1 for *O,O*-dimetyl-*N*-heptafluorobutyryl-derivater.

| Økning (°C/min) | Temperatur (°C) | Holdetid (min) |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| - | 70 | 1 |
| 25 | 120 | 0 |
| 15 | 320 | 5 |

Tabell 3.6.4 - GC/MS program nummer 2 for *O,O*-dimetyl-*N*-heptafluorobutyryl-derivater.

| Økning (°C/min) | Temperatur (°C) | Holdetid (min) |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| - | 70 | 1 |
| 25 | 120 | 0 |
| 10 | 320 | 5 |

3.7 Statistikk

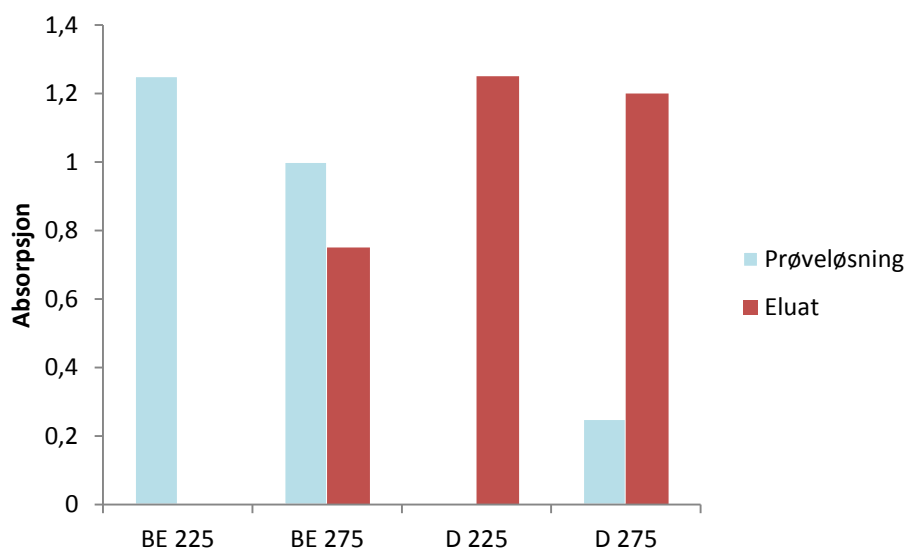
Prøvene ble analysert i triplikater eller kvadruplikater og det ble beregnet gjennomsnitt, SD og CV av resultatet. Beregningene ble gjort ved hjelp av Excel. For å avgjøre om to ulike forsøk er signifikant forskjellige ble brukt en parret t-test med 95 % signifikansnivå (Helbæk & Godejord, 2001).

4 Resultat og diskusjon

Ekstraksjon av 3-NT og tyrosin fra plasma og vannprøver ble utført ved hjelp av ulike SPE-kolonner og variasjon i SPE prosedyrene. Spektrofotometri ble brukt som et enkelt semikvantitativt mål på hvor i prosessen 3-NT og tyrosin ble eluert. For å måle utbytte av hele prøveprepareringsprosessen, som inkluderer SPE, inndamping og derivatisering, ble de ferdige derivatene analysert ved hjelp av GC/MS.

4.1 Fastfase ekstraksjon

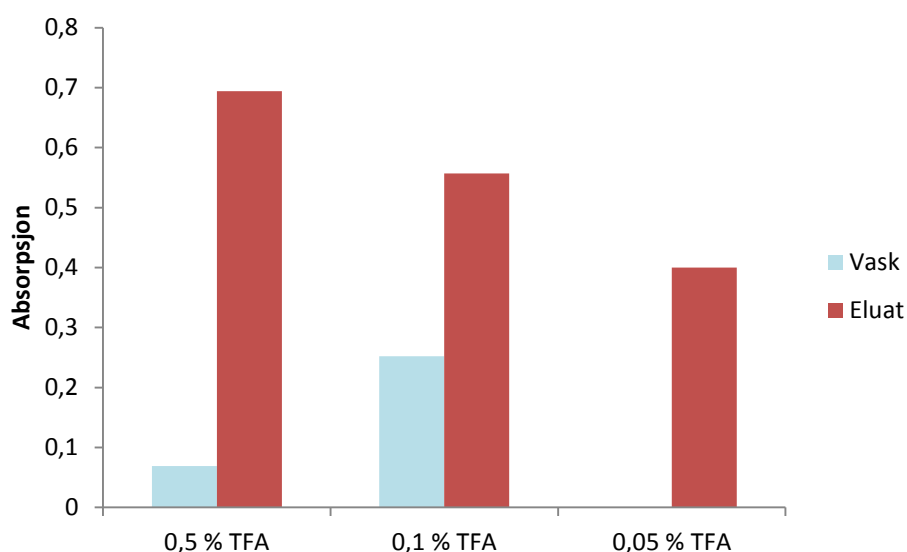
I de innledende forsøkene ble samme SPE-prosedyren utført på kolonnene Bond elut C18 og Discovery DSC-18, for å sammenligne to C18 kolonner. Tyrosin ble retadert og eluert ut. Vurdert ved hjelp av spektrofotometri ble absorpsjonen høyere for tyrosin med Discovery DSC-18 enn Bond elut C18 (Figur 4.1.1). Med Discovery DSC-18 som SPE kolonne ble tyrosin retadert og eluert i rett fase. Ved bruk av Bond elut som SPE kolonne, ble mesteparten av tyrosin eluert ut med prøveløsningen og bare en liten andel ble retadert og eluert i rett fase. Spektrofotometeret ble innstilt på to bølgelengder som var karakteristisk for tyrosin, 225 og 275 cm^{-1} . Tyrosin ble ikke eluert i vaskeløsningen for noen av kolonnene. Ut fra resultatene ble det bestemt å fortsette og forbedre metoden for Discovery DSC-18 som ekstraksjonsmetode.



Figur 4.1.1 - Absorpsjon av tyrosin ved bølgelengde 225 cm^{-1} og 275 cm^{-1} i prøveløsningen og eluatet. Tyrosin ble rensert på 2 forskjellige kolonner, Bond Elut C18 (BE) og Discovery DSC18 (D). Det var ingen absorpsjon i vaskeløsningen.

Ekstraksjon med Discovery DSC-18

Tyrosin og 3-NT ble ekstrahert fra surgjort vannløsning (1% TFA, pH 3), kolonnen ble vasket med 0.1% TFA og eluert med 25% metanol. Det mest utfordrende steget var vaskingen. Ved bruk av 10% ammoniumacetat i H₂O (pH 4) og H₂O ble tyrosin og 3-NT vasket ut av kolonnen før elueringstrinnet. Ved ulik konsentrasjon av TFA (0.5, 0.1 og 0.05%) ble tyrosin og 3-NT retardert. Den mest optimale konsentrasjonen av TFA i vaskeløsningen var 0.5% (Figur 2.1.1). Vask med 0.05% TFA ga ingen absorpsjon av tyrosin i vaskeløsningen, men absorpsjonen i eluatet var lav i forhold til de andre konsentrasjonene.

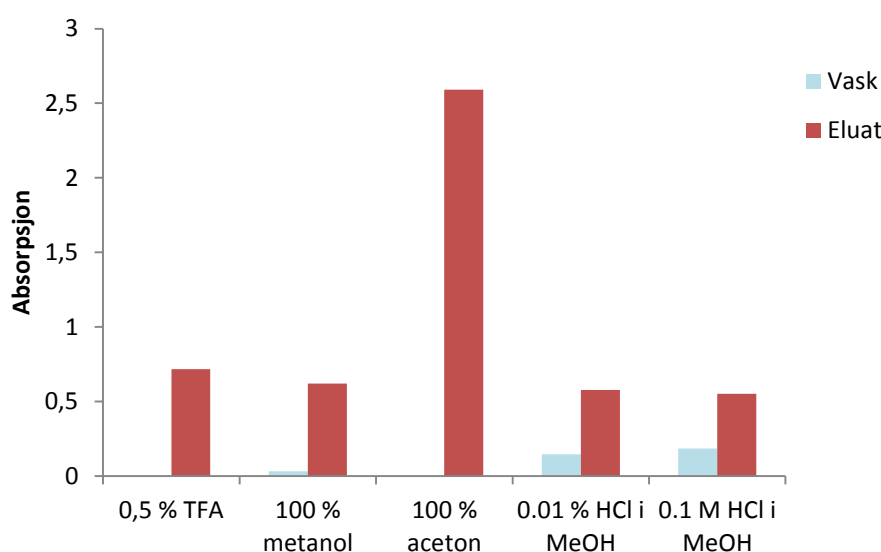


Figur 4.1.2 - Absorpsjonen ved bølglengde 223 cm⁻¹ av tyrosin absorbert i vaskeløsningen og eluatet. Ulik konsentrasjon av TFA (0.5, 0.1 og 0.05%) ble testet for vaskeløsning for SPE kolonnen Discovery DSC18. Tyrosin ble eluert med samme løsning i alle forsøkene og ingen absorpsjon ble detektert i prøveløsningen.

Retensjonsmekanismen for C18 silika sorbent består av Van der Waals krefter, hydrogenbindinger eller dipol-dipol interaksjoner. Polymerisk sorbent har et større stabilt pH-område enn C18 og har en bedre overflate på grunn av styrene-divinylbenzen polymeren. Fordelen med polymerisk sorbent er at den danner selektive π - π bindinger med analytter som inneholder aromatisk ring (Michalkiewicz et al., 2008). Siden tyrosin og 3-NT inneholder en aromatisk ring ble det bestemt å bytte til en polymerisk SPE kolonne. Den polymeriske kolonnen som ble brukt var Strata X-C.

Ekstraksjon med Strata X-C

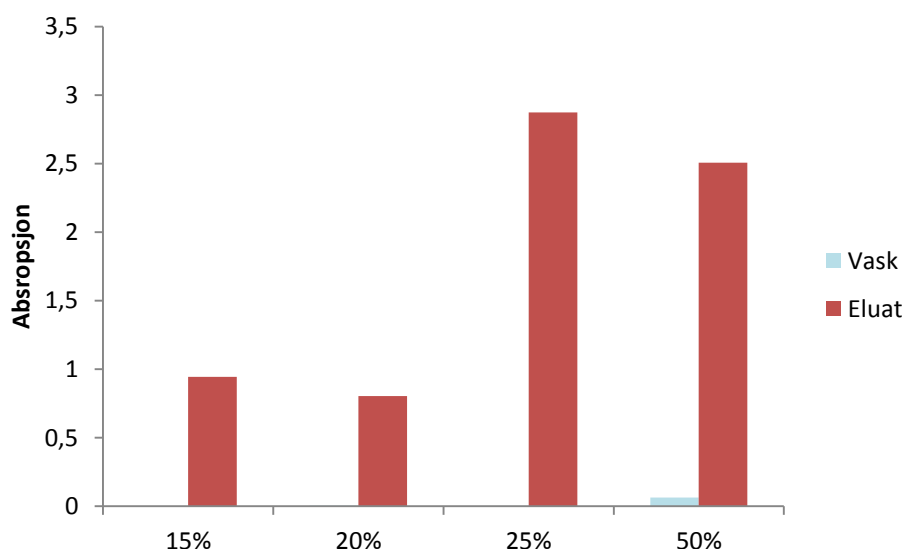
Tyrosin løst i vann ble ekstrahert på Strata X-C med en prøveløsning som bestod av 3 deler tyr i vann og 2 deler 1% TFA i vann. Vaskeløsningen var 0.5% TFA i vann og tyrosin ble eluert med 5% NH₄OH i 25% metanol. Det mest krevende steget var vaskingen, forskjellige kjemikalier ble testet ut. Ved metanol ble en liten del av tyrosin vasket ut. Ved aceton og metanol med ulik konsentrasjon av HCl (0.01% og 0.1 M) resulterte i at tyrosin ble vasket ut. Den mest optimale vaskeløsningen for tyrosin løst i vann var med 0.5% TFA i vann (Figur 4.1.3). Selv om vasking med aceton ga en høy absorpsjon for eluatet, var ikke absorpsjonen stabil over tid og varierte mye. Referanseprøven ble aldri 0, så resultatene var upålitelige.



Figur 4.1.3 - Absorpsjon ved 233 cm⁻¹ av tyrosin løst i vann med forskjellige vaskeløsninger. Ekstraksjon av tyrosin løst i vann ble vasket med: 0.5% TFA, 100% metanol, 100% aceton, 0.01% HCl i metanol og 0.1 M HCl i metanol.

En blanding av tyrosin og 3-NT løst i vann ble ekstrahert med en prøveløsning som bestod av 3 deler tyrosin/3-NT i vann og 2 deler 1% TFA i vann. Vaskeløsningen var 25% metanol og 75% av 1% TFA i vann og tyrosin/3-NT ble eluert med 5% NH₄OH i 25% metanol.

Forskjellige konsentrasjoner av metanol (15, 20, 25 og 50%) ble testet for å finne den mest optimale konsentrasjonen av metanol for vasking (Figur 4.1.4). Resultatet viste at 25% metanol ga den høyeste absorpsjonen i UV-spekteret.



Figur 4.1.4 - Absorpsjon ved 223 cm^{-1} av tyrosin og 3-NT i vaskeløsningen og eluatet, vasket med forskjellige konsentrasjon av metanol (15, 20, 25 og 50%). Vaskeløsningen bestod også av 1% TFA i vann.

Tyrosin og 3-NT ble ekstrahert fra plasma med bruk av: en prøveløsning som bestod av 200 μl plasma og 1 ml 1% TFA (pH 3), vaskeløsning bestod av 3 deler 0.1% TFA og 1 del 25% metanol og eluering med 5% NH_4OH i 25% metanol.

Inndamping av 3 ml eluat var veldig tidskrevende. Derfor ble det testet for å se om mindre elueringsvolum gav den samme intensiteten. Inndamping av 3 ml eluat tok 225 minutter, mens inndamping av 1.5 ml eluat tok 120 minutter. Eluering med 1.5 ml ga en lavere intensitet enn 3 ml (Tabell 4.1.1), men til tross for lavere utbytte ble eluering med 1.5 ml brukt for videre analyser.

Tabell 4.1.1 - Intensiteten (gjennomsnitt \pm SD) av 1.5 ml (n = 3) og 3 ml (n = 4) eluat av plasma renses på Strata-X-C. m/z ionene 443 og 371 ble brukt for å detektere tyrosin i kromatogrammet.

| | Eluering volum | |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| | 1.5 ml (n=3) | 3ml (n=4) |
| | Gjennomsnitt \pm SD | Gjennomsnitt \pm SD |
| m/z 443 | 19069 \pm 8846 | 33719 \pm 10580 |
| m/z 371 | 11190 \pm 7546 | 11778 \pm 8718 |

Eluering med 1.5 ml ga lavere utbytte enn med 3 ml, eluering med 1.5 ml ble allikevel brukt for å spare tid. Inndamping på $50\text{ }^\circ\text{C}$ av prøver som inneholder mye H_2O tar lang tid å dampe

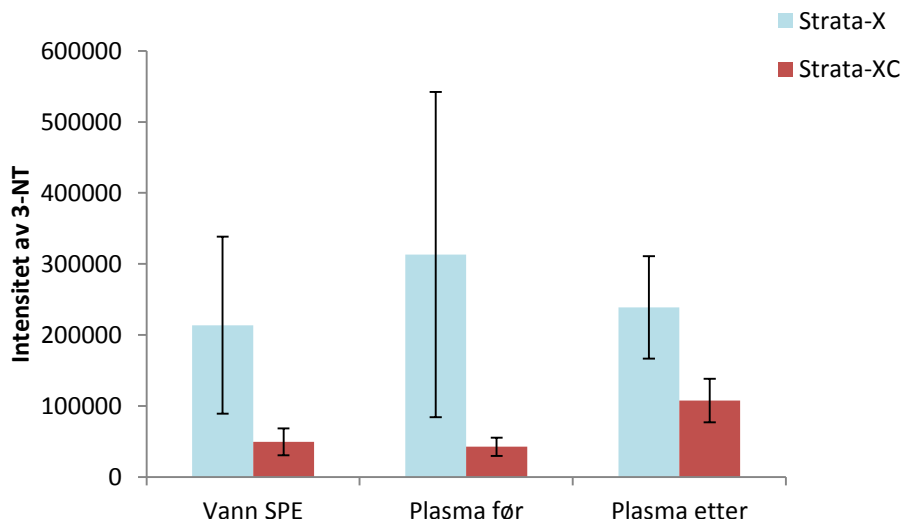
inn. Bruken av høyere temperatur ved inndamping kunne blitt utført, men 50 °C er en mildere temperatur for reaksjonen.

Derimot gav derivatene av fritt 3-NT i plasma, som ble rensset med Strata X-C, et lavere utbytte i forhold til standardkurven. En av grunnene for lavere utbytte kan være at elueringsløsningen, NH₄OH, reagerer med derivatiseringsreagensene slik at utbyttet blir lavt. Eluatet av tyrosin 3-NT ble forsøkt nøytralisert med HCl for å prøve å øke utbyttet av derivatiseringen. Nøytralisering med HCl resulterte i dannelsen av ammoniumklorid i prøverøret. Nøytralisering av eluatet var ikke vellykket grunnet stor mengde av ammoniumklorid slik at ikke derivatiseringen kunne bli gjennomført.

Siden Strata X-C ikke egnet seg for ekstrahering av 3-NT og tyrosin, under de betingelsene som ble testet, ble en annen kolonne, Strata-X, fra samme leverandør testet ut. Strata X-C har i tidligere artikler blitt sammenlignet med Strata X for ekstrahering av nitrofenoler. Strata X-C viser en bedre hydrofobisk- og polarretensjon sammenlignet med Strata X. Selv om Strata X-C og Strata X består av divinylbenzene, har Strata X-C en sulfonsyre som øker elektron polariseringen til den aromatiske ringen som sulfonsyren er festet til (Huq et al., 2005). Selv om tidligere artikler har rapportert at Strata X-C skal være mer egnet for ekstraksjon enn Strata X, ble Strata X testet for å forhindre interaksjoner mellom NH₄OH og derivatiseringsreagensene.

Strata X-C vs Strata X

Bond Elut C18 og Discovery DSC18 ble brukt for opprensning av tyrosin og 3-NT løst i vann. Ekstraksjon av 3-NT og tyrosin fra plasma ble utført på 2 forskjellige SPE kolonner: Strata X-C (sterk kation) og Strata-X (polymerisk). For å sammenligne Strata X-C og Strata X ble tre prøverløsninger laget, ekstrahert, derivatisert og analysert på GC/MS. Den første prøven bestod av plasma som ble tilsatt (spiket) en kjent mengde 3-NT (1 mg/l) før opprensning på SPE. Den andre prøven bestod av plasma som hadde blitt spiket med 3-NT (1 mg/l) etter opprensning på SPE. Den siste prøven bestod 3-NT (1 mg/l) løst i vann, rensset på SPE. Alle prøvene ble analysert i kvadruplikater på hver kolonne. Intensiteten av 3-NT i kromatogrammet viste at Strata-X ga et høyere signal for 3-NT enn Strata X-C (Figur 4.1.5).



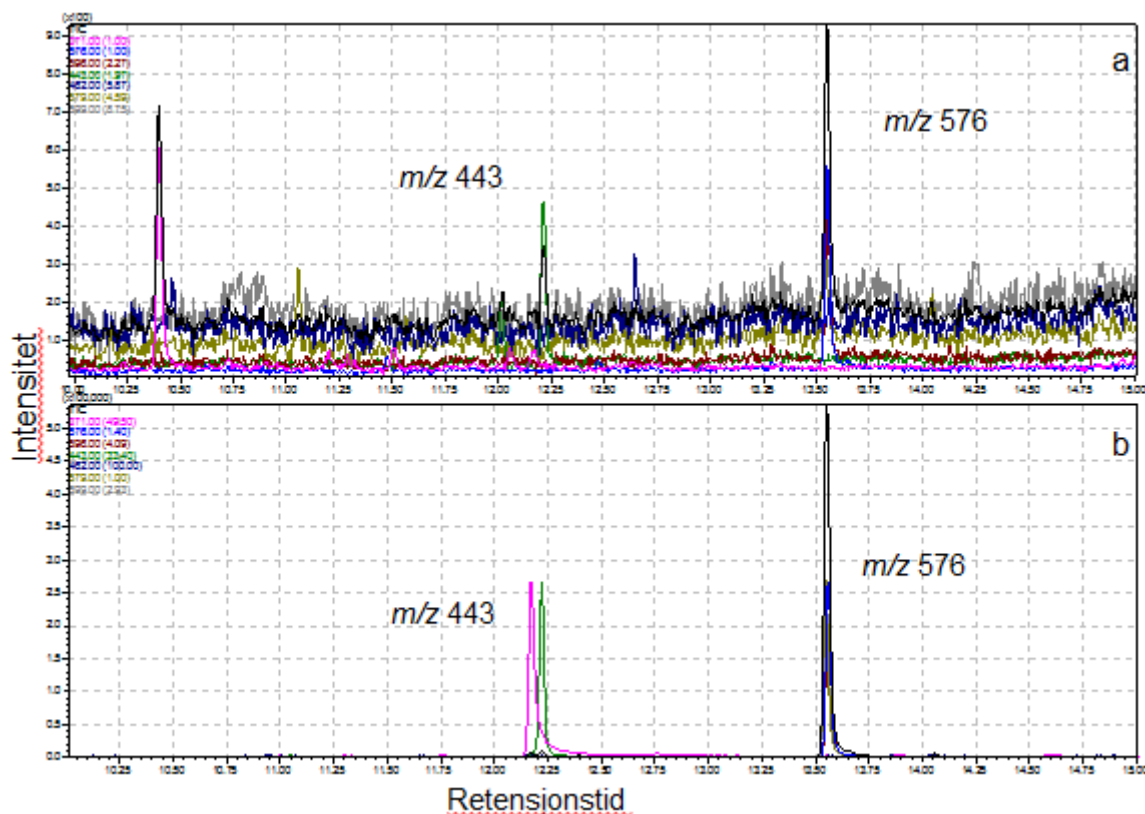
Figur 4.1.5 - Intensiteten (gjennomsnitt \pm SD) av 3-NT rensed ved hjelp av Strata-X og Strata X-C. Vannprøve av 3-NT, plasmaprøve spiket med 3-NT før og etter ekstrahering med SPE.

Tidligere publikasjoner har rapportert at Strata X-C er mer egnet for ekstraksjon av nitrofenoler enn Strata X (Huq et al., 2005). For ekstraksjon av 3-NT, som har en nitrofenol som den funksjonelle gruppen av aminosyrer, ble det ut fra testene resultert i at Strata-X er mer egnet enn Strata X-C.

Strata-X

Ekstraksjon av tyrosin og 3-NT fra plasma med Strata-X resulterte i to toppler i kromatogrammet med bruk av kondisjonering med 0.1% TFA (pH 2), prøveløsning med en pH 3, vasking med 1.5 ml 0.1% TFA (pH 2). Metoden var veldig pH avhengig og en liten forandring i pH kunne føre til at tyrosin og 3-NT ikke retardert. Det ble også forsøkt å vaske med metanol i TFA, for å vaske ut eventuelle forurensinger som ikke blir vasket ut med vann, men dette resulterte i at små mengder av 3-NT og tyrosin ble vasket ut.

Ekstraksjon av plasma med Strata-X ga signaler for tyrosin og d_3 -3-NT. En blank prøve ble rensed på samme måte som plasma for å få en oversikt over bakgrunnsstøyen for metoden. Den blanke prøven ga en litt forhøyet bakgrunnsstøy på m/z -verdien 576 (Tabell 4.1.2), som er en m/z -verdi som karakteriserer 3-NT. Signalet for den blanke prøven (Figur 4.1.6 a) kom på samme retensjonstid som signalet til 3-NT (Figur 4.1.6 b).



Figur 4.1.6 - Total-ion kromatogrammet av blankprøve (a) og tyrosin og nitro-tyrosin (1 mg/l) løst i vann (b). Begge prøvene er rensert på SPE kolonnen Strata X og derivatisert med samme metode.

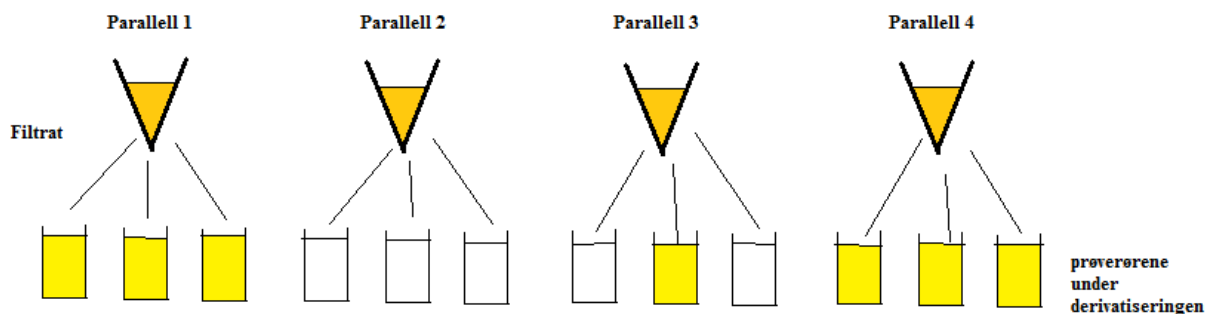
Tabell 4.1.2 - Bakgrunnsstøy (gjennomsnitt \pm SD) for en blank prøve som ble ekstrahert på Strata-X og derivatisert ifølge kapittel 3.5.4. m/z 371 og 443 representerer tyrosin, m/z 576 representerer 3-NT og m/z 579 representerer d_3 -3-NT. Retensjonstiden for de ulike m/z verdiene er oppgitt i minutter.

| m/z | Gjennomsnitt \pm SD (n=3) | Retensjonstid (min) |
|-------|--------------------------------|------------------------|
| 371 | 105 \pm 29 | 12.170 |
| 443 | 283 \pm 50 | 12.210 |
| 576 | 512 \pm 23 | 13.550 |
| 579 | 102 \pm 38 | 13.540 |

m/z ionet 576 skiller seg ut fra de andre m/z ionene, fra blankprøve, med at den har høyere signal enn de andre. Grunnet for dette kan skyldes noen stoffer i SPE kolonnen, løsemiddel eller derivatiseringsreagenser som reagerer med hverandre og gir den samme m/z -verdien og retensjonstiden som 3-NT. Ut fra resultatene kan ikke Strata-X brukes som ekstraksjonsmetode for å måle fritt 3-NT i plasmaprøver.

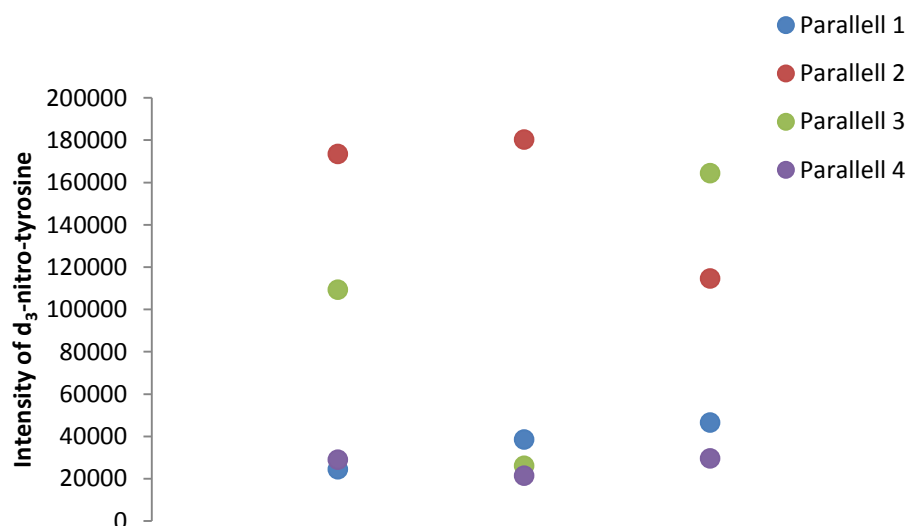
4.2 Ultrafiltrering

Opprensning av plasma, spiket med d_3 -3-NT (1 mg/L), med ultrafiltrering var en rask og enkel metode. Kromatogrammet ga signaler for tyrosin og d_3 -3-NT, men 3-NT ble ikke detektert. Intensiteten for d_3 -3-NT variert for de 4 parallellene (Figur 4.2.2).



Figur 4.2.1 - Filtratet fra 4 paralleller ble fordelt på 3 prøverør hver. Under derivatiseringen ble parallell 1 og 4 gule, samt en prøve fra parallell 3.

I prøveopparbeidingen ble parallell 1 og 4 samt en prøve fra parallell 3 gule, mens de andre parallellene var fargeløse (Figur 4.2.1). At prøvene ble gule kan skyldes at de ble dårligere rensert enn prøvene som ble fargeløse, slik at det er noen stoffer i filtratet som gir den gule fargen. Prøvene som ble gule fikk en lavere intensitet i kromatogrammet enn de fargeløse prøvene (Intensiteten av de forskjellige måleparallellene er nevnt i Vedlegg B).



Figur 4.2.2 - Opprensing ved hjelp av ultrafiltrering av fire plasmaprøver som igjen ble fordelt på 3 glass.

Ultrafiltrering som en opprenningsmetode var enkel å utføre og ikke tidskrevende (filtreringen tok 60 minutter) siden derivatiseringen ble påbegynt rett på filtratet, var det ikke behov for inndaming. Metoden ble gjennomført med utgangspunkt i artikkelen fra Søderling et al (2003) og virket som en god metode. Grunnen for ingen deteksjon av 3-NT i massespektrometeret kan være at konsentrasjonen av 3-NT i plasma var for lav i filtratet, siden filtratet ble fordelt på 3 rør etter opprensingen. Metoden ble ikke testet videre på grunn av den lave intensiteten av 3-NT og fordi ultrafiltreringsrørene er dyre.

4.3 Derivatisering

Derivatisering ble utført med fire forskjellige metoder, PFBBBr, BSTFA, MTBSTFA og en kombinasjon av HFBA og TMSD. De tre første ble testet på tyrosin og 3-NT løst i vann, mens den siste ble testet på 3-NT og tyrosin ekstrahert fra plasma og løst i vann. Prøvene ble tilslutt analysert på GC/MS.

4.3.1 Pentafluorbenzyl bromid (PFBBBr)

Den første derivatiseringsmetoden var en enkel metode som kun bestod av derivatisering av 3-NT og tyrosin med PFBBBr. Derivatisering med PFBBBr var enkel å utføre og var ikke tidskrevende. Prosedyren bestod av ett derivatiseringssteg og oppvarming av reaksjonsblandingen. Problemet med denne metoden var at hverken 3-NT eller tyrosin ble detektert i MS-kromatogrammet.

Metoden var basert på en artikkel fra Jiang et al (1998), hvor dem rapporterte derivatisering av 3-NT med PFBBr. I artikkelen ble det brukt HPLC som et opprensingssteg etter derivatiseringen, men det ble ikke brukt her. Opprensings ved HPLC har tidligere blitt brukt for å separere 3-NT fra sine forløpere; tyrosin, nitritt og nitrat, før derivatisering (Schwedhelm et al., 1999). Artikkelen, som det ble tatt utgangspunktet i, renses 3-NT både før derivatisering og etter derivatisering men før analyse i GC/MS, samt en opprensing av prøven med SPE. 3-NT blir veldig godt renses før den blir derivatisert og analysert. Siden artikkelen er fra 1999, ble det bestemt å derivatisere 3-NT uten all opprensingen, kun med SPE. Grunnen for mindre opprensing var at det ble antatt at en ny GC/MS var mer sensitiv enn for 16 år siden, og at opprensing på HPLC ikke var nødvendig. En av grunnene til at ikke 3-NT ble detektert i dette forsøket kan være mangel på opprensning etter derivatiseringen, for å fjerne overskudd reagenser og biprodukter. En annen grunn kan ha være at 3-NT og tyrosin ikke ble godt nok løst i løsemiddelet før derivatiseringen.

Tidligere artikler har rapportert at derivatisering med PFBBr eller HFBA ikke gav signaler som tilsvarte 3-NT, fordi det resulterte i denitrering (Ohshima et al., 1990). Dette kan tyde på at bare tyrosin skulle blitt detektert i kromatogrammet med derivatisering med PFBBr, men fra resultatene ble ikke tyrosinderivatene detektert.

Jiang et al (1998) rapporterte også derivatisering av 3-NT med PFBBr og BSTFA hvis ikke alle gruppene ble derivatisert med PFBBr, kunne de gjenværende gruppene som ikke var derivatisert bli derivatisert med BSTFA. Resultatene viste at BSTFA var ikke nødvendig, siden 3-NT ble fullt derivatisert med PFBBr (Jiang & Balazy, 1998). Ut fra artikkelen ble det i denne oppgaven testet derivatisering med en kombinasjon av PFBBr og BSTFA. Derivatisering med PFBBr og BSTFA ga ingen deteksjon av 3-NT eller tyrosin i kromatogrammet.

Ut fra resultatene ble det besluttet å jobbe videre med BSTFA i denne oppgaven og PFBBr ble studert videre i en annen oppgave.

4.3.2 N,O-bis-(trimetylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)

Derivatisering med BSTFA var enkel å utføre og ikke tidskrevende. Problemet med metoden var at tyrosin og 3-NT ikke ble derivatisert og derfor ikke detektert i GC/MSen. En av grunnene for dette kan ha sammenheng med at prøvene ble analysert i NCI. TMS-derivater

har dårligere evne til å tiltrekke seg elektroner, siden de ikke inneholder fluorforbindelser. Fra tidligere artikler har derivatisering av 3-NT og tyrosin med BSTFA og analysert i NCI gitt signaler i massespektrometeret (Shigenaga et al., 1997). Deteksjon av TMS-derivater i NCI skal være mulig, men den mest optimale ionekilden for TMS-derivater er EI. Ionekilden ble skiftet til EI og prøver derivatisert med BSTFA ble analysert på GC/MS. Kromatogrammet viste ingen deteksjon av tyrosin eller 3-NT her heller.

Derivatisering ved hjelp av SPAD virket som en tidssparende metode og var enkel å gjennomføre. Å utføre ekstraksjonen og derivatiseringen rett på kolonne ville spare tid, siden et inndampingstrinn mellom ekstraksjonen og derivatisering ble unngått. Derivatisering ved hjelp av SPAD ga ingen TMS derivater av tyrosin og 3-NT i kromatogrammet, grunnen til dette var at derivatene ikke ble eluert ut med de løsemidlene som brukes ved analyse.

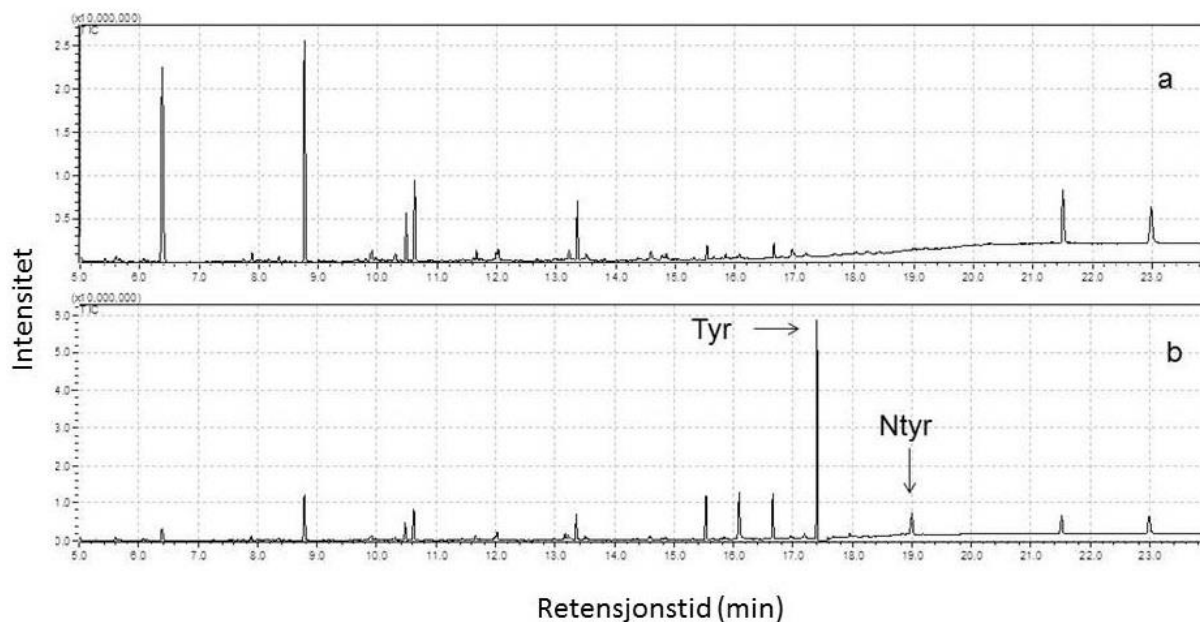
Derivatene kunne blitt eluert med et egnet elueringsløsning, dampet inn og løst opp igjen med et løsemiddel som er egnet for GC/MS, men da blir det et ekstra inndampingstrinn. En annen grunn for ingen resultat kan være at 3-NT og tyrosin ikke ble fullt derivatisert på kolonnen.

Dette skyldes at en av de funksjonelle gruppene hos tyrosin og 3-NT må bindes til sorbenten i kolonnen for å bli retardert. Dette medfører at denne funksjonelle gruppen ikke blir derivatisert. Derivatisering med SPAD ble ikke brukt for videre analyser, siden kolonnen hindrer en av de funksjonelle gruppene fra å bli derivatisert og et tris-derivat er mer ønskelig enn et bis-derivat.

Schummer et al (2009) sammenlignet derivatisering med BSTFA med et annet silyleringsreagens, MTBSTFA. Konklusjonen var at MTBSTFA var mer egnet for derivatisering av store molekyler enn BSTFA (Schummer et al., 2009). Dette kan være en av grunnene til at 3-NT og tyrosin ikke ble derivatisert med BSTFA, at molekylmassen var for stor. Fra resultatene her ble det videre testet ut MTBSTFA som derivatiseringsreagens.

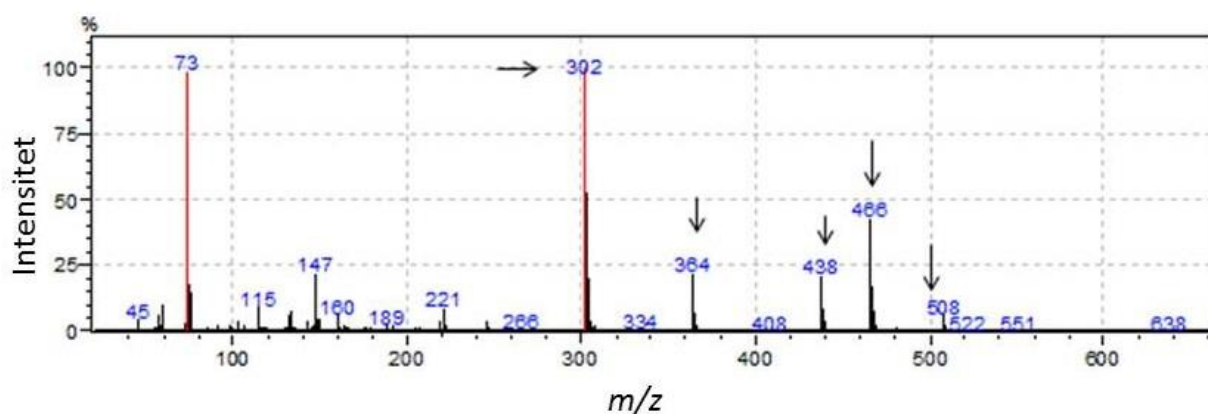
4.3.3 *N*-(*t*-butyldimetylsilyl)-*N*-metyltrifluoracetamid (MTBSTFA)

Derivatisering med MTBSTFA ga tydelige signaler for både tyrosin og 3-NT. TIK av TBDMS-tyrosin og 3-NT (Figur 4.3.1 b) og derivatisert blankprøve (Figur 4.3.1 a), viser hvor tyrosin (17.4 minutter) og 3-NT (19 minutter) elueres.

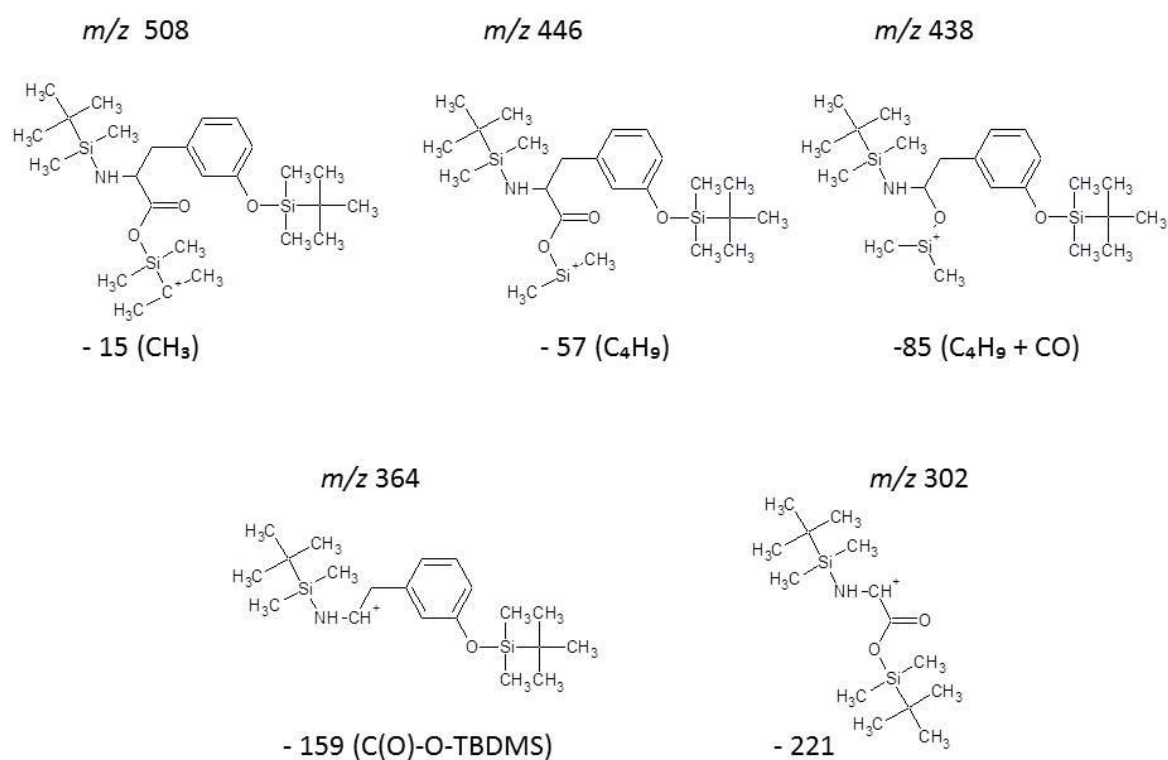


Figur 4.3.1 - Det totale-ion kromatogrammet av (a) blank og (b) en blanding av tyrosin og 3-NT derivatisert med MTBSTFA.

Massespekteret viser de mest vanlige m/z ionene for tyrosin (Figur 4.3.2) som er: m/z 508 [M-15], m/z 466 [M-57], m/z 438 [M-85], m/z 384 [M-159] og m/z 302 [M-211]. Signalet på m/z 522 er molekylærmassen minus et hydrogenatom, [M-1]. TBDMS-derivatene av tyrosin ga et fragmenteringsmønster for de ulike m/z verdiene fra massespekteret (Figur 4.3.3). m/z verdiene fra massespekteret er nevnt over fragmentene og mistet fragmentmasse (Da) er nevnt under.



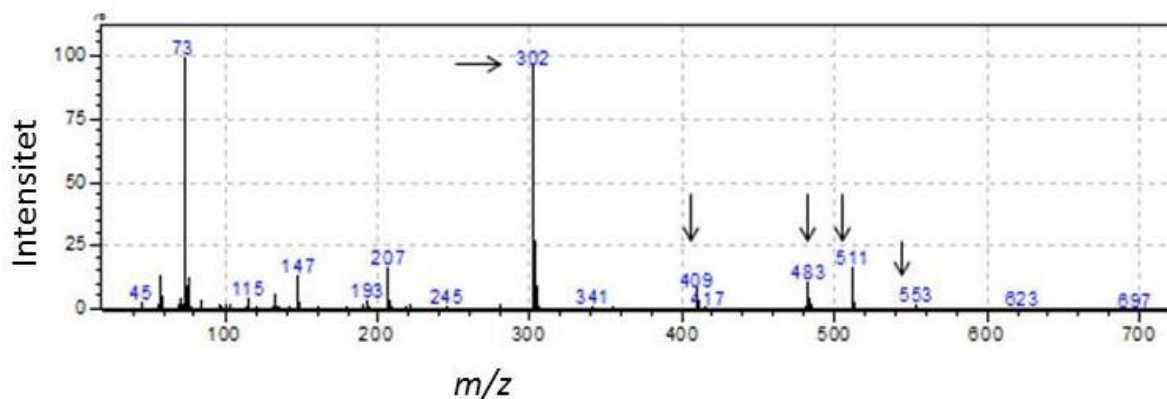
Figur 4.3.2 - Massespektret av tyrosin på retensjonstiden 17.4, hvor de karakteristiske m/z ioner er markert med en pil.



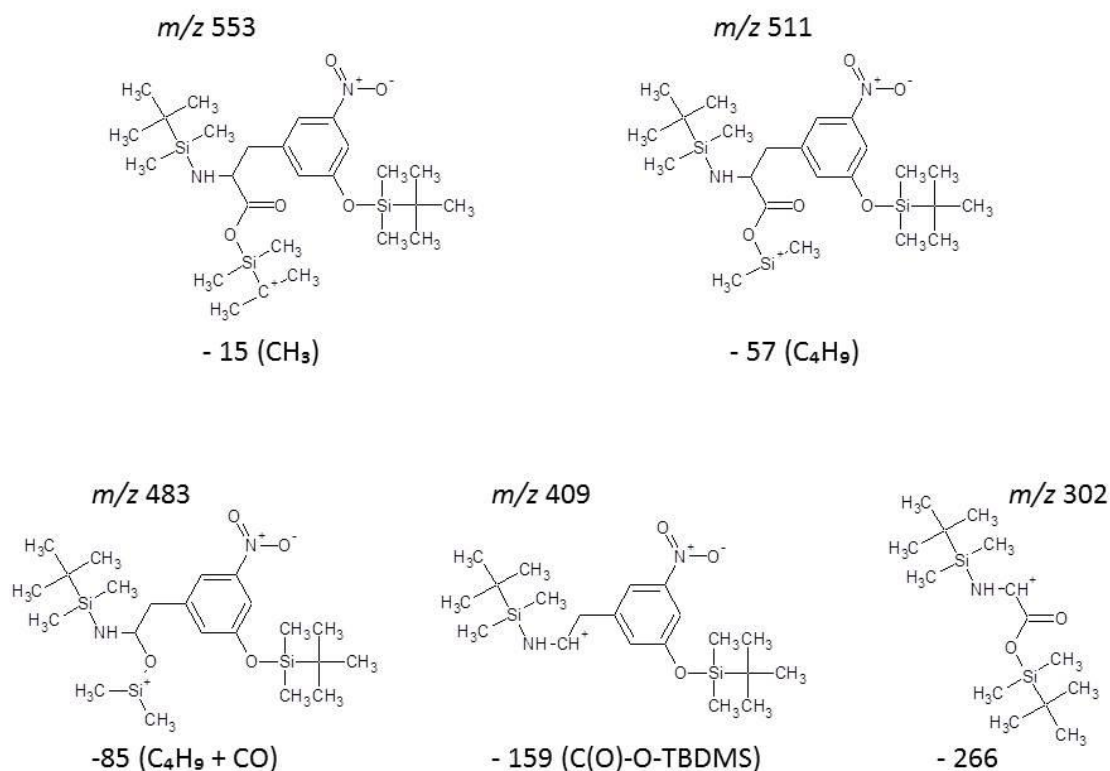
Figur 4.3.3 - Fragmenteringsmønster for TBDMS-tyrosin. m/z verdiene er nevnt over fragmentene og mistet fragmentmasse (Da) nevnt under fragmentet.

Massespektret viser de mest vanlige m/z ionene for 3-NT (Figur 4.3.4). Basetoppen er m/z 302, men for å identifisere 3-NT m/z 511 ble brukt. De mest karakteristiske m/z ionene for 3-NT var m/z 553 [M-15], m/z 511 [M-57], m/z 483 [M-85], m/z 409 [M-159] og m/z 302

[M-266](Figur 4.3.5). Ionet for molekylmassen er ikke vist i spekteret. Grunnen for at m/z 511 ble brukt for å identifisere 3-NT istedenfor m/z 302, er at 302 er et m/z ion som de aller fleste aminosyrer har. m/z 302 skyldes at sidegruppen har blitt fragmentert fra aminosyren.



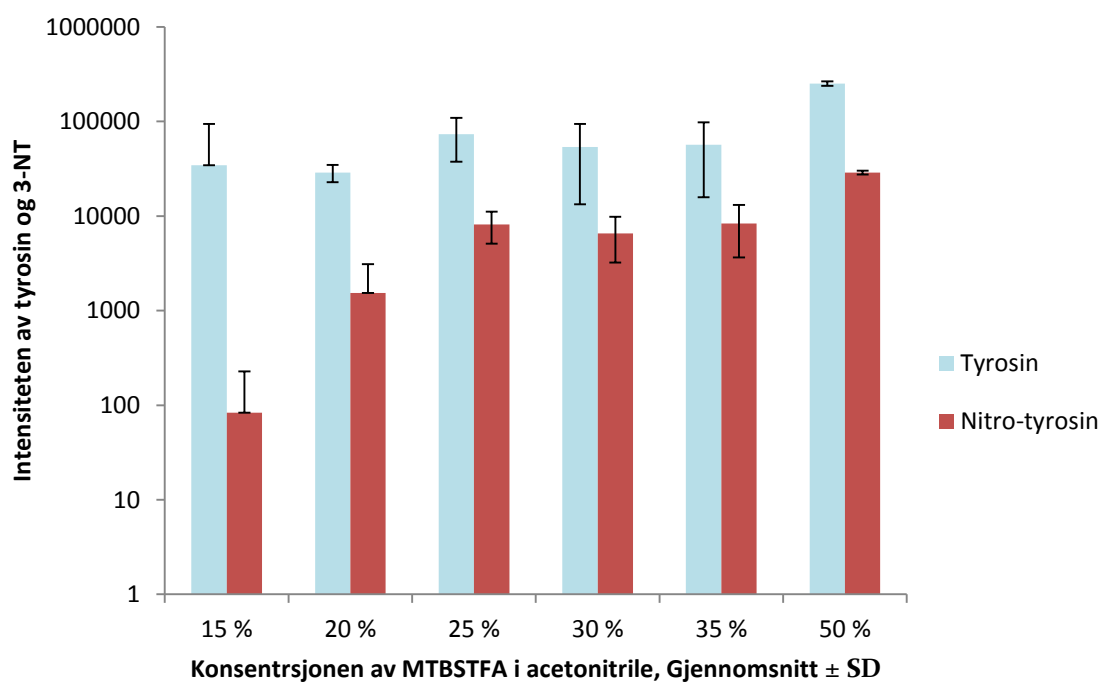
Figur 4.3.4 - Massespektret 3-NT ved retensjonstiden 19.0, hvor de karakteristiske m/z ioner er markert med en pil.



Figur 4.3.5 - Fragmenteringsmønsteret for TBDMS-derivater av 3-NT. m/z verdiene er nevnt over strukturen og mistet fragmentmasse (Da) er nevnt under.

Konsentrasjon av MTBSTFA

Forskjellige konsentrasjoner av MTBSTFA i acetonitril ble testet og den beste kombinasjonen var 50% MTBSTFA og 50% acetonitril (Figur 4.3.6). Lavere konsentrasjoner av MTBSTFA i acetonitril ga også høye intensiteter for tyrosin og 3-NT i kromatogrammet. Grunnen for testing av lavere konsentrasjoner er for å begrense bruken av reagenset. Gir mindre volum av MTBSTFA samme resultat som 50%, vil det vært en fordel med mindre konsentrasjon. Mindre konsentrasjon av MTBSTFA gav lavere intensitet enn 50%.



Figur 4.3.6 – Intensiteten (gjennomsnitt \pm SD) for forskjellige konsentrasjoner av MTBSTFA i acetonitril i derivatiseringsprosedyren for 3-NT og tyrosin (n = 3).

Reaksjonstemperatur

Reaksjonstemperatur har en effekt på utbyttet av reaksjonen, produktet (Tabell 4.3.1). Den optimale reaksjonstemperatur for MTBSTFA er 120 °C, reaksjon ved 60 °C gav en høyere intensitet for tyrosin mens 90 °C gav høyere intensitet for 3-NT. Reaksjonstemperatur på 120 °C er en veldig høy temperatur og er ikke egnet for prøverørene som ble brukt under forsøket. Korkene til prøverørene består av et septum, slik at korkene skal være tette, som smeltet under den høye temperaturen. Intensiteten for reaksjoner oppvarmet til 120 °C er 3.4 ganger høyere enn ved 60 °C. Oppvarming ved 90 °C ble også testet og intensiteten var nesten den samme som ved 60 °C. For videre analyser ble 60 °C brukt som reaksjonstemperatur, siden dette er en mildere temperatur.

Tabell 4.3.1 - Intensiteten (gjennomsnitt ± SD) av tyrosin og 3-NT ved forskjellige reaksjonstemperaturer.

| Aminosyrer | Intensitet (Gjennomsnitt ± SD) | | |
|------------|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| | 60 °C (n=3) | 90 °C (n=3) | 120 °C (n=2) |
| Tyrosin | 288971 ± 20446 | 251250 ± 13185 | 984343 ± 142691 |
| 3-NT | 11524 ± 13560 | 28792 ± 1419 | 53969 ± 4846 |

Reaksjonstid

Reaksjonstiden ble testet for å se om lenger reaksjonstid hadde en effekt på utbyttet av reaksjonen. Intensiteten for tyrosin og 3-NT var ikke stabil over tid eller mellom forsøkene (resultat ikke vist). For videre analyser ble 30 minutter brukt som reaksjonstid, basert på tidligere publikasjoner som rapporterte 30 minutter som den optimale reaksjonstiden (Deng et al., 2002).

GC/MS program

GC/MS metoden ble endret for å se om høyere temperaturer for ionekilden, interface- og injektortemperaturen ga høyere intensitet i kromatogrammet og bedre separasjon fra bakgrunnstøyen. Endring i temperatur på; ionekilde, interface- og injektortemperatur ga ikke en høyere intensitet i massespekteret (Tabell 4.3.2). For videre analyser ble gammel metode brukt, siden økt temperatur ikke ga høyere intensitet eller bedre separasjon.

Tabell 4.3.2 – Intensiteten (gjennomsnitt \pm SD) av tyrosin og 3-NT analysert med to forskjellige GC/MS metoder.

| Aminosyrer | Intensitet (Gjennomsnitt \pm SD) | |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| | Gammel metode ^a (n=3) | Ny metode ^b (n=3) |
| Tyrosin | 251250 \pm 13185 | 230124 \pm 20307 |
| Nitro-tyrosin | 28792 \pm 1419 | 25193 \pm 1283 |

^a Ionekilde: 200 °C, Interfacetemp: 250 °C, injektortemp: 250 °C

^b Ionekilde: 210 °C, Interfacetemp: 280 °C, injektortemp: 280 °C

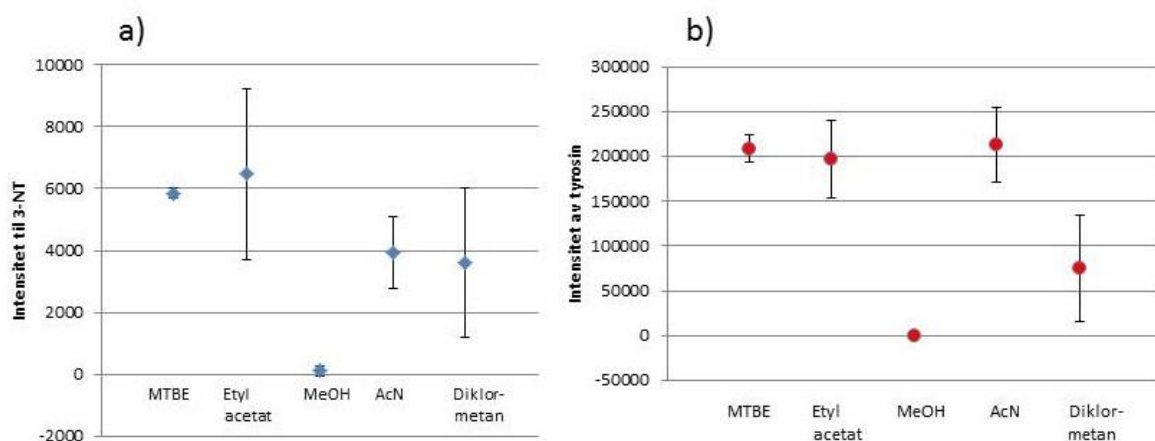
Natriumsulfat

Natriumsulfat ble satt til glassflaskene for å være sikker på at alt vann var dampet vekk under det første inndampingstrinnet, slik at ikke vannet skulle reagere med derivatiseringsreagenset. To forsøk, på forskjellige dager, ble testet med og uten tilsetning av natriumsulfat.

Resultatene viste at tilsetning av med og uten natriumsulfat til derivatiseringen hadde liten påvirkning på utbyttet av derivatiseringsreaksjonen. TBDMS-derivater er stabile ovenfor fuktighet, hydrolyse og reduksjon og oksidasjons reaksjoner (Jimenez-Martin et al., 2012). Ut fra resultatene hadde det ingen hensikt å tilsette natriumsulfat til prøvene, så videre analyser ble gjort uten natriumsulfat.

Løsemiddel

MTBE, etylacetat og acetonitril er løsemidler som er egnet for derivatisering av 3-NT (Figur 4.3.7 a) og tyrosin (Figur 4.3.7 b). Bruken av diklormetan og metanol som løsemidler er ikke egnet for denne reaksjonen. Metanol som løsemiddel ga en lav intensitet for både 3-NT og tyrosin. Diklormetan ga en lavere intensitet for tyrosin, mens for 3-NT var intensiteten av diklormetan omtrent den samme som for acetonitril.



Figur 4.3.7 - Forskjellige løsemiddeler (MTBE, etylacetat, metanol (MeOH), aceonitril (AcN) og diklormetan) testet for derivatisering av 3-NT (a) og tyrosin (b).

MTBE, etylacetat og acetonitril er løsemidler som kan brukes til å løse opp derivatene i det siste steget. Det best egnede løsemiddelet er MTBE, fordi den ga det høyest signale for tyrosin og 3-NT derivater i kromatogrammet og standardavviket var lavt i forhold til etylacetat. Deng et al (2002) brukte metanol som løsningsmiddel, men ut fra mine forsøk var metanol lite egnet som løsemiddel for denne reaksjonen.

Inndamping

Derivatene ble dampet inn etter oppvarming for å få vekk overskuddsreagenser og biprodukter. Fra tidligere forsøk så det ut som 15 minutter inndamping var nok, men for å prøve å øke intensiteten ble det dampet inn i 20 minutter. Resultatene ble testet ved hjelp av en paret t-test. T-testen viste at det var ingen signifikant forskjell ($p = 0.94$) mellom inndamping på 15 og 20 minutter. Så 15 minutter ble brukt for videre analyser.

Tyrosin og 3-nitrotyrosin

Konsentrasjonen av 3-NT og tyrosin var lik før derivatiseringsprosessen begynte, men intensiteten av dem i massespekteret var ulike. For alle prøver som ble analysert var intensiteten av tyrosin ti ganger høyere enn for 3-NT. Dette kan være fordi 3-NT ikke har blitt fullstendig derivatisert. Slik at litt har blitt tris-derivatisert og noe har blitt bis-derivatisert, mens noe ikke har blitt derivatisert i det hele tatt.

Silylering med MTBSTFA med bruk av acetonitril som katalysator ga TBDMS-derivater av 3-NT og tyrosin. Derivatisering av benzosyrer med BSTFA ble testet for å se om

derivatiseringsreagenset fungerte slik som det skulle. Derivatisering av benzosyrer med BSTFA og med MTBE som katalysator ga en fullstendig derivatisering. Bruken av MTBE som katalysator ved derivatisering av 3-NT og tyrosin med MTBSTFA og BSTFA ga ingen signaler av TMS-/TBDMS-derivater i kromatogrammet. Det kan tenkes at MTBE inhiberer reaksjonen, siden derivatisering med BSTFA/MTBSTFA med MTBE tilstede gav ingen derivater av tyrosin/3-NT.

Oppsummering

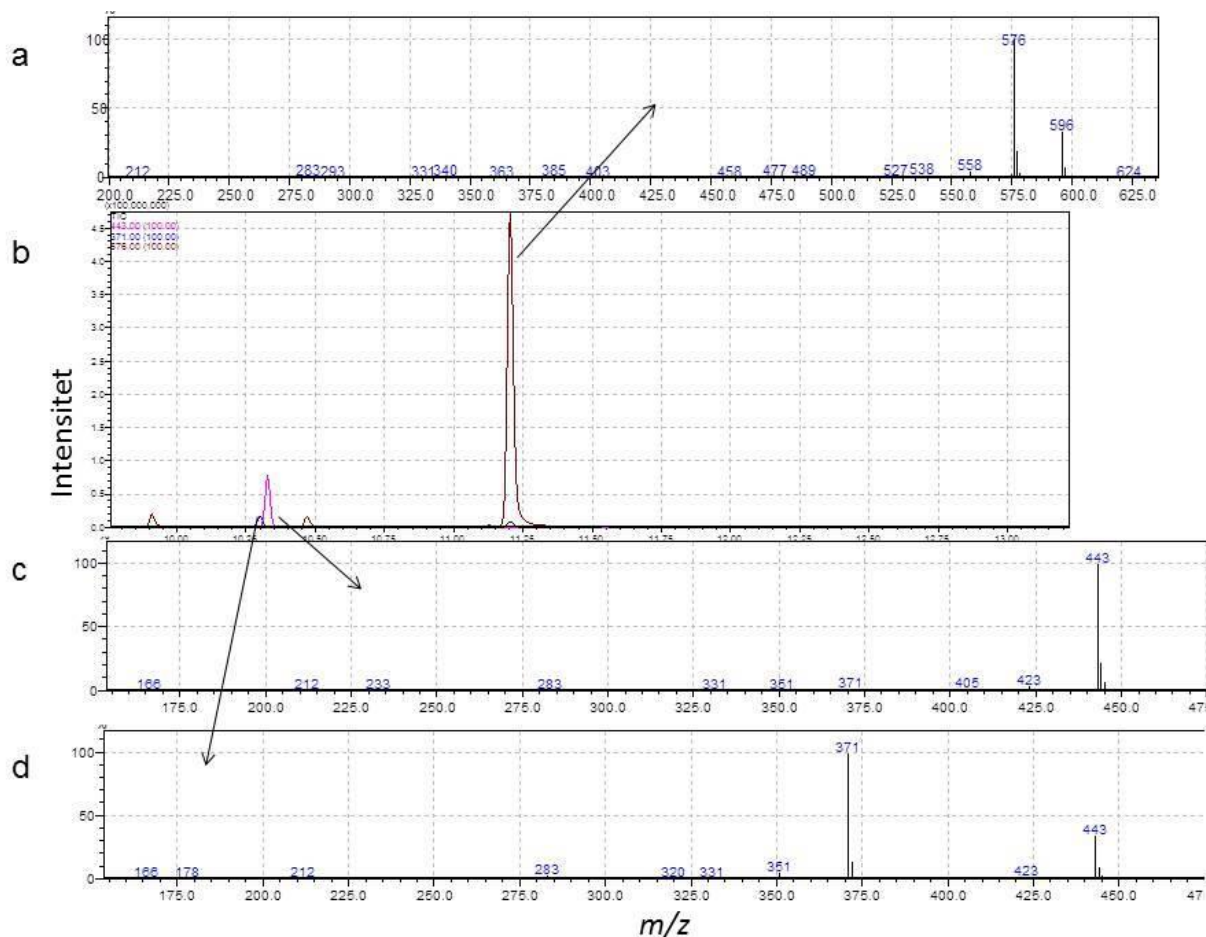
Derivatisering med MTBSTFA av 3-NT og tyrosin gav signaler i kromatogrammet. For å optimalisere metoden ble de forskjellige parameterne endret, men resultatene viste at den originale metoden var mer egnet med unntak av det siste steget. Det siste steget var å løse opp derivatene slik at de kan bli analysert på GC/MS. Deng et al. (2002) oppløste derivatene i metanol, men med testing av ulike løsemidler i det siste steget, viste det seg at metanol ga en lavere intensitet for tyrosin og 3-NT i massespekteret. Løsemidlene som egnet seg for derivatene var MTBE, acetonitril og etylacetat. Det mest optimale var MTBE som ble brukt i analysene. Selv om MTBSTFA kan brukes til å derivatisere 3-NT og tyrosin er metoden ikke sensitive nok. Derivatisering av 3-NT med MTBSTFA har i tidligere artikler blitt rapportert å mangle sensitivitet til å detektere 3-NT i humant plasma. Sensitiviteten er lav på grunn av bruken av EI som ionekilde og NCI som ionekilde skal være mer egnet for å måle lave konsentrasjoner (Frost et al., 2000).

Derivatisering av 3-NT kan føre til dårligere utbytte på grunn av polariteten til nitrogruppen og siden 3-NT har høy molekylmasse kan den sterisk hindre reaksjonen av fenolgruppen på den aromatiske ringen (Crowley et al., 1998). Derivatisering med MTBSTFA av molekyler som har en sterisk hindring vil føre til at det blir lavere utbytte av derivatene, noe som resulterer i høy LOD og lavere sensitivitet. For molekyler med sterisk hindring er BSTFA et mer egnet derivatiseringsreagens (Schummer et al., 2009). Problemet med derivatisering av 3-NT med BSTFA er at 3-NT har for høy molekylvekt, slik at ikke 3-NT kan blir derivatisert med BSTFA. Silylering av 3-NT gir lavt utbytte på grunn av høy molekylmasse og steriskhindring av nitrogruppen.

For å prøve å kvantifisere 3-NT i plasma ble en annen derivatiseringsprosedyre testet. Prosedyren rapporterte en lav LOD 0.03 nM (6.8 ng/l) for fritt 3-NT i humant plasma (Soderling et al., 2003).

4.3.4 Heptafluorbutansyreanhydrid (HFBA) og Trimetylsilyldiazometan (TMSD)

Derivatisering av 3-NT og tyrosin med HFBA og TMSD ga signaler i TIK-kromatogrammet (Figur 4.3.8). 3-NT og tyrosin ble detektert i SIM (Figur 4.3.8 b) og massespekteret for 3-NT (Figur 4.3.8 a) og de to massespektrene for tyrosin (Figur 4.3.8 c og d) indikerte deteksjon av 3-NT og tyrosin.



Figur 4.3.8 - Det totale-ion-kromatogrammet (b) for 3-NT og tyrosin derivatisert med HFBA/TMSD.

Massespekteret til 3-NT (a) og massespektrene av de to produktene til tyrosin (c og d).

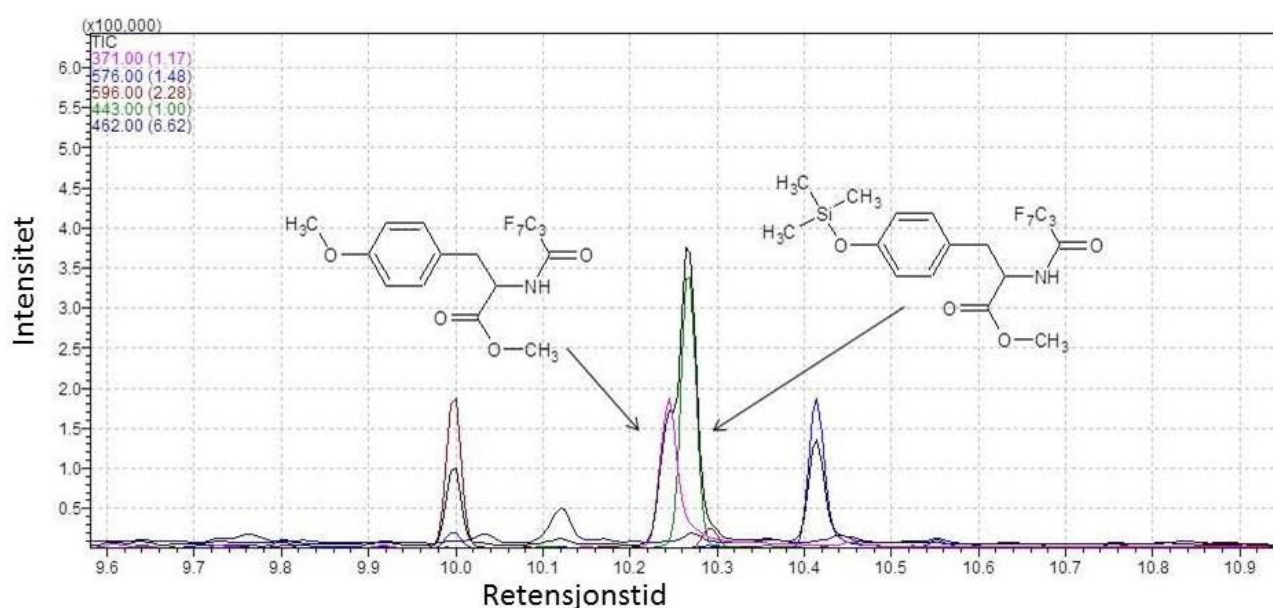
Fra kromatogrammet er det tydelig at intensiteten for 3-NT er høyere enn for tyrosin, selv om konsentrasjonen av dem var lik fra begynnelsen (1 mg/L). Dette kan skyldes at derivatisering med HFBA/TMSD er mer egnet for 3-NT enn tyrosin; at tyrosin ikke blir fullt derivatisert med denne metoden. En annen grunn til høyere intensitet for 3-NT kan være at tyrosin blir nitrert til 3-NT under prosessen. Selv om reduksjonen av nitro-tyrosin til amino-tyrosin med DTT skal forhindre at dette skjer (Soderling et al., 2003). Ved SIM blir enkelte m/z verdier ledet til detektoren hele tiden og det oppnås en deteksjonsgrense som er 1000 – 10 000 ganger

bedre enn med Scan og bakgrunnsstøyene blir også mindre (Greibrokk et al., 1994).

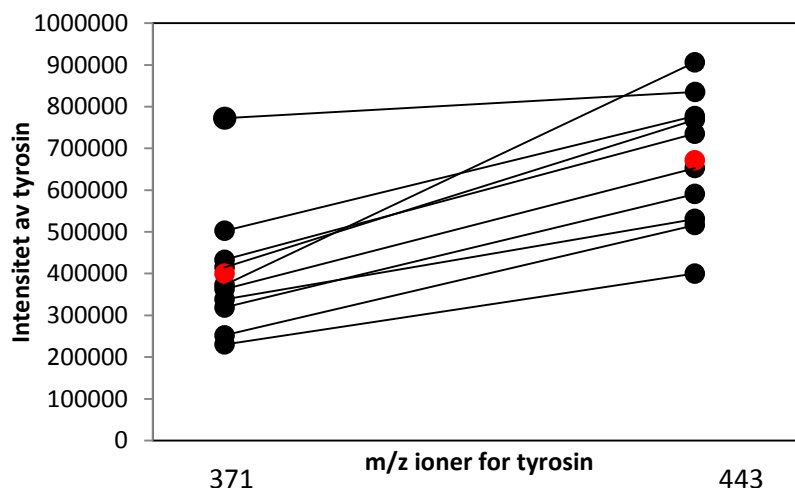
Derivatene av 3-NT ble bare detektert i SIM og ikke i Scan.

Tyrosin

GC/MS analyse av tyrosin viser at det dannes to produkter, et produkt hvor hydroksylgruppen blir silylert og et produkt hvor den blir metylert (Figur 4.3.9). Hovedproduktet er det silylerte derivatet. Intensiteten av tyrosinderivatene ble sammenlignet fra ulike forsøk. Resultatet viste at det er ingen sammenheng (forholdstall) mellom de to tyrosinderivatene i massespekteret (Figur 4.3.10). Gjennomsnittet av målingen er markert med rødt.



Figur 4.3.9 - Det totale-ion kromatogrammet for tyrosin derivatisert med HFBA/TMSD og molekylstrukturen til tyrosin derivatene.

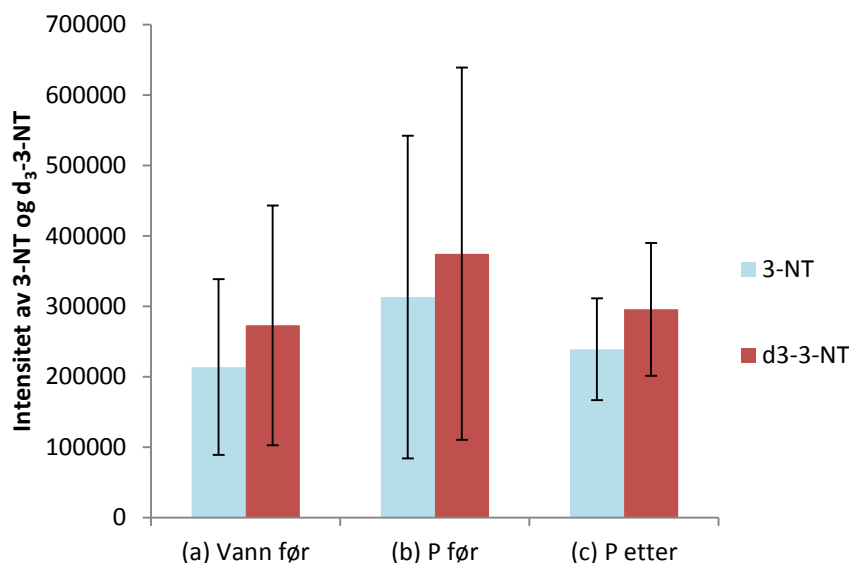


Figur 4.3.10 - Sammenhengen mellom m/z 371 og m/z 443 for tyrosinderivater, hvor gjennomsnittsverdien av de ulike målingene er markert i rødt.

Derivatisering av tyrosin ga to produkter, et som var metylert og et som var silylert. De to produktene gjør det vanskelig å kvantifisere tyrosin, siden det ikke er sammenheng mellom de to toppene. De to tyrosinderivatene har trolig ved metyleringssteget i trinn 4 (Figur 2.5.5), hvor TMSD reagerer med 3-NT og tyrosin for å sette på en metylgruppe. Konsentrasjonen av TMSD kan ha vært for lav i forhold til analytter som skulle metyleres. En annen grunn kan være at metyleringsreaksjonen stod for lenge/for kort før den ble avsluttet ved inndamping. Metyleringsreaksjonen ble også testet under sonikering, for å se om det ble dannet et derivat av tyrosin. Sonikering av metyleringsreaksjonen resulterte i to derivater av tyrosin. En annen grunn, til to derivater av tyrosin, kan være at fenolgruppen på tyrosin reagerer bedre med silylgruppen enn med metylgruppen i TMSD.

Matriks

3-NT og tyrosin løst i vann og plasmaprøver ble rensset, derivatisert og analysert ved hjelp av GC/MS for å se om forskjellige matrikser hadde noe å si for derivatiseringen (Figur 4.3.11). Prøvene ble spiket med 1 mg/L av 3-NT og d_3 -3-NT. En plasmaprøve ble spiket før SPE og den andre ble spiket etter SPE. Alle prøvene ble analysert i kvadruplikat og resultatet er vist med gjennomsnitt \pm SD.



Figur 4.3.11 – Intensiteten (gjennomsnitt \pm SD) av vannprøve og plasmaprøve ekstrahert med Strata-X, derivatisert og analysert ved hjelp av GC/MS. 3-NT og d₃-3-NT (1 mg/l) løst i vann ekstrahert på SPE (a). Plasmaprøve spiket med 1mg/l av 3-NT og d₃-3-NT før SPE (b) og plasmaprøve spiket med 1mg/l av 3-NT og d₃-3-NT etter SPE

Intensiteten av 3-NT og d₃-3-NT derivatene er høyere for plasma spiket før SPE enn etter SPE. Det var forventet at intensiteten skulle være høyere med plasma spiket etter SPE, for da er det ingenting som har forsvunnet i opprensingen. At intensiteten av derivatene er høyere i plasma spiket før SPE indikerer at ingenting er forsvunnet i opprensingen. For plasma spiket etter SPE kan noe 3-NT ikke blitt derivatisert under derivatiseringsprosessen. Vannprøver som ble ekstrahert på SPE har den samme intensiteten som plasma spiket etter SPE. Så den lave intensiteten på kromatogrammet har ingenting å gjøre med matriksen 3-NT og tyrosin er i.

Reduksjon av nitrotyrosin til aminotyrosin

Reduksjonen av 3-NT til 3-aminotyrosin med DTT ble testet med ulike kombinasjoner. Forsøket ble utført med tyrosin og 3-NT løst i vann og tilsatt DTT. En prøve ble oppvarmet på 60 °C i 15 minutter, en prøve stod i romtemperatur i 15 minutter og den siste prøven ble tilsatt DTT, blandet og dampet inn. Intensiteten fra kromatogrammet viste at reduksjon fra nitro til amino i 15 minuttet i romtemperatur er den mest optimale (Tabell 4.3.3). For deteksjon av tyrosin har det lite å si hvordan reduksjonstrinn foregår.

Tabell 4.3.3 - Intensitet (gjennomsnitt \pm SD) av tyrosin, 3-NT og d₃-3-NT fra ulike forsøk for reduksjonssteget med DTT. En parallell ble oppvarmet på 60 °C i 15 minutter, en parallell stod i romtemperatur i 15 minutter og den siste parallellen ble tilsatt DTT, blandet og dampet inn med en gang.

| Aminosyrer | Intensitet (gjennomsnitt \pm SD) | | |
|----------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | Varme (n=4) | Rom temp (n=4) | Vanlig* (n=4) |
| Tyrosin | 194079 \pm 54953 | 192226 \pm 44938 | 149717 \pm 40910 |
| 3-NT | 36041 \pm 28987 | 100503 \pm 32944 | 23729 \pm 5811 |
| d ₃ -3-NT | 58818 \pm 21811 | 148412 \pm 46019 | 36251 \pm 8494 |

*Tilsatt DTT, blandet og dampet inn

Selv om reduksjonen som stod 15 minutter i romtemperatur ga høyere intensiteten enn metoden hvor DTT ble dampet inn med en gang, ble den metoden brukt. Dette er fordi testene av forskjellige reduksjonsmetoder ble gjennomført rett før laboratorieslutt. Derfor var det ikke tid til å teste ut reduksjon av nitro til amin ved i romtemperatur i 15 minutter videre.

Sonikering med varme

Acetonitril med 10% HFBA ble satt til tyrosin og aminotyrosin (steg 2) og blandingen ble sonikert. Sonikeringen ble testet ved en vanntemperatur på 49 °C for å se om sonikering ved høyere temperatur ga høyere intensitet for tyrosin og 3-NT. Problemet med sonikering ved 49 °C var at intensitetene av tyrosin- og 3-NTderivatene var veldig lave i forhold til den konsentrasjonen som ble tilsatt (10 mg/l). En konsentrasjon på 10 mg/l tyrosin/3-NT skulle det forventes et høyt utbytte, en intensitet på rundt 1 million eller høyere. Ut fra resultatene (ikke vist) var intensiteten på rundt 10 000, noe som er 100 ganger lavere en forventet.

En grunn for lav intensitet av tyrosin og 3-NT ved sonikering med varme kan være at forbindelsene blir dekomponert av varmen, slik at det som blir detektert i massespekteret kan være et annet produkt enn 3-NT. En annen grunn for lav intensitet er at det kan ha oppstått en systematiskfeil under derivatiseringsprosessen. Sonikering på 49 °C ga ikke en økning i intensiteten for tyrosin og 3-NT. For videre analyser ble sonikering ved romtemperatur brukt.

Metylering og sonikering

Siste steget i derivatiseringen, metyleringssteget, ble utført under sonikering ved 23 °C i 10 minutter. En annen parallell ble utført i romtemperatur i 10 minutter uten sonikering.

Sonikering under metyleringssteget ga et høyere signal i kromatogrammet enn prøvene som stod i romtemperatur (

Tabell 4.3.4).

Tabell 4.3.4 - Intensiteten (gjennomsnitt \pm SD) av vannprøver som ble sonikert i metyleringssteget og vannprøver som ikke ble sonikert. Vannprøvene bestod av tyrosin, 3-NT og d₃-3-NT (1mg/).

| Aminosyre | Intensitet (gjennomsnitt \pm SD) | |
|----------------------|------------------------------------|------------------------|
| | Sonikering (n=3) | Romtemperatur (n=3) |
| Tyrosin | 68235 \pm 13007 | 80476 \pm 6803 |
| 3-NT | 293636 \pm 59026 | 220427 \pm 37439 |
| d ₃ -3-NT | 41318 \pm 9201 | 31674 \pm 3933 |

Intensiteten for 3-NT var høyere med sonikering av det siste steget enn uten, men intensiteten var ikke så mye høyere at sonikering av metyleringen (steg 4) ble brukt for videre analyser. Dette er fordi 3-NT ikke hadde en intensitet var 10 eller 100 ganger høyere med sonikering, som er nødvendig for å analysere fritt 3-NT i humant plasma. Med sonikering av metyleringssteget ble det en større usikkerhet mellom prøveparallellellene på grunn av høyt SD sammenlignet med metylering uten sonikering.

Gasskromatografi / massespektrometri metoder

GC/MS programmet ble endret for å se om det kunne gi bedre separasjon av 3-NT og tyrosin fra bakgrunnsstøyen, spesielt tyrosin, slik at de to produktene kunne bli separert. Intensiteten av tyrosin, 3-NT og d₃-3-NT er høyere med metode 1 enn metode 2 (Tabell 4.3.5).

Bakgrunnsstøyen, ved analyse av blank, for metode 2 var lavere for tyrosin og uforandret for 3-NT.

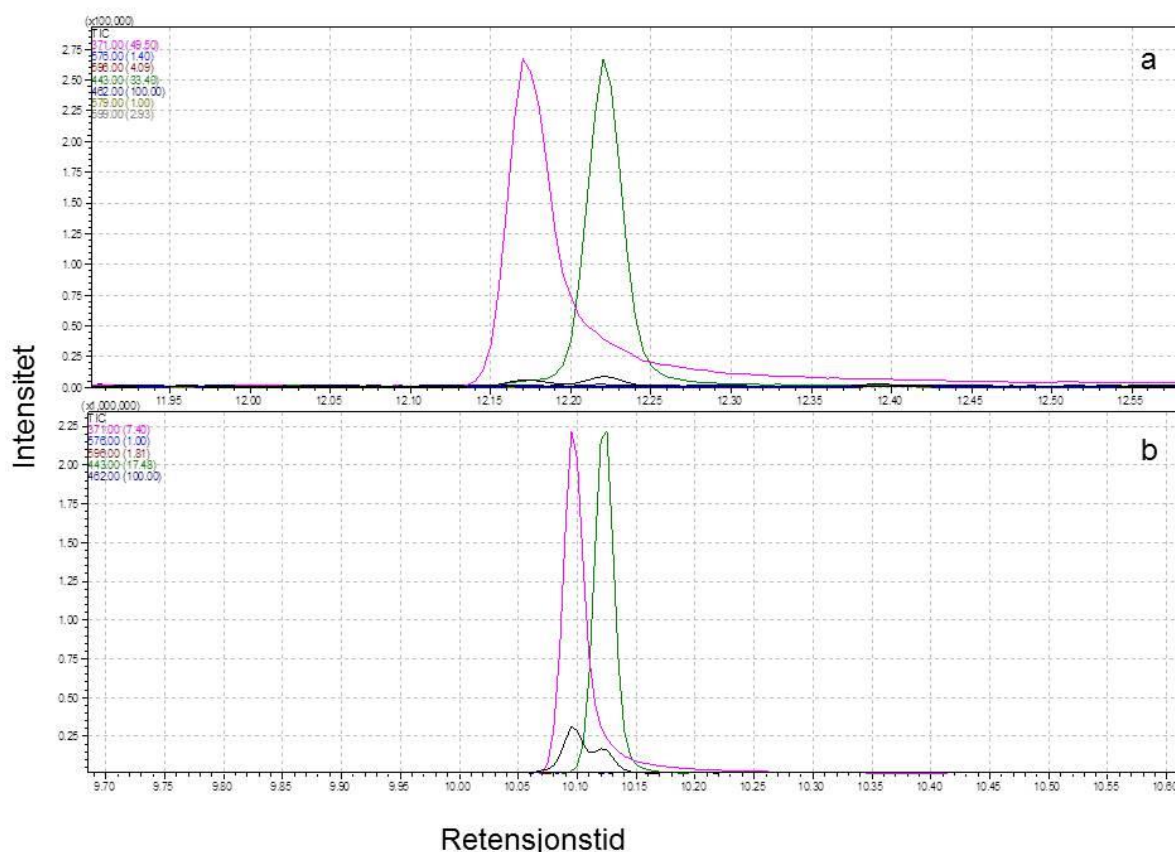
Tabell 4.3.5 - Intensiteten (gjennomsnitt \pm SD) av tyrosin, 3-NT og d₃-3-NT som er analysert ved to forskjellige GC/MS programmer. Bakgrunnsstøyen for de to metodene er også nevnt.

| Aminosyre | Intensitet (Gjennomsnitt \pm SD) | |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| | Metode 1 ^a (n=4) | Metode 2 ^b (n=4) |
| Tyrosin | 656789 \pm 110000 | 486193 \pm 86357 |
| Nitro-tyrosin | 495 \pm 473 | 397 \pm 385 |
| d ₃ -nitro-tyrosin | 163540 \pm 87863 | 125578 \pm 67898 |
| Bakgrunnsstøy tyrosin | 1141 \pm 661 | 414 \pm 219 |
| Bakgrunnsstøy 3-NT | 35 \pm 8 | 31 \pm 2 |

^a GC/MS program som er sitert i Tabell 3.6.3

^b GC/MS program som er sitert i Tabell 3.6.4

Hovedmålet med å lage et nytt temperaturprogram for GCen var å få separert de to tyrosinderivatene (Figur 4.3.12). Endring av GC/MS programmet til et litt lengre program hadde lite å si for intensiteten av tyrosin og 3-NT. Bakgrunnsstøyen for tyrosin ble redusert med metode 2, mens for 3-NT ble den uendret. Tyrosinderivatene analysert ved hjelp av GC/MS med metode 2 (Figur 4.3.12 a) gav samme separasjon av tyrosinproduktene som metode 1 (Figur 4.3.12 b).



Figur 4.3.12 - Total-ion kromatogrammet av tyrosinderivatene analysert ved hjelp av GC/MS med to forskjellige temperaturprogrammer, metode 1 (b) og metode 2 (a).

Selv om ikke bakgrunnstøyen for 3-NT ble lavere eller tyrosinderivatene ble bedre separert med endring i temperaturprogrammet ble metode 2 brukt til videre analyser grunnet lavere støysignal for tyrosin.

Oppsummering

Tyrosin og 3-NT ble derivatisert med HFBA og TMSD og ble detektert ved hjelp av GC/MS i SIM. Derivatiseringsmetoden ga et høyt nok utbytte for å kunne måle fritt tyrosin i plasma. Problemet med tyrosin var at det ble dannet to produkter, et som ble silylert og et som ble metylert. Dette gjorde det vanskelig å kvantifisere tyrosin, men ved hjelp av summen av de to produktene kunne tyrosin ble kvantifisert. Derivatisering av 3-NT ga et signal i kromatogrammet og ionene som ble brukt for å detektere 3-NT var like dem som Söderling et al (2003) oppga. De rapporterte også små konsentrasjoner av 3-NT i plasmaprøver (0.74 ± 0.30 nM) (Soderling et al., 2003). Fra våre resultater viste det seg at å detektere så små konsentrasjoner av 3-NT var vanskelig. Tidligere studier har rapportert en større økning

av sensitiviteten ved deteksjonen av tyrosin og 3-NT i plasma med GC/MS-MS enn ved GC/MS (Schwedhelm et al., 1999; Soderling et al., 2003; Yi et al., 2000). Tidligere artikler har testet forskjellen mellom GC/MS og GC/MS-MS ved å analysere 3-NT i urin fra friske frivillige. Resultatet viste at GC/MS-MS er en bedre metode for å analysere 3-NT (Tsikas et al., 2005). Soderling brukte en GC/MS-MS for å analysere 3-NT, mens det her ble brukt GC/MS. Sammenligning av resultatene viser at GC/MS-MS er mer sensitiv analysemetode enn GC/MS for å detektere 3-NT i plasma fra friske mennesker. GC/MS-MS består av to detektorer, hvor den ene detektoren blir brukt for å separere valgte ioner etter m/z-verdien. Den andre detektoren blir brukt for å undersøke fragmenteringsproduktene for ionene for å få informasjon om strukturen. Eluert ut fra den andre detektoren er bare fragmenter for de valgte ionene og ingen biprodukter eller bakgrunnsstøy (Herbert & Johnstone, 2003).

Derivatiseringsreaksjoner under surt miljø, slik som den syrekatalyserte esterifisering av karboksylsyren på aminosyren kan i enkelte metoder føre til dannelsen av 3-NT (Tsikas et al., 2005). Den optimale pH for dannelse av 3-NT fra tyrosin og nitritt er omtrent 2.5 (Ohshima et al., 1990). For å forhindre dannelsen av 3-NT fra tyrosin under prøveopparbeiding er det flere metoder som kan brukes. En metode er å separere 3-NT fra nitritt, nitrat og tyrosin ved opprensing på HPLC. En annen metode er å separere 3-NT fra plasmaproteinene med ultrafiltrering istedenfor hydrolyse med en syre (Schwedhelm et al., 1999). En tredje metode er å redusere nitro-gruppen til amino-gruppe med DTT (Soderling et al., 2003). I denne oppgaven ble de to siste metodene testet. Separasjon med ultrafiltrering ga deteksjon av tyrosin i kromatogrammet, men ikke deteksjon av 3-NT. Dette kan skyldes at for liten mengde plasma ble analysert. Deteksjon av 3-NT ved reduksjon av 3-NT til 3-aminotyrosin, gav signal for 3-NT derivater i massespekteret. Fordelen med reduksjon med DTT er at den inhiberer dannelsen av 3-NT fra tyrosin (Soderling et al., 2003). Reduksjon av 3-NT til 3-aminotyrosin har fordelen med at den blir mindre klumpete, tiltrekker seg ikke elektroner og aminergruppen kan selv bli fluorakylert (Crowley et al., 1998). Reaksjonen mellom HFBA og tyrosin gjør det lettere for nitrering av tyrosin, men dersom DTT har reagert med tyrosin blir nitreringen inhibert. For å unngå nitrering av tyrosin er det nødvendig med en høy konsentrasjon av DTT. Nitrering av tyrosin uten opprensing ved en av metodene nevnt over kan skje med tilstedeværelse av nitrat anioner, som kan påvirke kvantifiseringen av tyrosin (Soderling et al., 2003). Selv med opprensing med HPLC før derivatisering kan det allikevel forekomme nitrering av tyrosin. Selv små mengder av nitritt og/eller nitrat som ikke er fjernet kan danne 3-NT (Yi et al., 2000). Tidligere artikler har rapportert at GC/MS som

analysemetode er mindre sensitiv og selektiv enn GC/MS-MS, som medfører høyere variasjon innenfor analysene (Tsikas et al., 2005).

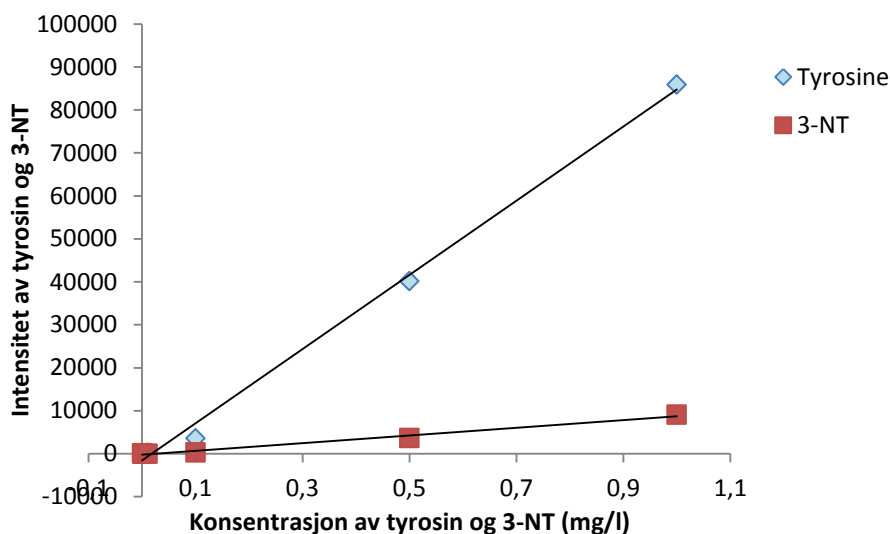
Etablering av en metode for separasjon og derivatisering av 3-NT og tyrosin fra plasma tok lenger tid enn antatt. Målet med oppgaven var å etablere en metode for å kunne måle konsentrasjonen av fritt og proteinbundet 3-NT og tyrosin i plasma fra nyrepasienter og friske kontroller. Derivatisering med HFBA og TMSD ga forhåpninger om å fullføre målet for oppgaven. Men da separasjonsmetoden viste for høy bakgrunnsstøy på samme retensjonstid og m/z -verdi som 3-NT måtte en konkludere med at denne delen av målet ble ikke oppnådd. Oppgavens nye mål ble å etablere en separasjons- og derivatiseringsmetode for å måle fritt 3-NT og tyrosin i friske kontroller.

4.4 Validering

Derivatiseringsmetodene som ble brukt i oppgaven ble validert. Derivatiseringen med PFBBBr og BSTFA ga ingen derivater av tyrosin eller 3-NT, så de ble ikke validert. Tyrosin og 3-NT derivatisert med MTBSTFA og HFBA/TMSD, og deretter analysert med GC-EI-MS (MTBSTFA) og GC-NCI-MS (HFBA/TMSD) ble validert med hensyn på LOD, LOQ, linearitet og stabilitet.

N-(*t*-butyldimetylsilyl)-*N*-metyltrifluoroacetamid (MTBSTFA)

For å se hvor sensitiv metoden var ble forskjellige fortynninger av 3-NT og tyrosin løst i vann ekstrahert, derivatisert og analysert på GC/MS. Resultatene viste at LOD for 3-NT var 0.1 mg/l (med S/N = 86) og for tyrosin 0.01 mg/L (med S/N = 52) (Figur 4.4.1). Signalet for 0.001 mg/l av tyrosin er en veldig lavt signal og kan ikke bli adskilt fra bakgrunnsstøy (S/N = 0). Derfor kan man ikke bruke konsentrasjonen som et mål på LOD. For intensitet av de ulike konsentrasjonene, se vedlegg C.



Figur 4.4.1 - Forskjellige konsentrasjoner av tyrosin og 3-NT derivatisert med MTBSTFA.

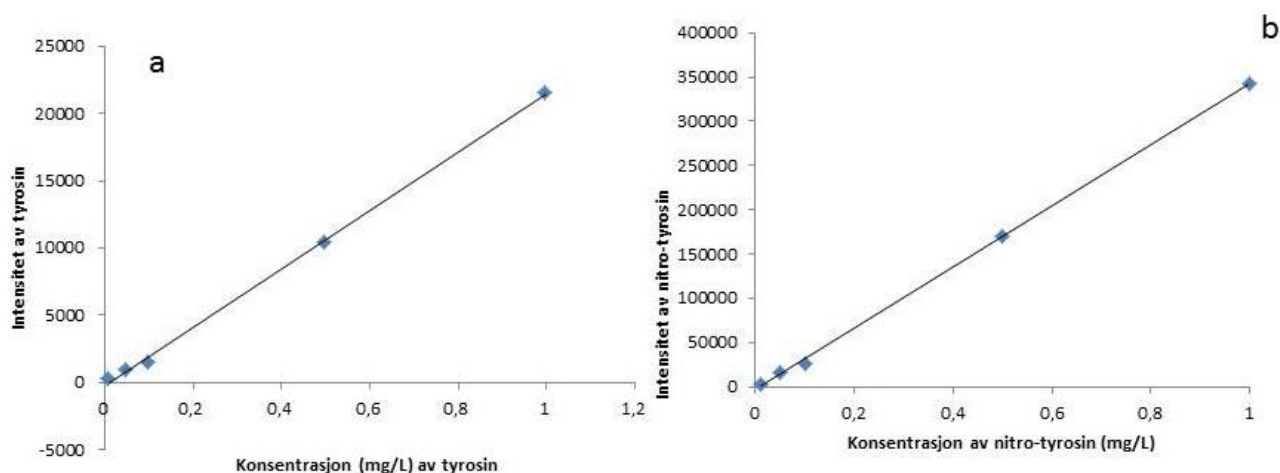
Standardkurven viste en god linearitet, mellom konsentrasjonene 0.001 til 1 mg/l av 3-NT ($R^2 = 0.988$) og tyrosin ($R^2 = 0.9968$). Presisjonen av resultatene innenfor en dag og fra dag til dag var dårlig ved at intensiteten varierte mye. En dag kunne intensiteten være rundt 200 000 for alle prøvene og den neste dagen kunne intensiteten være under 100 for alle prøvene. For noen prøver kunne intensiteten variere fra 0 til 200 000 innen samme dag. Grunnen til dårlig presisjon kan være at reagenset ble dekomponert over tid. Når flasken med MTBSTFA åpnes

kan den ikke stå for lenge før den blir brukt. Den dårlige presisjonen innenfor en dag kan skyldes unøyaktighet under prøveopparbeidingen, eller en liten feil som hadde stor innvirkning på resultatet.

Heptafluorbutansyreanhydrid (HFBA) og Trimetylsilyldiazometan (TMSD)

Et eget eksperiment ble utført for å måle stabiliteten og lineariteten for metoden. Seks paralleller ble analysert av 3-NT og tyrosin med konsentrasjonene 1, 0.1 og 0.01 mg/l og en parallell av 0.5 og 0.05 mg/l ble også analysert. Alle prøvene ble tilsatt internstandard d₃-3-NT (1 mg/l).

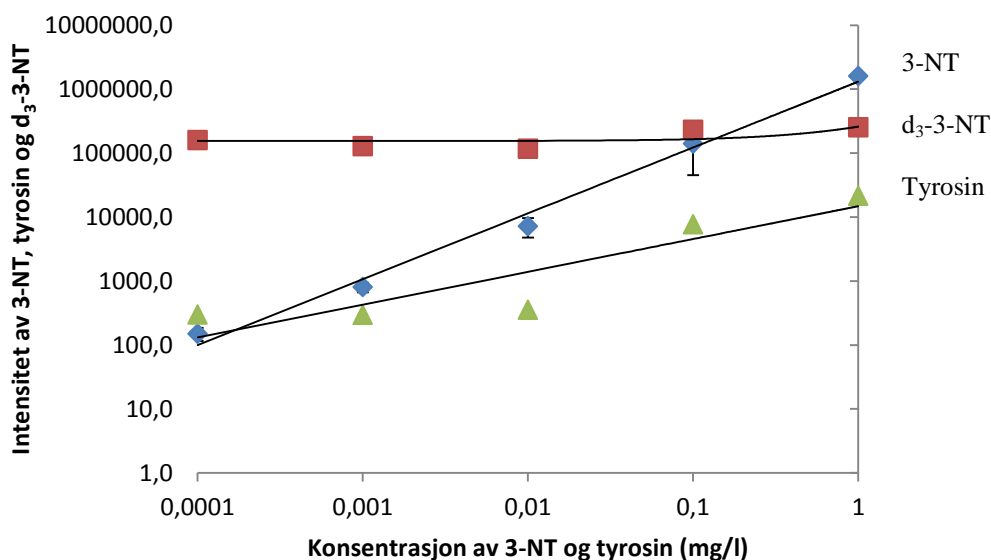
Fra kalibreringskurven ga 3-NT og tyrosin en god linearitet, $R^2 = 0.996$ for 3-NT (Figur 4.4.2 b) og $R^2 = 0.9989$ for tyrosin (Figur 4.4.2 a). Stabilitetstesten innenfor dag viste at intensiteten av derivatene var stabile for noen konsentrasjoner mens ikke stabil for andre. For tyrosinderivatene var CV var under 25% for 0.1 og 0.01 mg/l og for 3-NT var CV under 25% kun for 0.1 mg/l (se vedlegg D).



Figur 4.4.2 - Kalibreringskurve for tyrosin (a) og 3-NT (b).

Et eget forsøk ble utført for å beregne LOD for 3-NT og tyrosin. For tyrosin ble summen av m/z 371 og m/z 443 brukt. LOD ble beregnet ved å fortynne 3-NT og tyrosin i vann fra 1 mg/l til 10^{-4} og 1 mg/l av internstandard (d₃-3-NT) ble tilsatt prøvene. Fra kalibreringskurven ble 3-NT detektert ned til 0.001 mg/l og tyrosin ble detektert ned til 0.01 mg/l (Figur 4.4.3). Internstandarden, d₃-3-NT, ligger omtrent 10 ganger lavere enn punktet for 1 mg/l for 3-NT og den ligger omtrent 10 ganger høyere enn tyrosin 1 mg/l. Målingene av tyrosin ved de laveste konsentrasjonene (0.0001 – 0.01 mg/l) ga den samme intensiteten og toppene er

vanskelig å skille fra bakgrunnsstøyen. LOD ble også beregnet til å være 0.0002 mg/l for 3-NT og 0.02 mg/l for tyrosin med ligning 9 og LOQ ble beregnet til 0.73 µg/l for 3-NT og 0,17 mg/l for tyrosin med ligning 10. Intensiteten av de forskjellige konsentrasjonene finnes i Vedlegg E.



Figur 4.4.3 - Kalibreringskurve for tyrosin, 3-NT og d₃-3-NT. Hvor konsentrasjonen til d₃-3-NT ble holdt konstant (1 mg/l) og konsentrasjonen til tyrosin og 3-NT varierte fra 0.0001 - 1 mg/l.

Kalibreringskurven viste en god linearitet for 3-NT og for d₃-3-NT og ga en LOD på 0.0001 mg/l (0.1 µg/l) for 3-NT. Den beregnede LOD for 3-NT ble beregnet til 0.0002 mg/l som er omtrent samme nivå som fra kalibreringskurven. Fra dette forsøket er LOD mye høyere enn LOD beregnet i Søderling et al (2003), hvor LOD ble beregnet til 0.03 nM (6.8 ng/l), som er nesten 100 ganger lavere enn beregnet i denne oppgave. Ved å sammenligne resultatene fra denne oppgaven med Søderling et al (2003), gir analysen med GC/MS en høyere LOD enn analyser med GC/MS-MS. Som andre artikler har rapportert mangler GC/MS sensitiviteten som trengs for å måle 3-NT i plasmaprøver fra friske personer (Tsikas et al., 2005).

Gjenfinningen av 3-NT fra plasma før og etter SPE ble funnet til å være 100 % (ved hjelp av ligning 8). Vannprøver som ble ekstrahert på Strata-X ble gjenfinningen beregnet til 22.3 %. Noe som tyder på at en del 3-NT forsvinner i ekstraksjonsprosessen.

5 Konklusjon

Fra Deng et al (2002) virket derivatisering med MTBSTFA ut til å være en enkel prosedyre å utføre og den ga gode resultater. Ut fra mine erfaringer, var metoden enkel å utføre, med få steg og heller ikke tidkrevende. Derimot var LOD høy og reproduserbarheten mangelfull. Derivatisering med MTBSTFA er ikke egnet til å bestemme konsentrasjonen av 3-NT i plasmaprøver på grunn av den høye LOD. Konsentrasjonen av 3-NT i friske personer er målt til rundt 14 ng/ml (Frost et al., 2000). Dette er en veldig lav konsentrasjon som denne metoden ikke klarte å detektere.

Derivatisering av tyrosin og 3-NT med HFBA/TMSD ga tydelige signaler i kromatogrammet i SIM. Derivatisering av tyrosin ga to forskjellige produkter, et metylert og et silylert. Utfordringen med prosedyren var at den bestod av flere steg og var tidkrevende. Opprensing ved SPE var veldig tidkrevende og inndamp av eluatet tok lang tid. For å være en biomarkør for nitro-oksidativt stress trenges en sensitiv og selektiv metode for å detektere lave konsentrasjoner av 3-NT som det finnes i humant plasma. Derivatiseringen med HFBA/TMSD kunne detektere konsentrasjoner av 3-NT ned til 1 µg/l, som er en veldig lav konsentrasjon, men for å måle fritt 3-NT i humant plasma er det nødvendig å ha LOD lavere.

Uttesting av forskjellige SPE kolonner viste at Strata X var den best egnete kolonnen for tyrosin og 3-NT. Derivatisering av plasmaprøver som hadde blitt ekstrahert på Strata X viste fine topper i kromatogrammet. Problemet med Strata X var at den ga en høy bakgrunnsstøy på samme retensjonstid og m/z -verdi som 3-NT. Dette førte til at signalet for fritt 3-NT i plasmaprøver ikke kunne bli separert fra bakgrunnsstøyen og dermed ikke bli detektert.

For videre analyser av fritt 3-NT i humant plasma er det nødvendig med en bedre ekstraksjonsmetode, som ikke gir en høy bakgrunnsstøy. Strata X kan brukes som ekstraksjonsmetode, men da bør analysemetoden være mer sensitiv, gjerne med et opprensingstrinn til under derivatiseringen. Ekstraksjon med Strata X og derivatisering med HFBS/TMSD kan utføres på proteinbundet 3-NT i humant plasma, da bundet 3-NT skal ha en høyere konsentrasjon enn fritt 3-NT.

6 Referanser

- Agilent Technologies, V. (2015). Sitert 2015.05.05, from <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/Sample-Preparation/Solid-Phase-Extraction-%28SPE%29/Bond-Elut-C18/Pages/default.aspx>
- Armbruster, D. A., Tillman, M. D., & Hubbs, L. M. (1994). Limit of detection (lod) limit of quantitation (loq) - comparison of the empirical and the statistical, methods exemplified with gc-ms assays of abused drugs. *Clin Chem*, *40*(7), 1233-1238.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., & Gatto, G. J. (2012). *Biochemistry* (7th ed. ed.). New York: Freeman.
- Biesaga, M., Jankowska, A., & Pyrzynska, K. (2005). Comparison of different sorbents for solid-phase extraction of phenoxyalkanoic acid herbicides. *Microchim Acta*, *150*(3-4), 317-322. doi: 10.1007/s00604-005-0359-y
- Celio, S., Troxler, H., Durka, S. S., Chladek, J., Wildhaber, J. H., Sennhauser, F. H., . . . Moeller, A. (2006). Free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensates of children fails as a marker for oxidative stress in stable cystic fibrosis and asthma. *Nitric Oxide*, *15*(3), 226-232. doi: 10.1016/j.niox.2006.06.008
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook* (2nd ed. ed.). Lancaster, Pa: Technomic Publ.
- Crowley, J. R., Yarasheski, K., Leeuwenburgh, C., Turk, J., & Heinecke, J. W. (1998). Isotope dilution mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine in proteins and tissues is facilitated by reduction to 3-aminotyrosine. *Anal Biochem*, *259*(1), 127-135. doi: 10.1006/abio.1998.2635
- Deng, C., Deng, Y., Wang, B., & Yang, X. (2002). Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *780*(2), 407-413.
- Erkoc, S., Erkoc, F., & Sepici-Dincel, A. (2010). Quantum chemical investigation of nitrotyrosine (3-nitro-L-tyrosine) and 8-nitroguanine. *Amino Acids*, *38*(1), 319-327. doi: 10.1007/s00726-009-0253-8
- Frost, M. T., Halliwell, B., & Moore, K. P. (2000). Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem J*, *345 Pt 3*, 453-458.
- Gaut, J. P., Byun, J., Tran, H. D., & Heinecke, J. W. (2002). Artifact-free quantification of free 3-chlorotyrosine, 3-bromotyrosine, and 3-nitrotyrosine in human plasma by electron capture-negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, *300*(2), 252-259. doi: 10.1006/abio.2001.5469
- Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E., & Karlsen, J. (1994). *Kromatografi : separasjon og deteksjon* (3. utg. ed.). Oslo: Universitetsforlaget.
- Helbæk, M., & Godejord, P. A. (2001). *Statistikk for kjemikere*. Trondheim: Tapir.
- Herbert, C. G., & Johnstone, R. A. W. (2003). *Mass spectrometry basics*. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Huq, S., Dixon, A., Kelly, K., & Kallury, K. M. (2005). Novel solid-phase extraction protocol for 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol from urine samples employing a polymeric mixed-mode cation-exchange resin, Strata-X-C, suitable for gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A*, *1073*(1-2), 355-361.
- Jiang, H., & Balazy, M. (1998). Detection of 3-nitrotyrosine in human platelets exposed to peroxynitrite by a new gas chromatography/mass spectrometry assay. *Nitric Oxide*, *2*(5), 350-359. doi: 10.1006/niox.1998.0196

- Jimenez-Martin, E., Ruiz, J., Perez-Palacios, T., Silva, A., & Antequera, T. (2012). Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Free Amino Acids as Their Dimethyl-tert-butylsilyl (TBDMS) Derivatives in Animal Source Food. *J Agri Food Chem*, 60(10), 2456-2463. doi: 10.1021/jf2052338
- Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., Kishimoto, Y., Kitano, M., & Itoh, T. (1996). Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B-Biomed Appli*, 685(2), 343-347. doi: 10.1016/s0378-4347(96)00202-2
- Kaur, H., & Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation - nitrotyrosine in serum and synovial-fluid from rheumatoid patients. *Febs Letters*, 350(1), 9-12. doi: 10.1016/0014-5793(94)00722-5
- Kitson, F. G., Larsen, B. S., & McEwen, C. N. (1996). Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide. San Diego, Calif: Academic Press.
- Lancaster, J. R. (2006). Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: Kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem Res Toxicol*, 19(9), 1160-1174. doi: 10.1021/tx060061w
- Larsen, T. R., Soderling, A. S., Caidahl, K., Roepstorff, P., & Gramsbergen, J. B. (2008). Nitration of soluble proteins in organotypic culture models of Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 52(3), 487-494. doi: 10.1016/j.neuint.2007.08.008
- Mani, A. R., Pannala, A. S., Orié, N. N., Ollosson, R., Harry, D., Rice-Evans, C. A., & Moore, K. P. (2003). Nitration of endogenous para-hydroxyphenylacetic acid and the metabolism of nitrotyrosine. *Biochem J*, 374(Pt 2), 521-527. doi: 10.1042/BJ20030670
- Mayne, S. T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 933s-940s.
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J Chromatogr A*, 1187(1-2), 18-24. doi: 10.1016/j.chroma.2008.02.001
- Moein, M. M., El-Beqqali, A., Abdel-Rehim, A., Jeppsson-Dadoun, A., & Abdel-Rehim, M. (2014). Preparation of monolithic molecularly imprinted polymer sol-gel packed tips for high-throughput bioanalysis: extraction and quantification of L-tyrosine in human plasma and urine samples utilizing liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 967, 168-173. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.07.029
- Nilsen, C. H. (2010). *Chromatography of metabolites in plasma and urine following oral administration of anthocyanin rich capsules*. (Master degree), University of Stavanger, University of Stavanger, Norway. Retrieved from http://idtjeneste.nb.no/URN:NBN:no-bibsys_brage_14627
- Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., & Bartsch, H. (1990). Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem Toxicol*, 28(9), 647-652.
- Pannala, A. S., Mani, A. R., Spencer, J. P., Skinner, V., Bruckdorfer, K. R., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2003). The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radic Biol Med*, 34(5), 576-584.
- Paolo Lucci, Deborah Pacetti, Núñez, O., & Frega, N. G. (2012). Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis. Retrieved 2015.05.03, from <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis>

- Pavlovic, R., Biondi, P. A., Chiesa, L. M., Trutic, N., Abramovic, M., & Santaniello, E. (2012). Different behaviour of 3-nitrotyrosine and tyrosine toward perfluorinated reagents suitable for the one-step preparation of volatile derivatives. *J Serb Chem Soc*, 77(5), 667-683. doi: 10.2298/jsc110304003p
- Phenomenex, S.-X. (2015). Retrieved 2015.05.05, from <https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>
- PubChem, N. (2015). Retrieved 2015.05.09, from <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-tyrosine#section=Top>
- Radi, R. (2013). Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res*, 46(2), 550-559. doi: 10.1021/ar300234c
- Repository, F. C. D. (2015). Retrieved 2015.06.11, from <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/a0691e05.htm#Figure 2>
- Ryberg, H., & Caidahl, K. (2007). Chromatographic and mass spectrometric methods for quantitative determination of 3-nitrotyrosine in biological samples and their application to human samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 851(1-2), 160-171. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.02.001
- Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B. M., Wennig, R., & Millet, M. (2009). Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, 77(4), 1473-1482. doi: 10.1016/j.talanta.2008.09.043
- Schwedhelm, E., Tsikas, D., Gutzki, F. M., & Frolich, J. C. (1999). Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosine in human plasma at the basal state. *Anal Biochem*, 276(2), 195-203. doi: 10.1006/abio.1999.4361
- Shigenaga, M. K., Lee, H. H., Blount, B. C., Christen, S., Shigeno, E. T., Yip, H., & Ames, B. N. (1997). Inflammation and NO_x-induced nitration: Assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3211-3216. doi: 10.1073/pnas.94.7.3211
- Sigma-Aldrich, S. (2015). Retrieved 2015.05.05, from <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9644513>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2004). *Fundamental of Analytical Chemistry*: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Soderling, A. S., Hultman, L., Delbro, D., Hojrup, P., & Caidahl, K. (2007). Reduction of the nitro group during sample preparation may cause underestimation of the nitration level in 3-nitrotyrosine immunoblotting. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 851(1-2), 277-286. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.02.036
- Soderling, A. S., Ryberg, H., Gabrielsson, A., Larstad, M., Toren, K., Niari, S., & Caidahl, K. (2003). A derivatization assay using gaschromatography/negative chemical ionization tandem mass spectrometry to quantify 3-nitrotyrosine in human plasma. *J Mass Spectrom*, 38(11), 1187-1196. doi: 10.1002/jms.543
- Spanik, I., Horvathova, G., Janacova, A., & Krupcik, J. (2007). On the use of solid phase ion exchangers for isolation of amino acids from liquid samples and their enantioselective gas chromatographic analysis. *J Chromatogr A*, 1150(1-2), 145-154. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.070
- Sun, Y. C., Chang, P. Y., Tsao, K. C., Wu, T. L., Sun, C. F., Wu, L. L., & Wu, J. T. (2007). Establishment of a sandwich ELISA using commercial antibody for plasma or serum 3-nitrotyrosine (3NT). Elevation in inflammatory diseases and complementary between 3NT and myeloperoxidase. *Clin Chim Acta*, 378(1-2), 175-180. doi: 10.1016/j.cca.2006.11.014

- Tsikias, D., & Duncan, M. W. (2014). Mass spectrometry and 3-nitrotyrosine: strategies, controversies, and our current perspective. *Mass Spectrom Rev*, 33(4), 237-276. doi: 10.1002/mas.21396
- Tsikias, D., Mitschke, A., Suchy, M. T., Gutzki, F. M., & Stichtenoth, D. O. (2005). Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 827(1), 146-156. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.03.039
- Tsikias, D., Trettin, A., Zorner, A. A., & Gutzki, F. M. (2011). In-source formation of N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), the putatively toxic acetaminophen (paracetamol) metabolite, after derivatization with pentafluorobenzyl bromide and GC-ECNICI-MS analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(17-18), 1476-1484. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.01.025
- Viera, L., Ye, Y. Z., Estevez, A. G., & Beckman, J. S. (1999). Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Nitric Oxide, Pt C*, 301, 373-381.
- Wang, W., Jian, Z., Guo, J., & Ning, X. (2014). Increased levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. *Life Sci*, 117(1), 19-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.012>
- Yi, D., Ingelse, B. A., Duncan, M. W., & Smythe, G. A. (2000). Quantification of 3-nitrotyrosine in biological tissues and fluids: generating valid results by eliminating artifactual formation. *J Am Soc Mass Spectrom*, 11(6), 578-586. doi: 10.1016/S1044-0305(00)00113-6

Vedlegg

Vedlegg A

A-1 – Kombinasjoner testet for de ulike trinnene for SPE kolonnen Supelco C18

| Trinn 1: Kondisjonering | Trinn 2: Prøvetilsetning | Trinn 3: Vask | Trinn 4: Eluering | Resultat |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------|
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml eddiksyre | 3 ml Tyr løst i PBS buffer | - | 3 ml 25% metanol | Litt tyr etter prøvetilsetningen, mest i eluatet |
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml 1% TFA | 2 ml Tyr i PBS | 2ml vann | 2 ml 25% metanol | Tyr ut i prøve-Tilsetningen |
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml 1% TFA | 2 ml Tyr i PBS | 2 ml TFA | 2 ml 25% metanol | Mest ut i trinn 2, litt i eluatet |
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml 0.1% TFA | 2 deler Tyr i PBS og 3 deler 0.1 % TFA | - | 2 ml 25% metanol | Sur prøven feste seg på kolonnen. |
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml 0.1% TFA | 3:2 Tyr og 1% TFA | 2 ml 0.1% TFA | 2 ml Metanol 25 % | Litt ut i steg 2 og stor del i steg 3 |
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml 0.1% TFA | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 10 % ammoniumacetat | 3 ml 25% metanol | Ut i vaskingen |
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml 0.1% TFA | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml vann | 3 ml 25% metanol | Tyr ut med vask |
| 2ml MeOH 100% 2ml vann 6ml 0.1% TFA | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml TFA 0.005% | 3 ml 25% metanol | Mesteparten ut i eluat, men liten mengde forhold til ren prøve |
| 2ml metanol 100% 2ml vann 6ml 0.1% TFA | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3ml 0.5% TFA | 3 ml 25% metanol | Liten del ut i vask, resten eluert ut |

A-2 – Kombinasjoner testet for de ulike trinnene for SPEkolonnen Strata X-C

| Trinn 1: Kondisjonering | Trinn 2: Prøvetilsetning | Trinn 3: Vask | Trinn 4: Eluat | Resultat |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 0.5% TFA | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Ut I eluatet |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 100% Metanol | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Litt ut I vask, mest ut I eluatet |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml aceton | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Ustabilt resultat |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 0.01% HCl i metanol | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Litt ut I vask, mesteparten I eluatet |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 0.1 M HCl i metanol | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Mer Tyr i vaskingen enn I eluatet |

| | | | | |
|------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 2 ml 100 % metanol | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Mesteparten ut I eluatet, noe I vaskingen |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 0.5% TFA i metanol | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Tyr ut I eluatet. |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 0.5% TFA i metanol | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Tyr ut I eluatet. |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 Tyr og 1% TFA | 3 ml 0.5% TFA i vann | 3 ml 5% NH ₄ OH/MeOH (v/v) | Litt tyrosin ut i vaskeløsningen |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 NTyr og 1% TFA | 3 ml 15% metanol + 1% TFA | 3 ml 5% NH ₄ OH i 25% MeOH | Litt Ntyr ut i vask |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 NTyr og 1% TFA | 3 ml 20% metanol + 1% TFA | 3 ml 5% NH ₄ OH i 25% MeOH | Litt Ntyr ut i vask |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 NTyr og 1% TFA | 3 ml 25% metanol + 1% TFA | 3 ml 5% NH ₄ OH i 25% MeOH | Mest Ntyr ut i eluatet |
| 2ml metanol 100% 2ml vann | 3:2 NTyr og 1% TFA | 3 ml 50% metanol + 1% TFA | 3 ml 5% NH ₄ OH i 25% MeOH | Litt Ntyr ut i vask |

A-3 – Kombinasjoner testet for de ulike trinnene for SPEkolonnen Strata X

| Trinn 1: Kondisjonering | Trinn 2: Prøve | Trinn 3: Vask | Trinn 4: Eluat | Resultat |
|-------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 5) | 3 ml prøve (pH 5) | - | - | Ut I fase 1 |
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 3) | 3 ml prøve (pH 3) | - | - | Lite ut I fase 1 |
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 2) | 3 ml prøve (pH 2) | - | - | Ut I fase 1 |
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 3) | 3 ml prøve (pH 3) | 2 ml 5% MeOH og 95% ammonium format (pH 3) | - | Mye ut i vask |
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 3) | 3 ml prøve (pH 3) | 2 ml ammonium formate (pH 3) | - | Ut i vask |
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 3) | 3 ml prøve (pH 3) | 2 ml PBS (pH 3) | - | Litt ut i vask |
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 3) | 3 ml prøve (pH 3) | 2 ml PBS (pH 2) | - | Sitter igjen på kolonnen etter vask |
| 2 ml MeOH 2 ml PBS (pH 3) | 3 ml prøve (pH 3) | 2 ml PBS med 5% MeOH (pH 2) | MTBE og etylacetate. | Tilsetter reagens. Ville ikke elueres ut |
| 2 ml MeOH 2 ml H ₂ O 3 ml TFA (pH 2) | 3 ml prøve (pH 3) | 3 ml 0.1% TFA (pH 2) | 1.5 ml H ₂ O/MeOH (1:1, v/v) | NT ut I eluatet |
| 2 ml MeOH 2 ml H ₂ O 3 ml TFA (pH 2) | 3 ml prøve (pH 3) | 3 ml 0.1% TFA + 10% MeOH (pH 2) | 1.5 ml H ₂ O/MeOH (1:1, v/v) | Liten del ut I vaskeløsningen |
| 2 ml MeOH 2 ml H ₂ O 3 ml TFA (pH 2) | 3 ml prøve (pH 3) | 3 ml 0.1% TFA + 5% MeOH (pH 2) | 1.5 ml H ₂ O/MeOH (1:1, v/v) | Litt ut I vaskeløsningen |
| 2 ml MeOH 2 ml H ₂ O 3 ml TFA (pH 2) | 3 ml prøve (pH 3) | 3 ml 0.1% TFA + 1% MeOH (pH 2) | 1.5 ml H ₂ O/MeOH (1:1, v/v) | Mesteparten ut I eluat liten del ut I vaskeløsningen |

| | | | | |
|-------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|
| 2 ml MeOH 2 ml H ₂ O 3 ml TFA (pH 3) | 3 ml prøve (pH 3) | 3 ml 0.1% TFA + 10% MeOH (pH 3) | 1.5 ml H ₂ O/MeOH (1:1, v/v) | Mestepart ut I vaskeløsningen |
|-------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|

Vedlegg B – Ultrafiltrering

Prøve 1

| Aminosyre | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Gj.snitt | SD | CV |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------|----|
| Tyrosin | 42148 | 70127 | 138644 | 83640 | 49647 | 59 |
| D ₃ -NT | 24399 | 38543 | 46589 | 36510 | 11234 | 31 |

Prøve 2

| Aminosyre | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Gj.snitt | SD | CV |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------|----|
| Tyrosin | 287878 | 232930 | 310543 | 277117 | 39910 | 14 |
| D ₃ -NT | 173512 | 180242 | 114610 | 156121 | 36107 | 23 |

Prøve 3

| Aminosyre | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Gj.snitt | SD | CV |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|----------|--------|----|
| Tyrosin | 315224 | 82544 | 464962 | 287577 | 192702 | 67 |
| D ₃ -NT | 109330 | 26190 | 164356 | 99959 | 69558 | 70 |

Prøve 4

| Aminosyre | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Gj.snitt | SD | CV |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------|----|
| Tyrosin | 44034 | 31268 | 79218 | 51507 | 24833 | 48 |
| D ₃ -NT | 29071 | 21371 | 29643 | 26695 | 4620 | 17 |

Vedlegg C – Kalibreringskurve MTBSTFA

| Konsentrasjon (mg/l) | Intensitet tyrosin | Intensitet 3-NT |
|----------------------|--------------------|-----------------|
| 0.001 | 20 | 0 |
| 0.001 | 0 | 0 |
| 0.01 | 151 | 0 |
| 0.01 | 185 | 0 |
| 0.1 | 3208 | 260 |
| 0.1 | 3904 | 357 |
| 0.5 | 51902 | 4628 |
| 0.5 | 28377 | 2606 |
| 1.0 | 76418 | 7500 |
| 1.0 | 95293 | 10653 |

Vedlegg D – Stabilitetstest for HFBA/TMSD

Måleparalleller for total tyrosin (m/z 371 og 443). Konsentrasjonene 0.5 og 0.05 mg/l ble kun analysert i en parallell.

| Konsentrasjon (mg/l) | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Parallell 4 | Parallell 5 | Parallell 6 | Gj.snitt | SD | CV |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|------|----|
| 1 | 13408 | 20748 | 27562 | 29068 | 28146 | 10411 | 21557 | 8089 | 38 |
| 0.5 | 10449 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 0.1 | 1320 | 1626 | 1756 | 1286 | 1530 | 1419 | 1490 | 182 | 12 |
| 0.05 | 921 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 0.01 | 307 | 512 | 289 | 331 | 340 | 363 | 357 | 80 | 23 |

Måleparalleller for 3-NT. Konsentrasjonene 0.5 og 0.05 mg/l ble kun analysert i en parallell.

| Konsentrasjon (mg/l) | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Parallell 4 | Parallell 5 | Parallell 6 | Gj.snitt | SD | CV |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|--------|----|
| 1 | 190711 | 285837 | 528041 | 503256 | 408494 | 137775 | 342352 | 162964 | 48 |
| 0.5 | 169796 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 0.1 | 26781 | 30169 | 30901 | 25603 | 29170 | 22010 | 27439 | 3338 | 12 |
| 0.05 | 16756 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 0.01 | 1247 | 5219 | 3937 | 3351 | 4282 | 4160 | 3699 | 1346 | 36 |

Vedlegg E – Kalibreringskurve HFBA/TMSD

3-NT

| Konsentrasjon (mg/l) | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Parallell 4 | Gj.snitt | SD | CV |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|--------|----|
| 1 | 1371709 | 1576942 | 1608587 | 1855776 | 1603254 | 198411 | 12 |
| 0.1 | 207706 | 2980 | 149197 | 201507 | 140348 | 95264 | 68 |
| 0.01 | 8696 | 8281 | 3585 | 8262 | 72066 | 2422 | 34 |
| 0.001 | 877 | 903 | 834 | 599 | 803 | 139 | 17 |
| 0.0001 | 175 | 168 | 99 | 158 | 150 | 25 | 23 |

Tyrosin

| Konsentrasjon (mg/l) | Parallell 1 | Parallell 2 | Parallell 3 | Parallell 4 | Gj.snitt | SD | CV |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|------|----|
| 1 | 72715 | 85412 | 83300 | - | 80476 | 6803 | 9 |
| 0.1 | 6587 | 7266 | 8453 | 8554 | 7715 | 953 | 12 |
| 0.01 | 970 | 347 | 194 | 290 | 450 | 352 | 78 |
| 0.001 | 525 | 314 | 199 | 147 | 296 | 168 | 57 |
| 0.0001 | 310 | 588 | 154 | 146 | 300 | 207 | 69 |