

# ONTWIKKELING VAN EEN LC-MS/MS METHODE VOOR SIMULTANE BEPALING VAN CORTISONE EN CORTICOSTERONE IN SERUM

Elise DESMET

Studentennummer: 01305119

Promotor: Prof. Dr. Apr. C. Stove

Vakgroep bioanalyse

Laboratorium voor Hormonologie, UZ Gent

Commissarissen: Dr. T. Fiers en Dr. K. Van Uytfanghe

Masterproef in de richting Master in de Farmaceutische Zorg

Academiejaar: 2016 - 2017





# ONTWIKKELING VAN EEN LC-MS/MS METHODE VOOR SIMULTANE BEPALING VAN CORTISONE EN CORTICOSTERONE IN SERUM

Elise DESMET

Studentennummer: 01305119

Promotor: Prof. Dr. Apr. C. Stove

Vakgroep bioanalyse

Laboratorium voor Hormonologie, UZ Gent

Commissarissen: Dr. T. Fiers en Dr. K. Van Uytfanghe

Masterproef in de richting Master in de Farmaceutische Zorg

Academiejaar: 2016 – 2017



Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.  
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.  
Ghent University, Library, 2021.

## SAMENVATTING

Afwijkingen in de normale fysiologische glucocorticoïd concentraties kunnen aanleiding geven tot diverse endocriene stoornissen. De bepaling van deze glucocorticoïden gebeurt tegenwoordig op twee manieren, namelijk via immunoanalyse en massaspectrometrie. Het doel van deze masterproef is de ontwikkeling van een vloeistofchromatografie-tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS) methode voor simultane bepaling van cortisone en corticosterone in serum. De gelijktijdige bepaling heeft als doel de endocriene stoornissen beter te definiëren en een onderscheid te maken tussen endogene productie en exogene toediening van glucocorticoïden. Het vertrekpunt is de bestaande cortisol-testosteron methode. Deze methode bestaat uit een vloeistof-vloeistofextractie gevolgd door een chromatografische stap. De LC-MS/MS heeft een positieve *atmospheric pressure chemical ionisation* als ionisatiebron en opereert in de *multiple reaction monitoring* modus. Tijdens de tuning worden de verschillende massa transities met hun component afhankelijke parameters bepaald. Nadien wordt een beperkt validatie onderzoek uitgevoerd.

De bepaalbaarheids grens voor cortisone en corticosterone is respectievelijk 2,29 ng/mL en 215,9 pg/mL. Er wordt een intra-run variatiecoëfficiënt vastgesteld <7,50% voor cortisone en <15% voor corticosterone, een inter-run variatiecoëfficiënt ontbreekt nog. Aan de hand van de recovery's en de Passing-Bablok regressie analyses wordt de meest geschikte interne standaard gekozen voor elke analiet, namelijk interne standaard cortisone-d8 voor cortisone en interne standaard corticosterone-d4 voor corticosterone. De recovery's van beide analieten voldoen aan de voorwaarden volgens FDA richtlijnen. Er wordt een matrix-effect waargenomen bij cortisone met interne standaard cortisone-d8. Dit is een beperking van de analytische methode. De massa transitie 361,2/163,1 van cortisone en 347,3/329,3 van corticosterone zijn de meeste gevoelige transities en worden gebruikt voor kwantificatie. De massa transitie 361,2/120,8 van cortisone en de massa transitie 347,3/121,0 fungeren voor kwalificatie van de analieten. De implementatie van de aangepaste acquisitie methode in urine geeft goede resultaten. De recovery's voldoen aan de FDA voorwaarden en de ratio's van cortisol/cortisone liggen binnen het referentiebereik.

Deze aangepaste acquisitie methode heeft het vermogen om simultaan cortisol, cortisone en corticosterone te identificeren in serum en potentieel urine. Voor toepassing van deze methode is het noodzakelijk dat de inter-run variatiecoëfficiënt nog wordt bepaald. Ook dient de eventuele impact van het matrix-effect verder geëvalueerd te worden om te zien of dit bij sommige stalen klinisch belangrijk kan zijn. Bovendien is het belangrijk te zoeken naar externe kwaliteitsevaluaties. Verdere uitwerking van deze methode in urine heeft een gunstige prognose.

## **DANKWOORD**

*Het schrijven van deze thesis heeft mij een brede kijk gegeven op het wetenschappelijk werk in de praktijk.*

*Daarvoor wil ik een aantal personen bedanken.*

*In de eerste plaats dank ik mijn begeleider Eric Vander Sypt voor de dagelijkse begeleiding en de uitgebreide uitleg bij mijn vele vragen.*

*Ook wil ik Brigitte Bernaert bedanken voor de vele hulp tijdens de praktische uitvoeringen.*

*Daarnaast dank ik Dr. Tom Fiers voor het nalezen van de tekst op taalkundig en inhoudelijk vlak.*

*Verder dank ik Prof. Dr. Apr. Christophe Stove voor de algemene begeleiding van deze masterproef.*

*Graag bedank ik ook mijn collega-thesisstudenten voor de leuke middagpauzes.*

*Ten slotte gaat een speciale dank naar mijn ouders, broer en vriend voor de vele steun om deze thesis tot een goed einde te brengen.*

## INHOUDSOPGAVE

Samenvatting

Dankwoord

Inhoudsopgave

Lijst met gebruikte afkortingen

<b>1.</b>	<b>INLEIDING</b> .....	<b>1</b>
1.1.	SYNTHESE VAN CORTISOL, CORTISONE EN CORTICOSTERONE .....	1
1.2.	EFFECTEN VAN CORTISOL, CORTISONE EN CORTICOSTERONE .....	5
1.3.	ONTREGELING VAN GLUCOCORTICOID CONCENTRATIES .....	7
1.4.	BEPALINGSMETHODEN VAN GLUCOCORTICOIDEN .....	9
1.4.1.	Immunoassay .....	9
1.4.2.	Massaspectrometrie .....	11
<b>2.</b>	<b>OBJECTIEVEN</b> .....	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALEN EN METHODEN</b> .....	<b>15</b>
3.1.	MATERIALEN .....	15
3.1.1.	Solventen en hulpstoffen .....	15
3.1.2.	Standaarden en interne standaarden .....	15
3.1.3.	Toestellen en hulpmiddelen .....	15
3.1.4.	Bereide reagentia .....	16
3.2.	METHODEN .....	18
3.2.1.	Staalvoorbereiding .....	18
3.2.2.	Vloeistofchromatografie .....	20
3.2.3.	Tandem massaspectrometrie .....	22
3.2.4.	Tuning .....	25

3.2.5.	Validatie .....	26
3.2.5.1.	Bepaalbaarheidsgrens.....	26
3.2.5.2.	Imprecisie .....	26
3.2.5.3.	Onjuistheid .....	27
3.2.5.4.	Matrix-effect.....	27
4.	RESULTATEN.....	29
4.1.	SERUM .....	29
4.1.1.	Tuning .....	29
4.1.2.	Imprecisie .....	29
4.1.3.	Onjuistheid.....	32
4.1.4.	Matrix-effect.....	37
4.1.5.	Methode vergelijking: Passing-Bablok regressie .....	37
4.2.	URINE .....	40
4.2.1.	Onjuistheid.....	40
4.2.2.	Ratio cortisol/cortisone.....	41
5.	DISCUSSIE.....	42
6.	CONCLUSIE.....	45
7.	LITERATUURLIJST .....	46

Addendum



## LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

11 $\beta$ -HSD	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
ACTH	Adrenocorticotrop hormone
Allo-THF	5 $\alpha$ -tetrahydrocortisol
AME	Apparent Mineralocorticoid Excess
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
APPI	Atmospheric pressure photoionisation
B	Corticosterone
CAH	Congenitale Adrenale Hyperplasie
CBG	Corticosteroid-binding-globuline
CE	Collisie energie
CLIA	Chemiluminescente immunoassay
cps	Counts per second
CRH	Corticotropine-releasing hormone
CS	Cushing's syndrome
CXP	Cell exit potential
CYP450sc	Cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage enzyme
Dc	Gelijkstroom
DP	Declustering potential
E	Cortisone
ECLIA	Elektrochemiluminescente immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP	Entrance potential
ESI	Electrospray ionisation
F	Cortisol
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Gaschromatografie-massaspectrometrie

GR	Glucocorticoïdreceptor
HPA-as	Hypothalamus-hypofyse-bijnier-as
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IA	Immunoassay
Intra-CV	Intra-run variatiecoëfficiënt
IS	Interne standaard
LC-MS/MS	Vloeistofchromatografie-massaspectrometrie
LLE	Vloeistof-vloeistofextractie
LoQ	Limit of quantification
m/z	Massa-over-ladingverhouding
ME	Matrix-effect
MR	Mineralocorticoïdreceptor
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massaspectrometrie
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetaat
psi	Pounds per square inch
Q	Quadrupool
r	Correlatiecoëfficiënt
RE	Recovery
Rf	Wisselstroom
RIA	Radioimmunoassay
RP	Reversed Phase
rpm	Revolutions per minute
T <sub>3</sub>	Tri-joodthyronine
T <sub>4</sub>	Thyroxine
THE	Tetrahydrocotisone
THF	5β-tetrahydrocortisol
TSH	Thyroid-stimulerend hormoon
VP	Vasopressine

## 1. INLEIDING

Hormonen worden gesynthetiseerd door de endocriene klieren. Vanuit de bloedbaan migreren de chemische boodschappers naar de doelcellen waar specifieke hoge affiniteitsreceptoren zich bevinden. De secretie van de hormonen wordt gestuurd door de mechanismen van de homeostase, die actief zijn in het endocriene systeem. Een biologische reactie wordt uitgelokt of gelimiteerd door het gevraagde hormoon die zijn eigen secretie gaat regelen via een feedbacksysteem [1].

Hormonen worden opgesplitst in peptide, steroïde en aminozuurderivaat hormonen. Peptide hormonen zoals insuline hebben membraangebonden receptoren, terwijl steroïde hormonen lipofiel zijn door een cyclopentanoperhydrofenanthreen of steraan genaamd in hun structuur. Een steraan is samengesteld uit drie cyclohexanen A, B, C en een cyclopentane D en zijn genummerd in een specifieke volgorde. Door hun structuur kunnen ze diffunderen doorheen de dubbele fosfolipide laag van de cel om de receptoren in het cytoplasma of in de kern te bereiken. Bij de aminozuurderivaat hormonen wordt er een verdere opsplitsing gemaakt, die afhankelijk is van het afgeleide aminozuur. De thyroïd hormonen en de catecholamines zijn tyrosine derivaten. Melatonine en serotonine zijn afkomstig van het aminozuur tryptofaan [1,2].

Er zijn drie hoofdklassen van de steroïde hormonen in de bijnier: glucocorticoïden, mineralocorticoïden en sekssteroïden. Cortisol, cortisone en corticosterone zijn de bekendste glucocorticoïden, waarvan cortisol het meest voorkomt. De glucocorticoïden oefenen een divers aantal fysiologische effecten uit door binding op de glucocorticoïdreceptor (GR). Aldosteron behoort tot de mineralocorticoïden en zal binden op de mineralocorticoïdreceptor (MR) om op die manier de zout- en waterbalans te reguleren. Voor de sekssteroïden vormen dehydroepiandrosteron en androsteendion de belangrijkste uitgangssteroïden voor de androgenen. Hieruit ontstaat in de testes testosteron en in de eierstokken oestradiol. Ook progesteron wordt gevormd in de eierstokken. Verder behoort vitamine D ook tot de steroïde hormonen. Toch is hun structuur licht verschillend, want de koolstofverbinding tussen nummer 9 en 10 is verbroken [1,3].

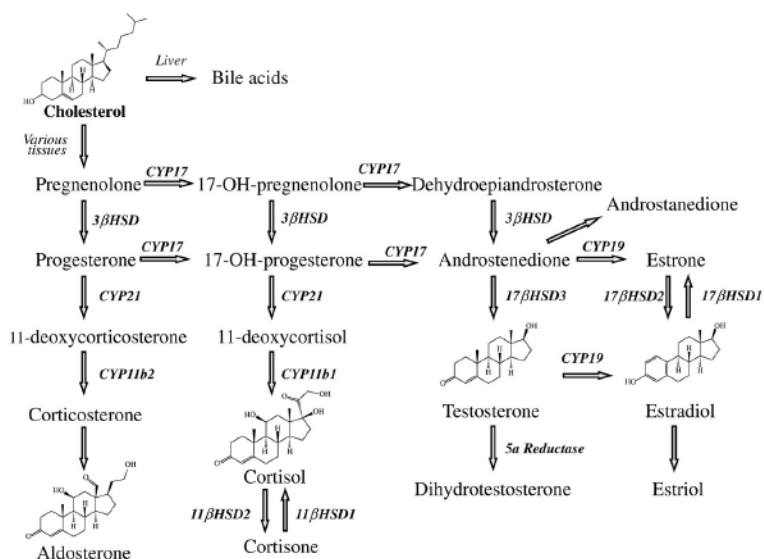
### 1.1. SYNTHESE VAN CORTISOL, CORTISONE EN CORTICOSTERONE

De steroïdogeneses gebeurt in de bijnier (zie figuur 1.1). De steroïde hormonen worden allemaal gesynthetiseerd uit een gemeenschappelijke precursormolecule cholesterol. Door een cascade aan enzym-

gerelateerde reacties worden veel verschillende steroïde hormonen gevormd. De enzymen worden opgesplitst in de cytochrom P450 heem-bevattende proteïnen en de hydroxysteroid dehydrogenasen. Afhankelijk van hun functie zijn ze gelokaliseerd in het endoplasmatisch reticulum of in de mitochondriën [3].

In dit onderzoek wordt de focus gelegd op de synthese van de glucocorticoiden: specifiek van cortisol (F), cortisone (E) en corticosterone (B). De eerste stap van de synthese is de omzetting van cholesterol naar pregnenolone door het *cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage enzyme (CYP450scc)*. Deze snelheidsbepalende stap is een hydrolytische afsplitsing van de 6-C-lange keten van de 27-koolstof houdende cholesterol molecule. De snelheid van de stap wordt bepaald door aflevering van het substraat cholesterol op de bindingsplaats van CYP450scc en deze is gelimiteerd. In het endoplasmatisch reticulum wordt vervolgens pregnenolone geconverteerd tot progesteron door het 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD). Dit wordt dan gehydroxyleerd tot 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron door het CYP17. Zowel het progesteron en het 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron wordt omgezet respectievelijk naar 11-deoxycorticosterone en 11-deoxycortisol door CYP21A2 [4].

Verder in de mitochondriën wordt 11-deoxycorticosterone gemetaboliseerd tot corticosterone door het CYP11B2 en daaruit ontstaat aldosteron. Het 11-deoxycortisol wordt geconverteerd naar cortisol door het CYP11B1. De reactiemechanismen van cholesterol tot aldosteron vinden plaats in de zona glomerulosa van de adrenale cortex. De volledige cascaderactie van cholesterol tot corticosterone of tot het eindproduct cortisol speelt zich af in de zona fasciculata van de adrenale cortex [4].

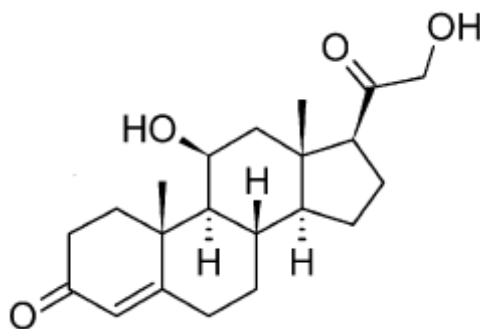


Figuur 1.1: Biosynthese van steroïde hormonen [5].

Nadien kan er interconversie optreden van het actieve cortisol naar het inactieve cortisone door middel van het 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD). Het type 1 van 11 $\beta$ -HSD zorgt voor de vorming van cortisol doordat het fungeert als een 11-oxo-reductase. Dit enzym komt voornamelijk voor in de lever, de beenderen en het vetweefsel. Daarentegen werkt type 2 als een 11 $\beta$ -dehydrogenase en converteert cortisol tot cortisone. Type 2 is vooral aanwezig in nieren, longen, colon, zweet- en speekselklieren en placenta. De ratio van het vrije cortisol/cortisone in de urine reflecteert de activiteit van type 2 11 $\beta$ -HSD [6]. De referentiewaarden van cortisol en cortisone in urine worden weergegeven in tabel 1.1. In de publicatie van Antonelli *et al.* wordt een referentiebereik van de ratio F/E gerapporteerd van 0,14 tot 1,09 [7].

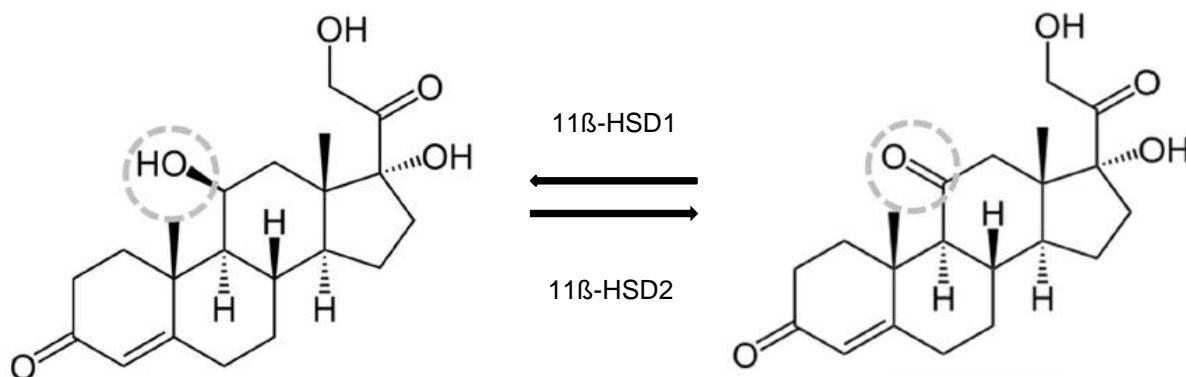
Tenslotte wordt cortisol en cortisone vooral gemetaboliseerd door het 5 $\alpha$ - en 5 $\beta$ - reductase samen met het 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase in de tetrahydrometabolieten: tetrahydrocortisone (THE), 5 $\beta$ -tetrahydrocortisol (THF) en 5 $\alpha$ -tetrahydrocortisol (allo-THF). Deze conjugatie gebeurt overwegend in de lever, waardoor de ratio van [THF + allo-THF]/ THE een indicatie geeft over de werking van type 1 11 $\beta$ -HSD. Er worden ook nog andere metabolieten gevormd. Het 11 $\beta$ -HSD heeft een cruciale rol in de metabolisatie van cortisol. Op die manier is er controle over de binding van cortisol op de GR en kan de MR beschermd worden tegen foutieve bezetting door cortisol. Veranderingen in deze ratio's zijn weerspiegeld in verschillende ziektes [6].

De structuurformule van corticosterone (zie figuur 1.2), ook 17-deoxycortisol genoemd, is C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>. Deze molecule heeft een moleculair gewicht van 346,47 g/mol [8].



Figuur 1.2: Chemische structuur van corticosterone [9].

De structuurformule van cortisol, ook hydrocortisone genoemd, is  $C_{21}H_{30}O_5$ , met corresponderend moleculair gewicht van 362,47 g/mol. Voor cortisone is de structuurformule  $C_{21}H_{28}O_5$  (zie figuur 1.3) en het moleculair gewicht 360,45 g/mol [8].



**Figuur 1.3: Chemische structuur van cortisol (links) en cortisone (rechts) [10].**

De hypothalamus-hypofyse-bijnier-as (HPA-as) regelt de secretie van de glucocorticoïden door middel van een neuro-endocrien feedback systeem. De hypothalamus produceert het corticotropine-releasing hormoon (CRH), vasopressine (VP) en oxytocine. Deze hypothalamische factoren zullen energetisch de corticotrope cellen van de adenohypofyse activeren tot vrijstelling van adrenocorticotroop hormoon (ACTH). Het ACTH zal op zijn beurt de steroïdogenese stimuleren. De glucocorticoïden regelen hun eigen secretie door hun negatieve feedback op de hypothalamus en de hypofyse. Hierdoor ontstaan er gedaalde levels van CRH en ACTH. De activiteit van de HPA-as wordt beïnvloed door stress (fysiek of ervaringen) en het circadiaans ritme [11]. Fysieke inspanning bijvoorbeeld bij sporters zorgt voor de activatie van de HPA-as, waardoor er verhoogde plasmalevels van de glucocorticoïden zoals cortisol ontstaan. Dit is sterk afhankelijk van duur en intensiteit van de oefening [12].

In niet-stressvolle situaties bepaalt het circadiaans ritme de pulsatiele secretie van CRH en VP met een frequentie van twee tot drie keer per uur. Afhankelijk van de slaap-waak cyclus, de licht-donker cyclus en de eetpatronen zullen de glucocorticoïde levels in de lichaamsvochten bijvoorbeeld in het serum variëren (zie tabel 1.1). De cortisol levels zijn het hoogst in de morgen, dalen gedurende de dag en zijn het laagst om middernacht. Na een paar uur slaap stijgen de cortisol levels opnieuw. Het circadiaans ritme wordt verstoord door acute stress. De CRH en VP pulsaties nemen duidelijk toe, resulterend in verhoogde cortisol levels. Cortisol wordt dan ook het stresshormoon genoemd [12,13].

**Tabel 1.1: Referentiewaarden van cortisol, cortisone en corticosterone in serum en cortisol en cortisone in urine [14,15].**

Volwassen referentiewaarden voor cortisol, serum	
VM	4,6-20,6 µg/dL
NM	1,8-13,6 µg/dL
Volwassen referentiewaarden voor cortisone, serum	
VM	1,2-3,5 µg/dL
NM	0,6-2,8 µg/dL
Leeftijd, tijdstip en referentiewaarden voor corticosterone, serum	
1-16 jaar, 's morgens	135-1860 ng/dL
1-16 jaar, 's avonds	70-620 ng/dL
17 jaar en ouder, 's morgens	130-820 ng/dL
17 jaar en ouder, 's avonds	60-220 ng/dL
Volwassen referentiewaarden voor cortisol, urine	
Man	4,2-60 µg/24h
Vrouw	3,0-43 µg/24h
Volwassen referentiewaarden voor cortisone, urine	
Man	17-141 µg/24h
Vrouw	15-122 µg/24h

## 1.2. EFFECTEN VAN CORTISOL, CORTISONE EN CORTICOSTERONE

De effecten van de glucocorticoiden worden beïnvloed door de hoge affiniteit, lage capaciteit MR en de lage affiniteit, hoge capaciteit GR. De MR is alleen aanwezig in de perifere doelweefsels van aldosteron zoals de nier en het colon en is beperkt in de hersenen. De GR bevindt zich in heel veel perifere weefsels en is wijdverspreid in de hersenen [11].

Cortisol, het belangrijkste glucocorticoid, speelt een rol in het metabolisme van koolhydraten, proteïnen en lipiden. Cortisol bevordert de glycogeendepositie in de lever, waardoor de gluconeogenese wordt gestimuleerd. De opname van glucose wordt echter in de perifere weefsels geïnhibeerd. Ook wordt de lipolyse geactiveerd in het vetweefsel, dit leidt tot de vrijstelling van vrije vetzuren. Hierdoor stijgen de spiegels van het totale cholesterol en van de triglyceriden. Daarbij is er een permissief effect op glucagon. Dit leidt samen tot insuline resistentie en verhoogde glucose concentraties in het bloed [3].

Zowel in de spier, in de huid als in het connectief weefsel kunnen er katabolische wijzigingen optreden door glucocorticoïden zoals belemmering van de epidermale celdeling, vermindering van collageen synthese en reductie van spieropbouw [3].

De invloed van de glucocorticoïden op het metabolisme van het been en calcium is te wijten aan de inhibitie van de osteoblasten, de malabsorptie van calcium in de darm en een verhoogde renale calcium excretie. Osteoporose is een vaak voorkomend symptoom bij het Cushing's syndroom, zie deel 1.3. Verder zorgen de glucocorticoïden voor een verhoging van de bloeddruk door in te werken op de nieren en het bloedvatenstelsel. Er ontstaat een verhoogde gevoeligheid voor de vasopressoren en een gedaalde stikstofmonoxide gemedieerde dilatatie in het glad vasculair spierweefsel. In de nier kan cortisol door te binden op MR zoutretentie en kaliumverlies veroorzaken. Een frequent ziekteverschijnsel is hypokaliëmisches alkalose die ziekten zoals Cushing's syndroom en ectopische ACTH tumor typeren [3].

Het immuunsysteem en de anti-inflammatoire reacties worden door de glucocorticoïden op verschillende manieren onderdrukt. Het aantal lymfocyten wordt sterk verminderd in het perifere bloed, doordat er zich een herverdeling voordoet van het intravasculaire gedeelte naar het beenmerg en de perifere lymfoïde organen. Alsook is er nog inhibitie van immunoglobuline synthese en cytokineproductie. De cytokineproductie is afhankelijk van de nucleaire factor kappa B, die geblokkeerd is door de glucocorticoïden. De verminderde lokale inflammatorische respons wordt gemedieerd door de remming van histamine en door de inhibitie van de omzetting van monocytten naar macrofagen. De receptoren in de hersenen zijn eveneens een belangrijk doelweefsel voor de glucocorticoïden, wat zich uit in depressie, euforie, psychose, apathie en lethargie. De regulatie van het geheugen en de cognitieve functies kunnen aangetast worden [3].

De schildklier produceert de thyroïd hormonen tri-joodthyronine ( $T_3$ ) en thyroxine ( $T_4$ ). De secretie van  $T_3$  en  $T_4$  staat onder controle van het thyroïd-stimulerend hormoon (TSH) in de hypofyse die op zijn beurt onder controle staat van het thyrotropine-vrijmakend hormoon in de hypothalamus. De glucocorticoïden onderdrukken de schildklier op twee manieren. Ten eerste wordt de secretie van TSH geïnhibeerd, waardoor de concentraties van de thyroïd hormonen dalen. Ten tweede wordt het enzym 5'-deiodinase geblokkeerd dat instaat voor de omzetting van het inactieve  $T_4$  naar het actieve  $T_3$ . Ook is de secretie van het groeihormoon, het luteïniserend en follikelstimulerend hormoon gedaald [2,3].



Cortisol is in de circulatie voor bijna 90% gebonden aan het corticosteroid-binding-globuline (CBG) dat gesynthetiseerd wordt in de lever en zwakker aan albumine. De ongebonden of vrije vorm van cortisol bedraagt slechts 5% van het totaal plasma cortisol. Enkel deze vorm heeft fysiologische activiteit. Op deze manier wordt de biologische beschikbaarheid en de klaring van cortisol door CBG gereguleerd. De vrije vorm is een lipofiele molecule, die via passieve diffusie doorheen de weefsels kan diffunderen. Hierdoor is de concentratie van cortisol in het speeksel een reflectie van de vrije fractie in het serum [3,12].

Het gebruik van een speekselstaal voor analyse heeft een aantal voordelen. De afname kan op een goedkope, stressloze en niet-invasieve manier gebeuren. Bijv. voor middernacht cortisol afnames in het kader van uitwerking vermoeden Cushing is dit een preferentiële matrix geworden. Ook bevat speeksel minder interfererende componenten dan urine, wat de analytische bepaling vergemakkelijkt. De fluctuaties in de CBG concentraties bij oestrogeenbehandeling of bij inflammatoire stress, kunnen in serum leiden tot misleidende waarden van de totale cortisol levels. Ook daarom is speeksel een aantrekkelijke matrix, omdat er geen invloed is van CBG. De concentratie van cortisol in speeksel is de som van het vrije cortisol in serum en de cortisol die later wordt geoxideerd naar cortisone door het enzym type 2 11 $\beta$ -HSD in de oorspeekselklieren. Hierdoor wordt er een hoge concentratie cortisone in speeksel verkregen in vergelijking met cortisol in speeksel. Er is evidentie dat cortisone in speeksel een betere discriminerende waarde kan hebben dan salivair cortisol om accuraat de concentratie van het vrije cortisol in serum te weerspiegelen na bijvoorbeeld adrenale stimulatie of orale hydrocortisone inname [16,17].

Corticosterone is de prominentste glucocorticoïd bij knaagdieren, want ze beschikken niet over het enzym 17 $\alpha$ -hydroxylase voor de aanmaak van cortisol. Bij de mens is corticosterone een belangrijk intermediair product voor de synthese van aldosteron. De concentraties van corticosterone zijn tien à twintig keer lager dan de cortisol levels. Corticosterone is ook gebonden aan CBG zoals cortisol. De concentraties van cortisol en corticosterone wijzigen parallel volgens het circadiaans ritme. In vergelijking met cortisol is corticosterone minder anti-inflammatoir. Dit is te wijten aan de lage affiniteit van corticosterone voor GR. Echter heeft corticosterone wel hoge affiniteit voor MR [11,18].

### 1.3. ONTREGELING VAN GLUCOCORTICOID CONCENTRATIES

Glucocorticoïd concentraties kunnen ontregeld worden door een storing in de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as. Verhoogde spiegels van cortisol zijn typisch voor Cushing's Syndroom en *Apparent Mineralocorticoïd*

*Excess*. Lage cortisolspiegels daarentegen worden waargenomen bij Congenitale Adrenale Hyperplasie en de ziekte van Addison [12].

Het endogeen Cushing's Syndroom (CS) wordt gekarakteriseerd door een chronische overvloedige secretie van cortisol. Bij 85% van de gevallen is de oorzaak ACTH-afhankelijk, bijvoorbeeld een corticotroop adenoma (Ziekte van Cushing) of een ectopische ACTH tumor. CS wordt gekenmerkt door verschillende symptomen zoals centripetale vetdispositie, dunne huid, paarse striae, hirsutisme, obesitas, diabetes, hypertensie, osteoporose, gemoedswisselingen... Deze kenmerken hebben een traag verloop over de tijd. De screening van CS gebeurt op drie verschillende manieren: 1-mg dexamethason suppressie test, 24-uurs urine verzameling van vrij cortisol en *late-night salivary cortisol test* [10].

Mutaties in het 11 $\beta$ -HSD2 gen liggen aan de basis van het syndroom van *Apparent Mineralocorticoid Excess* (AME). AME wordt gekarakteriseerd door extreme hypertensie en hypokaliëmie. Door de afwezigheid van 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 wordt cortisol niet omgezet in het inactieve cortisone. Hierdoor kan het 11 $\beta$ -HSD2 de MR niet meer beschermen tegen cortisol. Cortisol zal fungeren als een schijnbaar mineralocorticoid, want cortisol heeft dezelfde intrinsieke activiteit als aldosterone voor de MR. Cortisol is in duizend keer hogere concentratie aanwezig ten opzichte van aldosteron, waardoor het onmogelijk wordt dat aldosteron de receptor kan bereiken en zijn specifieke mineralocorticoid activiteit kan realiseren. De diagnose wordt gesteld door middel van een gelijktijdige meting van cortisol en cortisone en hun metaboliëten in urine. Deze ratio's geven een indicatie van de algemene activiteit van 11 $\beta$ -HSD [19].

Congenitale Adrenale Hyperplasie (CAH) is een autosomale recessieve ziekte, die veroorzaakt wordt door een deficiëntie in de enzymen die betrokken zijn in de synthese van cortisol, aldosteron of beide. Deficiëntie in het 21-hydroxylase enzym is de meest frequente vorm van CAH. Er ontstaat een accumulatie van de adrenale precursoren zoals progesteron en 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron, dit leidt tot bijnierinsufficiëntie en bijnierhyperplasie. Het gehalte van cortisol is sterk gereduceerd. Via negatieve feedback zorgt cortisol voor een stimulatie van ACTH. Het ACTH bevordert de aanmaak van de adrenale precursoren, wat resulteert in verhoogde productie van de androgenen. Deze zijn verantwoordelijk voor de virilisatie bij vrouwen en vroegtijdige seksuele ontwikkeling bij mannen. Er kunnen ook deficiënties optreden in bijvoorbeeld het 11 $\beta$ -hydroxylase en het 17 $\alpha$ -hydroxylase enzym, maar deze komen minder voor. CAH wordt onderverdeeld in een klassieke en niet-klassieke vorm. De klassieke vorm treedt op vanaf de geboorte en wordt gekenmerkt door bijnierinsufficiëntie, zoutverlies en virilisatie bij de vrouwen.

De niet-klassieke vorm of de milde vorm manifesteert zich vanaf de puberteit. De diagnose van de verschillende types van CAH wordt vastgesteld door een multiplex steroïd analyse [5,20].

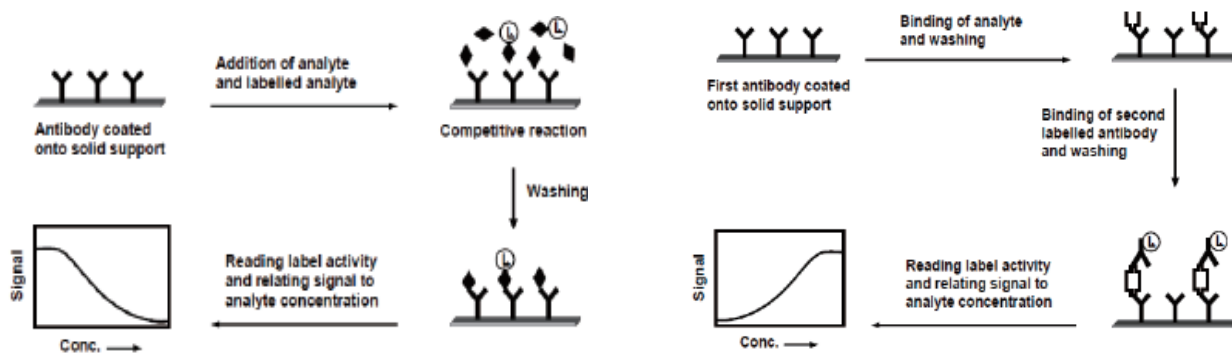
De ziekte van Addison is in veel gevallen een auto-immuunziekte waarbij een dysfunctie in de bijnierschors leidt tot een primair tekort aan cortisol en aldosteron. Er ontstaan verhoogde concentraties van ACTH die tevergeefs de bijnieren prikkelen. Typische symptomen zijn moeheid, bruine huidsverkleuring, gewichtsverlies, zouthonger en hypotensie. Het diagnostiseren gebeurt op basis van de plasma cortisol bepaling en de ACTH stimulatietest. Lage waarden van cortisol en hoge waarden van ACTH geven een indicatie voor de ziekte van Addison. Ook kan de aanwezigheid van antilichamen tegen 21-hydroxylase nagegaan worden [21].

#### 1.4. BEPALINGSMETHODEN VAN GLUCOCORTICOIDEN

Een accurate bepaling van de glucocorticoïden is een veelgevraagde routineanalyse in de klinische laboratoria voor de diagnose van endocriene stoornissen (zie hierboven vermeld in 1.3) en voor de vorming van behandelingsstrategieën. Tegenwoordig worden glucocorticoïden op twee verschillende manieren gemeten, namelijk via immunoanalyse of massaspectrometrie.

##### 1.4.1. Immunoassay

Een immunoassay (IA) is een biochemische methode die steunt op de interactie tussen het antigeen en het antilichaam. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen competitieve en niet-competitieve immunoassays (zie figuur 1.4). Bij de competitieve immunoassays is er competitie tussen de niet-gemerkte analiet (meestal het antigeen) en het gemerkte antigeen voor een gelimiteerde hoeveelheid antilichamen. De concentratie van de analiet is omgekeerd evenredig met het signaal verkregen door de merker. Daartegenover zal de niet-competitieve immunoassay of de sandwichassay genaamd, gebruik maken van twee antilichamen. Op een vaste drager wordt een primair antilichaam geïmmobiliseerd, waarop het antigeen bindt. Vervolgens wordt een gemerkt secundair antilichaam toegevoegd na de wasstap. Deze zal binden op een ander epitoom van het antigeen. Na een tweede wasstap wordt de concentratie van de analiet gemeten die recht evenredig is met het signaal van de merker. Er worden verschillende IA's gedifferentieerd, afhankelijk van de merker [22].



Figuur 1.4: Schematische voorstelling van een competitieve IA (links) en niet-competitieve IA (rechts) [22].

Radioimmunoassay (RIA) heeft radioactieve atomen zoals  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  en  $^{14}\text{C}$  als merker. Ondanks de hoge gevoeligheid en de precisie wordt de RIA zelden tot niet meer gebruikt voor steroïd bepaling, omdat ze niet automatiseerbaar is. Ook de korte halfwaardetijd van de isotopen, de gevaren rond radioactiviteit voor het personeel en het radioactief afval zijn nadelig. De meeste RIA's zijn vervangen door andere detectiemethoden, gebaseerd op non-radioactieve merkers of massaspectrometrie. De detectie van de merkers kan steunen op colorimetrie, chemiluminescentie en elektrochemiluminescentie [22,23].

Enzym immunoassay en *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* gebruiken enzymen als merker. Door toevoeging van een substraat in de reactiebuis zorgt het enzym, bijvoorbeeld alkalisch fosfatase, ervoor dat er gekleurde producten ontstaan. De kleuring is een kwantitatieve en kwalitatieve maat voor de hoeveelheid analiet. ELISA heeft het nadeel dat het moeilijk automatiseerbaar blijft [24]. Een variatie op de enzym immunoassay is de chemiluminescente immunoassay (CLIA). Het toegevoegde substraat, bijvoorbeeld luminol, wordt door enzym gemerkte antilichamen omgezet tot een reactieproduct door middel van een chemische reactie. De chemische reactie zorgt ervoor dat de elektronen van de molecule zich in een aangeslagen toestand bevinden. Wanneer de elektronen terugkeren naar hun lagere energietoestand zal er energie vrijkomen onder vorm van fotonen en op die manier ontstaat licht. Dit principe heet luminescentie. De hoeveelheid licht die gedetecteerd wordt, is een indicatie van de hoeveelheid antigeen in het staal [25].

In het laboratorium van het UZ Gent wordt ook een andere vorm van een chemiluminescente analyse gebruikt, namelijk elektrochemiluminescente immunoassay (ECLIA). Hierbij is de luminescentie gebaseerd op een elektrochemische reactie. De analiet, bijvoorbeeld cortisol, wordt gemarkeerd met een elektrochemiluminescente

merker zoals een ruthenium derivaat. Door het aanbrengen van een spanning op de elektrode en bij aanwezigheid van een coreactant ontstaat een aangeslagen toestand van de merker door de hoge elektron transfer. Daarna volgt emissie van de fotonen bij terugkeer naar de grondtoestand. Het grote verschil tussen CLIA en ECLIA is dat bij CLIA de luminescentie veroorzaakt en gecontroleerd wordt door een manipulatie van de vloeistofstromen. Echter bij ECLIA is de luminescentie gecontroleerd door wijzigingen in de elektrodespanning. De scheidingen van de immuuncomplexen en de ongebonden fracties gebeuren aan de hand van magnetische beads. Alsook is ECLIA in staat om de gebruikte reactant (ruthenium derivaat) te regenereren met een overmaat coreactanten, waardoor heel veel fotonen kunnen geproduceerd worden in een meetcyclus. Deze stappen gebeuren simultaan in de ECLIA, wat de hoge gevoeligheid verklaart, evenals de lagere variatiecoëfficiënten in vergelijking met de CLIA [26,27].

De kostprijs van de IA is sterk afhankelijk van de onderzochte analiet. In de praktijk wordt een hoge doorvoersnelheid van de stalen gegenereerd door de bevoegde personeelsleden. Er zijn veel commerciële kits op de markt en de reagentia zijn eenvoudig verkrijgbaar. Toch hebben IA's een aantal nadelen. Ze kunnen lijden aan een gebrek van specificiteit, waarbij er zich vaak problemen voordoen met het antiserum of de monoclonale antilichamen door kruisreacties met andere steroïden. Er zijn eveneens heterofiele antilichamen die vals positieve of negatieve resultaten kunnen geven doordat ze een valse antigeen-antilichaambinding induceren. Daarnaast is het mogelijk dat er matrix-effecten en interferenties met steroïde bindingsproteïnen ontstaan. De gevoeligheid van de IA daalt naarmate de hoeveelheid staal kleiner wordt. Dit kan te wijten zijn aan de relatief lage affiniteit van de anti-steroïde antilichamen. Om al deze redenen wordt er een overstap gemaakt voor sommige steroïden naar de massaspectrometrie technologie [28,29].

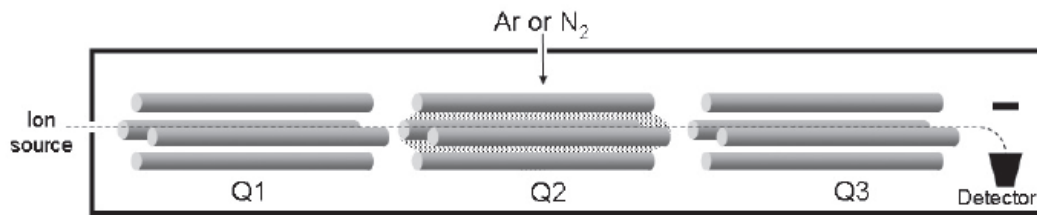
#### 1.4.2. Massaspectrometrie

Massaspectrometrie (MS) is een detectiemethode die gebaseerd is op de vorming van ionen met behulp van een ionisatieproces. Deze ionen worden gescheiden volgens hun massa-over-ladingverhouding ( $m/z$ ). Het ionisatieproces wordt geïnitieerd door een ionisatiebron zoals *electrospray ionisation (ESI)*, *atmospheric pressure chemical ionisation (APCI)* en *atmospheric pressure photoionisation (APPI)*. ESI is een techniek waarin een oplossing wordt geconverteerd naar gasvormige ionen via ionenevaporatie. APCI maakt gebruik van een coronanaald om de ontstane ionen te ioniseren en APPI vormt ionen door foto-ionisatie door middel van ultraviolet-lamp of een dopant [30,31].

Voor de bepaling van cortisone en corticosterone wordt vertrokken vanuit een biologische vloeistof zoals serum of urine die veel meer bevat dan de betreffende analieten. Om dit mengsel te scheiden wordt er gebruik gemaakt van een extractie en aansluitend een chromatografische stap. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen gaschromatografie en vloeistofchromatografie. Beide kunnen gekoppeld worden aan een massaspectrometer. In de eerste plaats zorgt gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS) voor een grote verbetering qua specificiteit ten opzichte van de immunoassays. Het principe van GC-MS steunt op de scheiding en de detectie van relatief vluchtige componenten. GC-MS vereist dus een pre-analytische stap om de te bepalen steroïden vluchtig te maken. Er is mogelijkheid tot een hoge resolutie scheiding van de steroïden door de gaschromatograaf en de massaspectrometer verbetert de specificiteit in identificatie. De GC-MS is geen routine techniek geworden, omdat de pre-analytische stap zeer complex en tijdrovend is. Ook lopen de runtijden zeer hoog op ( $\pm 30$  min.). Toch blijft GC-MS een belangrijke methode voor de steroïd bepaling in de onderzoekslaboratoria [5,28].

In de klinische laboratoria heeft de vloeistofchromatografie-tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS) een aanzienlijke rol gekregen gedurende de laatste tien jaar. Er is een grote voortuitgang geboekt in het *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* systeem en in het kolom design. Het LC systeem zorgt voor de scheiding van de vloeibare analieten ter hoogte van de HPLC kolom op basis van een interactie tussen mobiele en de stationaire fase. De steroïden gaan een verschillende interactie aan met de stationaire fase van de kolom afhankelijk van hun polariteit [28].

Ook is er een enorme progressie gemaakt in het massaspectrometer deel. De omschakeling van een enkele quadrupool massaspectrometer naar een triple quadrupool massaspectrometer of ook een tandem massaspectrometer genaamd, verhoogt sterk de specificiteit. De quadrupool scheidt de gevormde ionen volgens hun  $m/z$  ratio. In een tandem massaspectrometer zijn er drie quadrupolen in serie geplaatst (zie figuur 1.5). De eerste quadrupool  $Q_1$  selecteert het precursor ion. De tweede quadrupool  $Q_2$  fungeert als een collisiecel, waardoor het precursor ion wordt gefragmenteerd in productionen door middel van botsingen met het collisiegas zoals argon of stikstof. Vervolgens wordt in de derde quadrupool  $Q_3$  het gewenste production geselecteerd. Deze opstelling van de tandem massaspectrometer wordt de *multiple reaction monitoring (MRM)* modus genoemd [28,32].



**Figuur 1.5:** Een triple quadrupool massaspectrometer met Q1 en Q3 als massafilter en Q2 als collisioneel met een inert gas [32].

Er worden twee massa transities gekozen voor zowel cortisone als voor corticosterone. De meest gevoelige transitie wordt gebruikt voor kwantificatie (*quantifier*) en de andere transitie voor kwalificatie (*qualifier*) [33].

De kenmerken van LC-MS/MS zijn een zeer hoge gevoeligheid, specificiteit en doorvoersnelheid. De runtijd is ongeveer 10 minuten. In tegenstelling tot IA heeft LC-MS/MS nog een voordeel. Ze heeft de capaciteit om simultaan verschillende steroïden te meten in een run. De kennis van de levels van verschillende steroïden is namelijk in veel gevallen cruciaal voor het stellen van de juiste diagnose [5].

Het nadeel aan LC-MS/MS is de noodzaak aan technische expertise voor het bewerkstelligen van de metingen en het onderhoud van het toestel. Veel voorkomende aandachtspunten zijn ook ionisatie-efficiëntie, matrix-effecten en isobarische componenten [5,29].

## 2. OBJECTIEVEN

Glucocorticoïden zijn essentieel voor de regulatie van diverse fysiologische functies. Verstoorde glucocorticoïd concentraties manifesteren zich in verschillende endocriene stoornissen zoals Cushing's Syndroom of *Apparent Mineralocorticoid Excess*. Daarom heeft de bepaling van de glucocorticoïden een belangrijk aandeel in de routineanalyses van het klinisch labo van UZ Gent, bijvoorbeeld cortisol wordt dagelijks bepaald in serum via elektrochemiluminescente immunoanalyse.

Immunoanalyses kunnen lijden aan een gebrek aan specificiteit die zich uit in eventuele kruisreacties met andere verwante steroïden. Afhankelijk van de affiniteit van de antilichamen kan er ook een gedaalde gevoeligheid optreden bij een kleiner staalvolume. De vloeistofchromatografie-tandem massaspectrometer wordt gekenmerkt door een hoge specificiteit en hoge gevoeligheid. Ze heeft de capaciteit om verschillende steroïden simultaan te meten in tegenstelling tot de immunoanalyse.

Het doel van deze masterproef is om de bestaande cortisol-testosteron methode in serum op de LC-MS/MS uit te breiden met cortisone en corticosterone. Ook wordt er kort getest hoe deze aangepaste methode effectueert in urine. Dit biedt de mogelijkheid om verschillende glucocorticoïden simultaan te bepalen, waardoor een aantal ziektes beter gedefinieerd kunnen worden. Ook kan exogene toediening van geneesmiddelen zoals corticosteroïden onderscheiden worden van endogene productie.

LC-MS/MS wordt opgesteld in een *multiple reaction monitoring* modus en maakt gebruik van de positieve *atmospheric pressure chemical ionisation* methode als ionisatiebron. Voorafgaand wordt er een vloeistof-vloeistofextractie uitgevoerd.

Er wordt gestart met de optimalisatie van de massaspectrometrische parameters van cortisone en corticosterone. Vervolgens wordt de methode gedeeltelijk gevalideerd door evaluatie van een aantal parameters, namelijk de bepaalbaarheidsgrens, imprecisie, onjuistheid en het matrix-effect. Uiteindelijk wordt voor elke analiet een interne standaard gekozen. De meest gevoelige massa transitie per analiet wordt gebruikt voor kwantificatie en de andere massatransitie voor confirmatie.



### 3. MATERIALEN EN METHODEN

#### 3.1. MATERIALEN

##### 3.1.1. Solventen en hulpstoffen

- Ammoniumacetaat (Merck, Darmstadt, Duitsland)
- Carboglace (ACP, Heusden-Zolder, België)
- Diëthylether A.R (stab./BHT) (Biosolve BV, Valkenswaard, Nederland)
- Methanol absolute LC-MS (Biosolve BV, Valkenswaard, Nederland)
- Natriumchloride pro analyse (Merck, Darmstadt, Duitsland)
- Water T1653 Medica type Elga (Veolia Water Technologies, Ede, Nederland)

##### 3.1.2. Standaarden en interne standaarden

- Corticosterone ( $\geq 98,5\%$ ) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Verenigde Staten)
- Corticosterone-9,11,12,12-d4 (97%) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Verenigde Staten)
- Cortisol-9,11,12,12-d4 (98%) (CDN Isotopes, Nieuwegein, Nederland)
- Cortisone ( $\geq 98\%$ ) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Verenigde Staten)
- Cortisone-2,2,4,6,6,9,12,12-d8 ( $\geq 98\%$ ) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Verenigde Staten)
- Testosteron-16,16,17-d3 (98%) (CDN Isotopes, Nieuwegein, Nederland)

##### 3.1.3. Toestellen en hulpmiddelen

- AB Sciex Triple Quad™ 5500 (AB Sciex, Nieuwerkerk aan de IJssel, Nederland)
- Balans (Mettler-Toledo, Zwitserland)
- Centrifuge CR 412 (Jouan, Saint-Herblain, Frankrijk)
- Droogijsbad
- Glazen borosilicaat buizen 100x16 mm (Novolab NV, Geraardsbergen, België)
- Glazen borosilicaat buizen 10x75 mm (Novolab NV, Geraardsbergen, België)
- Glazen pony vials (Perkin Elmer Life Sciences, Hopkinton, Verenigde Staten)
- High performance liquid chromatography (Shimadzu, Kioto, Japan)
- Luna C8(2) 100 A, 3  $\mu\text{m}$ , 50 x 3,0 mm (Phenomenex, Utrecht, Nederland)
- Maatkolf 10 mL, 20 mL, 50 mL, 250 mL en 1000 mL (Hirschmann, Eberstadt, Duitsland)
- MedCalc (MedCalc Software, Oostende, België)

- MultiQuant 2.1.1 (AB Sciex, Nieuwerkerk aan de IJssel, Nederland)
- Pasteurpipet (Novolab NV, Geraardsbergen, België)
- PD tip 1,25 mL en 2,50 mL (Novolab NV, Geraardsbergen, België)
- Pipettips Brand geel en blauw (Novolab NV, Geraardsbergen, België)
- Pipettor Handy Step elektronisch (Novolab NV, Geraardsbergen, België)
- Pipettor Transferpette S 20-200  $\mu$ L (Novolab NV, Geraardsbergen, België)
- Savant (Thermo Scientific, Waltham, Verenigde Staten)
- Schudtoestel (IKA, Staufen, Duitsland)
- Screw-cap vials, screw-caps, silicone/PTFE blue white en micro inserts small (Filter Service, Eupen, België)
- Security Guard Cartridge C8, 5  $\mu$ m, 4 x 2,0 mm (Phenomenex, Utrecht, Nederland)
- Syringe spuit 1 mL (Hamilton, Reno, Verenigde Staten)
- Vortex super-mixer (Lab-line instruments, Melrose Park, Verenigde Staten)
- Warmwaterbad op 37°C (GFL, Burgwedel, Duitsland)

### 3.1.4. Bereide reagentia

- Natriumchloride (MG = 58,44 g/mol).  
Er wordt 2,25 g afgewogen en opgelost in 250 mL water afkomstig van toestel Medica type Elga om een fysiologische oplossing te bekomen van 0.9%.
- Ammoniumacetaat (NH<sub>4</sub>Ac) concentratie 1 M (MG = 77,08 g/mol).  
Er wordt 19,27 g afgewogen en kwantitatief overgebracht in een maatkolf van 250 mL met water afkomstig van toestel Medica type Elga en aangelengd tot aan de ijkstreep.
- Werkoplossing pomp A: water + 1,5 mmol NH<sub>4</sub>Ac.  
Er wordt 1,5 mL NH<sub>4</sub>Ac gepipetteerd. Dit wordt toegevoegd aan 1000 mL water afkomstig van toestel Medica type Elga in een maatkolf van 1L en gemengd.
- Werkoplossing pomp B: methanol + 1,5 mmol NH<sub>4</sub>Ac.  
Er wordt 1,5 mL NH<sub>4</sub>Ac gepipetteerd. Dit wordt toegevoegd aan 1000 mL methanol en gemengd.
- Stock 1: 1 mg/mL cortisone.  
Weeg een leeg kolfje van 10ml en weeg hetzelfde kolfje met 10 mg cortisone standaard. De standaard wordt opgelost in methanol en aangelengd tot de ijkstreep. Weeg opnieuw het aangelengd kolfje. Aan de hand van de

dichtheid van het oplosmiddel en de zuiverheid van de standaard wordt exacte hoeveelheid standaard bepaald. Op dezelfde manier wordt 1 mg/mL corticosterone gemaakt.

- Stock 2: 10 µg/mL cortisone.

Er wordt 500 µL stock 1 cortisone in kolfje van 50 mL gepipetteerd en aangelengd met methanol tot de ijkstreep. Alle volumes van de stockoplossingen worden gepipetteerd met de Handy Step.

- Stock 2: 1 µg/mL corticosterone.

Er wordt 50 µL stock 1 corticosterone in kolfje van 50 mL gepipetteerd en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock A: 500 ng/mL cortisone + 10 ng/mL corticosterone.

Er wordt 2500 µL stock 2 cortisone en 500 µL stock 2 corticosterone gepipetteerd in een kolfje van 50 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock B: 50 ng/mL cortisone + 1 ng/mL corticosterone.

Er wordt 5 mL stock A gepipetteerd in kolfje van 50 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock C: 5 ng/mL cortisone + 100 pg/mL corticosterone.

Er wordt 5 mL stock B gepipetteerd in kolfje van 50 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock D: 500 pg/mL cortisone + 10 pg/mL corticosterone.

Er wordt 5 mL stock C gepipetteerd in kolfje van 50 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock 1 interne standaard cortisol-d4: 500 µg/mL.

Voor de aanmaak van stock 1 wordt de inhoud 0,005 g van het aangekochte flesje cortisol-d4 kwantitatief overgebracht in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep. Voor stock 2 (50 µg/mL) wordt 1 mL van stock 1 gepipetteerd in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock 1 interne standaard testosteron-d3: 1 mg/mL.

Voor de aanmaak van stock 1 wordt de inhoud 0,01 g van het aangekochte flesje testosteron-d3 kwantitatief overgebracht in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep. Voor stock 2 (5 µg/mL) wordt 50 µL van stock 1 gepipetteerd in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock 1 interne standaard cortisone-d8: 100 µg/mL.

Voor de aanmaak van stock 1 wordt de inhoud 1 mg van het aangekochte flesje cortisone-d8 kwantitatief overgebracht in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep. Voor stock 2 (1 µg/mL) wordt 100 µL van stock 1 gepipetteerd in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Stock 1 interne standaard corticosterone-d4: 100 µg/mL.

Voor de aanmaak van stock 1 wordt de inhoud 1 mg van het aangekochte flesje corticosterone-d4 kwantitatief overgebracht in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep. Voor stock 2 (1 µg/mL) wordt 100 µL van stock 1 gepipetteerd in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Mix 1 van alle interne standaarden met cortisol-d4 (250 ng/mL), testosteron-d3 (5 ng/mL), cortisone-d8 (100 ng/mL) en corticosterone-d4 (5 ng/mL).

Eerst wordt een stock 3 interne standaard testosteron-d3 (50 ng/mL) aangemaakt, waarbij 100 µL van stock 2 gepipetteerd wordt in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep. Voor de mix wordt er 50 µL van 50 µg/mL cortisol-d4, 1 mL van 50 ng/mL testosteron-d3, 1 mL van 1 µg/mL cortisone-d8 en 50 µL van 1 µg/mL corticosterone-d4 gepipetteerd in een maatkolf van 10 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Mix 2 van alle interne standaarden met cortisol-d4 (250 ng/mL), testosteron-d3 (5 ng/mL), cortisone-d8 (1 µg/mL) en corticosterone-d4 (100 ng/mL).

Er wordt 100 µL van 50 µg/mL cortisol-d4, 20 µL van 5 µg/mL testosteron-d3, 200 µL van 100 µg/mL cortisone-d8 en 2 mL van 1 µg/mL corticosterone-d4 gepipetteerd in een maatkolf van 20 mL en aangelengd met methanol tot de ijkstreep.

- Eerste spikeoplossing: De stock B met 50 ng/mL cortisone en 1 ng/mL corticosterone en stock C met 5 ng/mL cortisone en 100 pg/mL corticosterone wordt opnieuw gebruikt.
- Tweede spikeoplossing: De stock A met 500 ng/mL cortisone en 10 ng/mL corticosterone wordt opnieuw gebruikt. Er wordt een stock AA met 1000 ng/mL cortisone en 20 ng/mL corticosterone aangemaakt. Voor stock AA wordt 1 mL uit 10 µg/mL cortisone en 200 µL gepipetteerd uit 1 µg/mL corticosterone gepipetteerd in een maatkolf van 10 mL en aangelengd tot de ijkstreep.

## 3.2. METHODEN

### 3.2.1. Staalvoorbereiding

De staalvoorbereiding heeft twee doeleinden: de interfererende componenten verwijderen en het aanconcentreren van de analiet component om de gevoeligheid van de methode te verhogen. In dit onderzoek wordt geopteerd voor een vloeistof-vloeistofextractie (LLE). Het principe van LLE steunt op de verdeelbaarheid van de analiet tussen de waterige en organische fase afhankelijk van de affiniteit. LLE is een eenvoudige, snelle en praktische methode. Het is echter wel arbeidsintensief en moeilijk automatiseerbaar [5].

De methode gaat als volgt: alle reagentia, patiëntenstalen en serumpools worden op kamertemperatuur gebracht. De correcte volumes van de standaarden worden gepipetteerd uit de pony vials in glazen buizen volgens de tabel 3.1. In de blanco buis wordt 500  $\mu\text{L}$  fysiologische oplossing gepipetteerd. Daarna wordt er telkens 100  $\mu\text{L}$  genomen van de patiëntenstalen en de serumpools, waaraan 400  $\mu\text{L}$  fysiologische oplossing wordt toegevoegd. Vervolgens wordt aan alle stalen 20  $\mu\text{L}$  interne standaard toegevoegd, behalve aan de blanco. De blanco dient als controle voor de solventen.

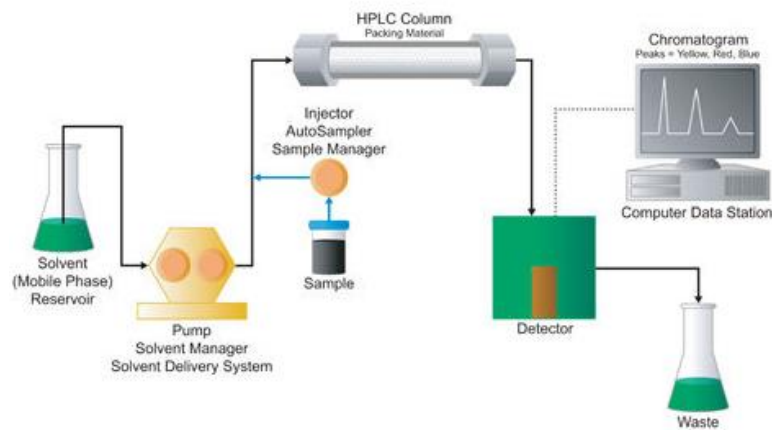
**Tabel 3.1: Volumes en concentraties van standaarden cortisone en corticosterone.**

Standaard	Oplossing	Aantal $\mu\text{L}$	Concentratie standaard cortisone (ng/mL)	Concentratie standaard corticosterone (pg/mL)
0	/	0	0	0
1	Stock D	50	0,25	5,40
2	Stock D	100	0,51	10,8
3	Stock D	200	1,02	21,6
4	Stock D	450	2,29	48,6
5	Stock C	100	5,09	108,0
6	Stock C	200	10,18	215,9
7	Stock C	450	22,9	485,8
8	Stock B	100	50,9	1079,6
9	Stock B	200	101,8	2159,6
10	Stock B	450	229,0	4858,1
11	Stock A	100	508,8	10795,8
12	Stock A	200	1017,7	21591,7

Na equilibratie worden de standaarden drooggedampt in de savant. Aan de patiëntenstalen en de serumpools wordt 2,5 mL diëthylether als extractiesolvent toegevoegd. Daarna worden ze in het schudtoestel geplaatst gedurende drie minuten op een schudsnelheid van 1400 rpm. Door de buisjes een 30 tal seconden in een droogijsbad te plaatsen bevriest de waterfase. Op deze manier wordt de organische fase met de gewenste analieten gescheiden van de waterfase en wordt ze afgegoten in kleine glazen buizen. Nadien worden deze in het warmwaterbad op 37°C geplaatst, waardoor de organische fase wordt ingedampt. Dan worden de standaarden, patiëntenstalen en serumpools heropgelost in 40  $\mu\text{L}$  methanol en 35  $\mu\text{L}$  water van het toestel Medica type Elga. Tenslotte worden de bekomen volumes in vials gepipetteerd en gecentrifugeerd gedurende vijf minuten op 3000 rpm, zodat de luchtbellen onderaan in de *inserts* verwijderd zijn.

### 3.2.2. Vloeistofchromatografie

*High performance liquid chromatography* (zie figuur 3.1) is een vorm van vloeistofchromatografie waarbij de mobiele fase, namelijk de vloeistof, onder verhoogde druk in het systeem wordt gepompt. De injector introduceert de analiet in de mobiele fase. Vervolgens worden de analieten gescheiden ter hoogte van de HPLC kolom (3-5  $\mu\text{m}$  deeltjesgrootte) door een interactie tussen de mobiele fase en de stationaire fase in de kolom. De detector is een tandem massaspectrometer uit het oogpunt van deze masterproef. Recent is een verhoogde efficiëntie realiseerbaar door de invoering van een gemodificeerde vorm van HPLC. De *ultra-high performance liquid chromatography* maakt gebruik van sub-2  $\mu\text{m}$  deeltjesgrootte kolommen [31,34].



**Figuur 3.1: Schematische weergave van HPLC met reservoir, pomp, auto-sampler, kolom en detector [34].**

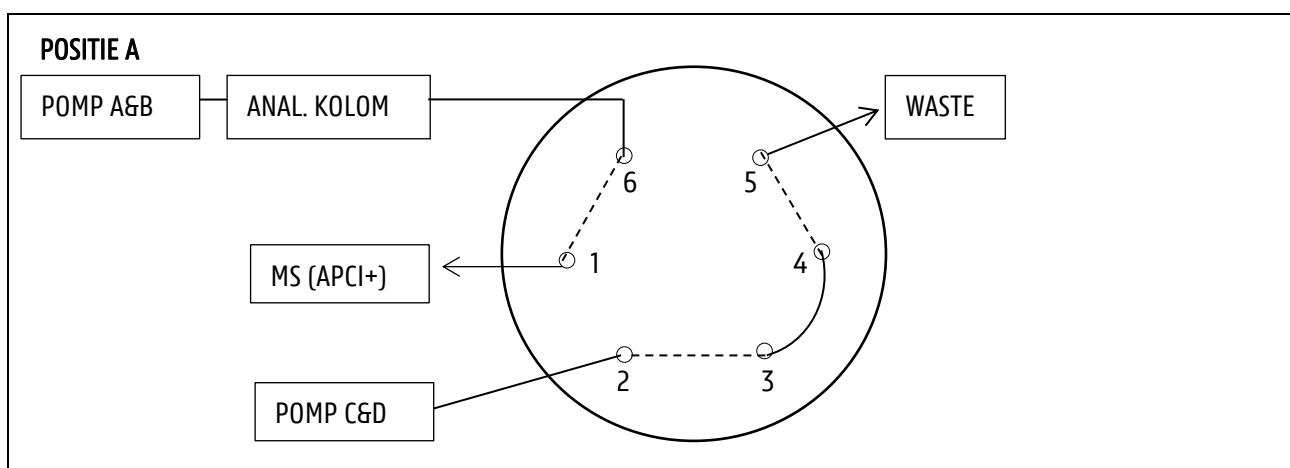
Een efficiënte chromatografische scheiding van analieten is van groot belang, zodat ook isobarische componenten die beschikken over hetzelfde molecuulair gewicht onderscheiden kunnen worden [31].

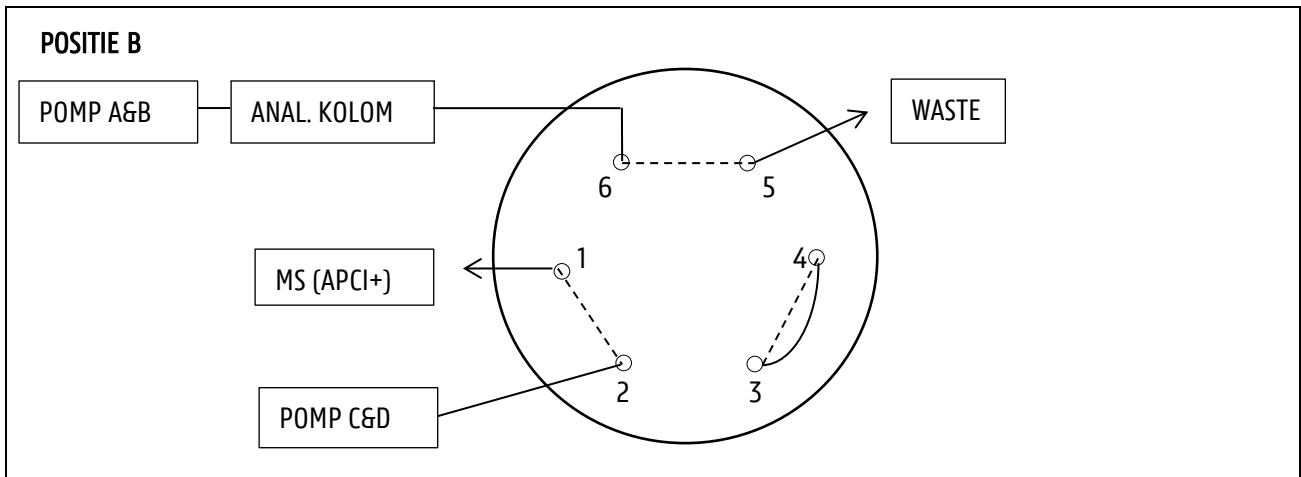
De chromatografische scheiding van de glucocorticoïden is gebaseerd op hun hydrofobiciteit en hun sterische eigenschappen. Daarom wordt er gebruik gemaakt van *reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)*. De apolaire vaste stationaire fase van de kolom van RP-HPLC bestaat uit silicagroepen en alkyl groepen zoals C8, C18 of uit een fenylgroep. De polaire mobiele fase is daarentegen een samenstelling van water en een organisch solvent, bijvoorbeeld methanol of acetonitril, in een welbepaalde verhouding. Afhankelijk van de affiniteit zal de analiet meer geneigd zijn om interactie aan te gaan met de mobiele ofwel met de stationaire fase. Er ontstaan Van der Waals attractiekrachten met de RP-kolom [16].

Het HPLC systeem beschikt over vier pompen A, B, C en D. In dit onderzoek bestaat oplossing A uit 1,5 mL NH<sub>4</sub>Ac in 1 liter water, oplossing B bestaat uit 1,5 mL NH<sub>4</sub>Ac in 1 liter methanol, oplossing C bestaat uit water en oplossing D uit methanol. De oplossingen van pomp A en B worden gemixt tot een solvent A/B en de oplossingen van pomp C en D worden gemengd tot een solvent C/D. De flow bedraagt 0,6 mL/min voor solvent A/B en 0,1 mL/min voor solvent C/D. De totale runtijd van deze analyse is 18 minuten en het injectievolume bedraagt 10,00 µL.

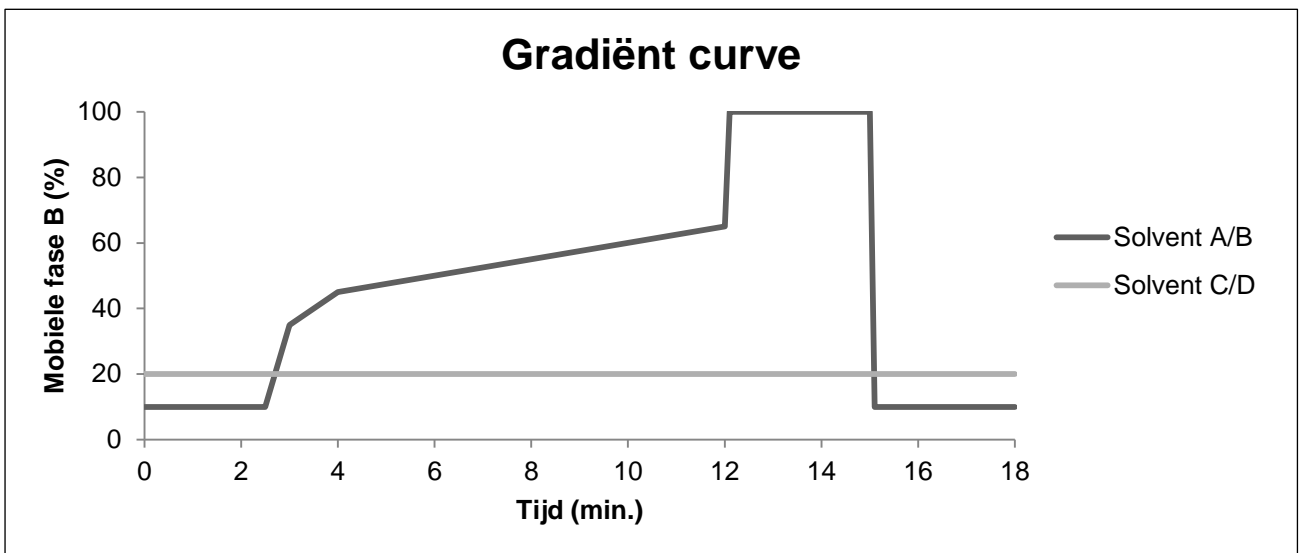
Op de massaspectrometer is een valco *valve* geïnstalleerd die door middel van een *valve* omschakeling kan schakelen van positie A naar B en omgekeerd. De *valve* start in positie A en schakelt na 0.1 minuut om naar positie B (zie figuur 3.2). Na drie minuten schakelt de *valve* om naar positie A, waardoor de analiet opgelost in het solvent A/B elueert van de analytische kolom naar de massaspectrometer. Na vijftien minuten schakelt de *valve* weer naar positie B. De resterende bestanddelen op de kolom worden door het solvent A/B verwijderd. Een laatste omschakeling gebeurt terug naar positie A zodat de kolom geëquilibreerd wordt met solvent A/B voor een volgende run.

De condities van het HPLC systeem veranderen in die mate tijdens de run dat ze een gradiëntelutie creëren (zie figuur 3.3). De beginconcentratie van solvent A/B is een verhouding van 90% A ten opzichte van 10% B. De concentratie van oplossing B wordt opgedreven naar 35% na drie minuten en dan naar 45%. Doordat de fractie van de organische fase stijgt, worden de analieten gescheiden geëluëerd. Op twaalf minuten bestaat de mobiele fase uit 65% oplossing B en die stijgt op 12,1 minuten tot 100%. Deze daalt dan weer naar zijn beginconcentratie na 15 minuten. De concentratie van solvent C/D blijft gedurende de hele run op 20%.





Figuur 3.2: Voorstelling valco *valve* van positie A en B.



Figuur 3.3: Voorstelling van gradiënt curve van de HPLC met x-as: tijd (min.) en y-as: mobiele fase B (%).

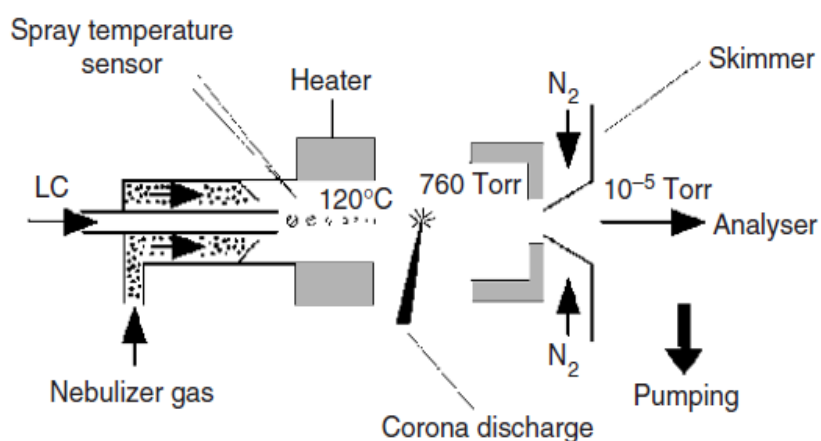
### 3.2.3. Tandem massaspectrometrie

Bij massaspectrometrie wordt de analiet omgezet in gasvormige ionen door middel van een ionisatieproces, waarna deze ionen gescheiden worden volgens hun  $m/z$  ratio. De massaspectrum plot de relatieve hoeveelheid (meestal in %), waarin elk soort ionen voorkomt, in functie van hun  $m/z$  ratio. Hieruit wordt informatie verzameld over de structuur en de samenstelling van de analiet. De massaspectrometer bestaat uit een staal introductiesysteem, een ionenbron, een vacuümsysteem, een massa-analysator, een detector en een datasysteem [30].



Om te beginnen wordt de analiet geïntroduceerd door middel van een staal introductiesysteem zoals HPLC. Aansluitend zorgt de ionenbron zoals ESI, APCI en APPI voor een ionisatieproces. ESI is een zachte ionisatietechniek, geschikt voor niet-vluchtige polaire moleculen. Het HPLC effluent wordt doorheen het capillair geleid waarop aan de tip een potentiaal is aangelegd. De potentiaal en het vernevelingsgas (N<sub>2</sub>-gas) zorgen ervoor dat de vloeistof wordt omgezet in een fijne spray van geladen druppels. Vervolgens treedt er ionenevaporatie op door de hoge temperatuur en het drooggas (N<sub>2</sub>-gas). Uiteindelijk ontstaan enkelvoudige analiet ionen ten gevolge van Coulomb explosies [32,35].

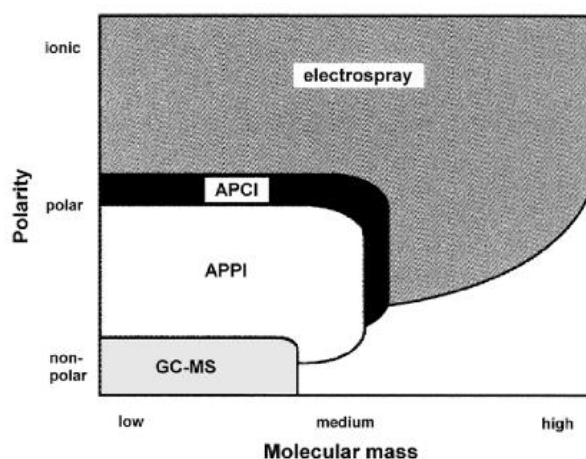
Steroïden zijn neutrale, relatief non-polaire moleculen die een functionele groep missen die een lading kan induceren, waardoor er weinig ionisatie optreedt met ESI. Daarom wordt in het kader van deze masterproef voor de APCI techniek gekozen (zie figuur 3.4). Alsook wordt er verder gebouwd op de bestaande methode van cortisol en testosteron. Bij APCI zal het HPLC effluent in de pneumatische nebulizer geïntroduceerd worden, waardoor een fijne nevel ontstaat. De *heat blocks* (120°C) die zich bevinden op de tip van het capillair zorgen voor de evaporatie van de vernevelde druppels. Na de verdamping start de chemische ionisatie bij atmosferische druk. De verdampte mobiele fase fungeert als ioniserend gas en de reactieve ionen worden geproduceerd door de corona naald. De moleculen van het solvent worden eerst geïoniseerd. Deze dragen op hun beurt de lading over naar de analieten [30,32].



Figuur 3.4: Schematische voorstelling van de APCI methode met een corona naald die zorgt voor chemische ionisatie [30].

APCI methode komt voor in 2 modussen: positief en negatief. In de positieve modus is het van belang dat de proton affiniteit van de analiet (A) hoger is dan die van het solvent (S) zodat er een protonoverdracht plaatsvindt naar de analiet  $[A + SH^+ \rightarrow AH^+ + S]$ . Bij de negatieve modus waar de zuurconstante van het solvent hoger moet zijn dan van de analiet, wordt een proton afgestaan aan de gedeprotoneerde solventmoleculen  $[A + SH^- \rightarrow AH^- + S]$ . De pluspunten van de ionisatie van APCI zijn een meer selectieve ionisatie, gedaalde matrix-effecten en hogere flow snelheid ten opzichte van ESI [30,31].

De APPI techniek is gelijkaardig aan de APCI. Enerzijds kan de analiet geïoniseerd worden door fotonen afkomstig van de ultraviolet-lamp. Anderzijds wordt er meestal gebruik gemaakt van een dopant molecule (bv. toluene), die zorgt voor de ionisatie van de analiet door middel van ladingsuitwisseling of een protontransfer. De APPI is geschikt voor non-polaire moleculen [30]. Afhankelijk van de polariteit en het moleculair gewicht van de analiet wordt geprefereerd voor een bepaalde ionisatiebron of inlaatsysteem om aan de massaspectrometer te koppelen (zie figuur 3.5) [36].



**Figuur 3.5: Toepassing van verschillende ionisatiebronnen gekoppeld aan MS volgens de polariteit en het moleculair gewicht van de analiet [36].**

De gevormde ionen worden getransporteerd naar de massa-analysator onder invloed van een vacuümsysteem en een elektrostatisch veld. De massa-analysator scheidt de ionen volgens hun  $m/z$  ratio. De meest gebruikte massa-analysator is de quadrupool. De quadrupool bestaat uit vier parallelle elektrische geladen staven, waarvan de tegenoverliggende staven een elektrodepaar vormen. Het ene elektrodepaar is positief geladen en het

andere negatief. Op elk elektrodepaar wordt gelijkstroom (Dc) en een wisselstroom (Rf) aangebracht. Door het alterneren van Dc en Rf maken de ionen een golfbeweging zowel transversaal als volgens de longitudinale as van de quadrupool. Op het moment dat de ionen collideren tegen de elektrodes worden ze neutraal. De ionen die de volledige lengte van de quadrupool doorlopen worden gedetecteerd. De detector, de elektronmultiplier, heeft de functie om de doorgelopen ionen te detecteren en om te zetten in een meetbaar signaal [30,32].

De kwantitatieve bepaling van cortisone en corticosterone gebeurt door middel van vloeistofchromatografie-tandem massaspectrometrie in de MRM modus. De MRM voert een *selected ion monitoring* uit in de Q<sub>1</sub> op precursorniveau en een *selected ion monitoring* uit in de Q<sub>3</sub> op productniveau. De geselecteerde *m/z*-waarden voor de MRM modus worden bepaald tijdens de tuning.

### 3.2.4. Tuning

Tijdens de manuele tuning van cortisone en corticosterone worden de analiet (*compound*) afhankelijke en de bron (*source*) afhankelijke parameters geoptimaliseerd. De LC-MS/MS wordt ingesteld zoals de huidige cortisol-testosteron methode waarop verder wordt gebouwd, namelijk in de positieve APCI modus. Ook worden dezelfde bron afhankelijke parameters aangewend, zie onderstaande tabel 3.2.

**Tabel 3.2: De bron instellingen van het LC-MS/MS toestel.**

Bron afhankelijke parameters	
<i>Curtain gas</i>	30 psi
<i>Collision activated dissociation</i>	8 psi
<i>Needle current</i>	5 V
Temperatuur	500 °C
<i>Ion source gas 1</i>	55 psi

Voor de bepaling van de component afhankelijke parameters wordt er gebruik gemaakt van een T-stuk op de ionenbron. Het T-stuk verbindt de *syringe* van de MS met een flow van 15 µL/min, de LC-pompen A en B (50%/50%) met een flow 0,6 mL/min en de APCI probe. Voor zowel cortisone als voor corticosterone wordt als tuneoplossing 1 µg/mL gebruikt.

Het precursor ion en de product ionen van cortisone en corticosterone uit de literatuur zijn richtinggevend. Er kan onmiddellijk een Q1 multiple ion scan vervaardigd worden, waarbij de declustering potentiaal (DP) en entrance potentiaal (EP) van het precursor ion wordt bepaald. Daarna wordt een product ion scan met *center and width* gerealiseerd voor elk product ion, deze scan kan gezien worden als een single ion scan. De collision energie (CE) en de collision cell exit potentiaal (CXP) worden vastgelegd per product ion.

De gevonden resultaten van de verschillende productionen van cortisone en corticosterone worden toegevoegd aan de bestaande acquisitie methode van cortisol en testosteron. Er wordt finaal een MRM scan gedaan met de juiste instellingen. Dit is een controle om te beoordelen of de gevonden productionen van het precursor ion gezien worden in het chromatogram. Hierbij wordt de standaard geïnjecteerd via het HPLC systeem en geanalyseerd met de aangepaste acquisitie methode.

### **3.2.5. Validatie**

Betrouwbare analytische resultaten zijn fundamenteel voor correcte interpretaties en conclusies in het klinisch werkveld en in wetenschappelijke studies. Om deze kwaliteitsvolle resultaten te bekomen is evaluatie van de uitvoering en validatie van de finale methode essentieel. In deze masterproef wordt tijdens de validatie procedure de kwaliteit van de methode getoetst door een aantal validatieparameters na te gaan zoals de bepaalbaarheidsgrens, imprecisie, onjuistheid en het matrix-effect [5,37].

#### **3.2.5.1. Bepaalbaarheidsgrens**

De bepaalbaarheidsgrens of de *limit of quantification (LoQ)* is de minimale hoeveelheid analiet in een staal die met voldoende precisie (20%) en accuraatheid (80-120%) kan gekwantificeerd worden [38].

#### **3.2.5.2. Imprecisie**

De imprecisie van de gebruikte analytische methode wordt onderverdeeld in de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid van een analyse en wordt geëvalueerd aan de hand van de variatiecoëfficiënt. Herhaalbaarheid drukt zich uit in intra-run variatiecoëfficiënt (intra-CV) en inter-run variatiecoëfficiënt. In deze masterproef wordt de intra-CV bepaald door een patiëntenstaal minimaal 5 keer mee te nemen in dezelfde run. De

variatiëcoëfficiënt wordt berekend door middel van onderstaande vergelijking 3.1 en evalueert de spreiding rond de gemiddelde waarde [39]:

(3.1)

$$CV (\%) = \frac{\text{Standaarddeviatie (SD)}}{\text{Gemiddelde } (\bar{x})} \times 100\%$$

### 3.2.5.3. Onjuistheid

De onjuistheid gaat de mate van overeenkomst na tussen het bekomen resultaat en de referentiewaarde (*true value*). In dit onderzoek wordt een blanco matrix of een serumstaal met bekende concentratie als referentiewaarde gehanteerd en deze wordt belast met een gekende hoeveelheid standaard (*spike*). De terugvinding of de *recovery (RE)* is de verhouding van de gevonden concentratie, namelijk van het belaste staal ten opzichte van de theoretische concentratie van de pure standaard waarmee werd belast. De recovery wordt uitgedrukt in procent en berekend volgens onderstaande formule 3.2 [39]:

(3.2)

$$RE (\%) = \frac{\text{Gevonden concentratie}}{\text{Theoretische concentratie}} \times 100\%$$

De terugvinding evalueert de extractie-efficiëntie van de analytische methode [38]. Bij de eerste uittesting in serum wordt er met 10 en 51 ng/mL belast voor cortisone en met 216 en 1080 pg/mL voor corticosterone. Bij de tweede en derde uittesting in serum wordt er met 100 en 200 ng/mL belast voor cortisone en met 2000 en 4000 pg/mL voor corticosterone. Ook worden er drie urinestalen meegenomen bij de derde uittesting waarop dezelfde *spiking* gebeurt van 100 en 200 ng/mL voor cortisone en 2000 en 4000 pg/mL voor corticosterone.

### 3.2.5.4. Matrix-effect

Matrix-effecten (ME) ontstaan door co-elutie van de matrix componenten en de gewenste analieten van een staal, waardoor de ionisatie-efficiëntie van de analieten wordt beïnvloed. Het exacte mechanisme van de matrix-effecten is niet gekend, vermoedelijk treedt er een competitie op tussen de analiet en de matrixsubstanties voor ionisatie. De matrix-effecten zijn niet detecteerbaar in het chromatogram, maar worden waargenomen als een versterking (*ion enhancement*) of onderdrukking (*ion suppression*) van de analiet signalen. Matrix-effecten zijn sterk afhankelijk van de matrix en analiet componenten en ze zijn dan ook moeilijk te voorspellen. Zoals eerder

vermeld is ESI gevoeliger aan matrix-effecten dan APCI. Dit matrix-effect fenomeen resulteert in gedaalde precisie en accuraatheid van de analytische methode. Om de mate van de matrix-effecten te evalueren wordt er gebruik gemaakt van post-extractie methode in deze masterproef [40]. Eerst gebeurt een extractie van een blanco matrix en vervolgens wordt deze belast met een gekende concentratie standaard. Deze piekoppervlakte wordt vergeleken met de piekoppervlakte van dezelfde concentratie van de zuivere standaard. De matrix-effecten worden berekend volgens de vergelijking van Matuszewski *et al.* (3.3) [41]:

(3.3)

$$ME (\%) = \frac{B}{A} \times 100\%$$

Waarin *ME*: absoluut matrixeffect

*A*: Piekoppervlakte van de blanco matrix waar na extractie standaard wordt aan toegevoegd.

*B*: Piekoppervlakte van de zuivere standaard (zelfde concentratie als *A*).

## 4. RESULTATEN

### 4.1. SERUM

#### 4.1.1. Tuning

Voor de controle van de tuning wordt er een MRM scan uitgevoerd met de verworven bron en component afhankelijke instellingen (zie onderstaande tabel 4.1). Voor cortisone worden er twee pieken gevonden, respectievelijk met massatransitie 361,2/120,8 en 361,2/163,1 op een gemiddelde retentietijd van 7,04 minuten. Voor corticosterone worden er drie pieken teruggevonden, respectievelijk met massatransitie 347,3/97,1; 347,3/121,0 en 347,3/329,3 op een gemiddelde retentietijd van 8,79 minuten.

Tabel 4.1: MS/MS condities voor cortisone en corticosterone.

Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tijd (msec)	Identiteit	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	Referentie
361,2	120,8	100	Cortisone 1	100	10	45	13	[42]
361,2	163,1	100	Cortisone 2	100	10	35	13	[42]
347,3	329,3	100	Corticosterone 1	100	10	20	24	[5]
347,3	121,0	100	Corticosterone 2	100	10	35	20	[42]
347,3	97,1	100	Corticosterone 3	100	10	49	14	[42]

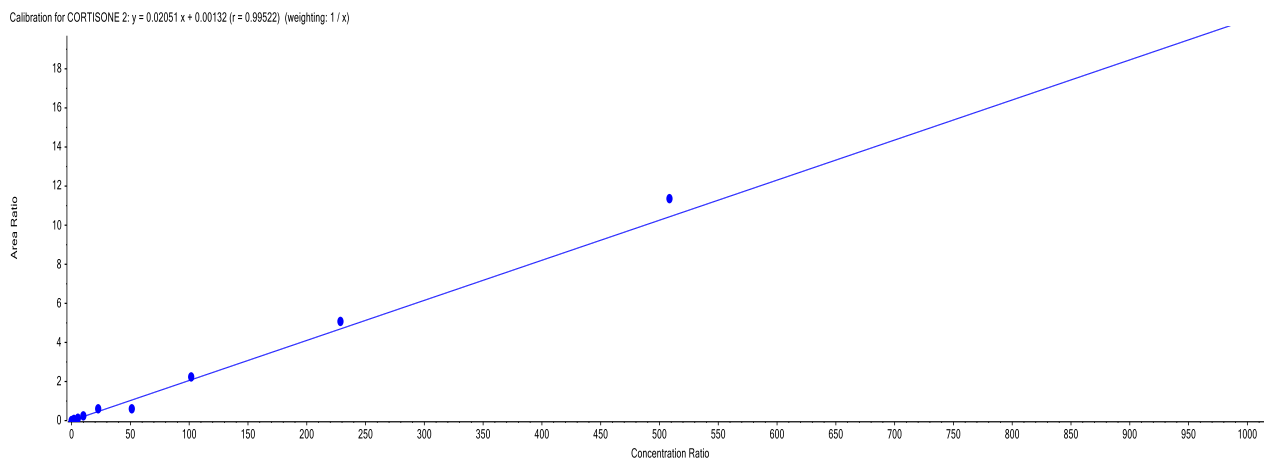
#### 4.1.2. Imprecisie

Bij de eerste uittesting (30/03/17) is het alleen mogelijk om de intra-run variatiecoëfficiënt te berekenen van cortisone, afgelezen met interne standaard (IS) cortisol-d4 (zie tabel 4.3). Cortisone wordt ook afgelezen met interne standaard testosteron-d3, maar hierbij kunnen geen intra-CV's berekend worden omwille van een slechte kalibratiecurve. De gemeten oppervlaktes stijgen niet volgens de oplopende standaardconcentraties en de correlatiecoëfficiënt (r) is aan de lage kant, geïllustreerd in tabel 4.2. Voor corticosterone kan er ook geen goede kalibratiecurve worden opgesteld met zowel IS cortisol-d4 als met IS testosteron-d3 wegens dezelfde reden.

Tabel 4.2: Kalibratiecurven met regressievergelijking en correlatiecoëfficiënt bij de eerste uittesting.

Component	Interne standaard	Regressievergelijking	r
Cortisone	Testosteron-d3	$y = 0,0416 x - 0,0145$	0,7986
Cortisone	Cortisol-d4	$y = 0,0205 x + 0,00132$	0,9952
Corticosterone	Testosteron-d3	$y = 1,69 \cdot 10^{-4} x - 1,66 \cdot 10^{-4}$	0,9450
Corticosterone	Cortisol-d4	$y = 9,62 \cdot 10^{-5} x + 0,0258$	0,9537

Elke analiet heeft als kalibratiemodel een lineair verband (1/x), waarbij de bekomen respons (oppervlakte analiet/ oppervlakte interne standaard) wordt geplot in functie van de gekende concentratie van de standaard, geïllustreerd in onderstaande figuur 4.1.



**Figuur 4.1: Kalibratiecurve van cortisone (361,2/163,1) afgelezen met IS cortisol-d4 bij de eerste uittesting met x-as: concentratie standaard (ng/mL) en y-as: ratio piekoppervlak cortisone/ piekoppervlak IS.**

Om deze redenen worden er twee nieuwe interne standaarden aangekocht namelijk: cortisone-d8 en corticosterone-d4. Er wordt een tweede uittesting (02/05/17) uitgevoerd met alle interne standaarden. Bovendien volgt een derde uittesting (15/05/17), omdat de concentraties van de interne standaarden cortisone-d8 (100 ng/mL) en corticosterone-d4 (5 ng/mL) te laag waren bij de tweede uittesting. De concentraties worden opgedreven naar 1 µg/mL voor cortisone-d8 en naar 100 ng/mL voor corticosterone-d4. De intra-CV's van elke analiet met de geschikte interne standaard worden gerapporteerd in de volgende tabellen 4.3-4.6.

**Tabel 4.3: Intra-CV (%) van cortisone afgelezen met IS cortisol-d4 (n= aantal).**

Cortisone												
361,2/120,8					361,2/163,1							
Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal	Staal
1	4	5	6	4	7	1	4	5	6	4	7	
3003	0205	0205	0205	1505	1505	3003	0205	0205	0205	1505	1505	
ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	
20,39	2,18	3,05	35,06	2,62	18,63	21,42	2,24	2,71	33,15	2,86	19,12	
17,82	2,63	3,44	37,25	2,34	21,57	21,03	3,02	2,61	34,42	3,45	20,84	
22,79	2,78	2,82	33,16	2,44	19,49	27,21	2,84	2,87	32,77	3,13	20,07	
20,62	2,36	3,51	28,64	2,28	18,76	25,33	2,36	2,91	31,56	2,62	20,61	



	28,08	3,11	3,14	29,82	2,73	20,85	29,14	2,87	2,99	30,97	2,80	19,07
	23,19	2,96	2,94	35,29	2,09	17,89	21,24	2,74	2,87	36,02	2,47	18,52
	28,89	2,86	3,10	32,46		19,48	28,40	2,66	2,92	29,40		19,81
	25,17						25,40					
n	8	7	7	7	6	7	8	7	7	7	6	7
$\bar{x}$	23,37	2,70	3,14	33,10	2,42	19,52	24,90	2,68	2,84	32,61	2,89	19,72
SD	3,85	0,33	0,25	3,08	0,23	1,29	3,30	0,28	0,14	2,21	0,35	0,86
CV	16,46	12,25	8,06	9,30	9,68	6,61	13,27	10,59	4,76	6,78	12,22	4,34
(%)												

Uittesting op 30/03/17, 02/05/17 en 15/05/17

Tabel 4.4: Intra-CV (%) van cortisone afgelezen met IS cortisone-d8.

		Cortisone			
		361,2/120,8		361,2/163,1	
		Staal 4	Staal 7	Staal 4	Staal 7
		1505	1505	1505	1505
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
		1,16	13,34	1,51	13,84
		1,26	13,49	1,74	13,21
		1,14	11,67	1,44	12,22
		1,03	14,23	1,52	15,78
		1,27	14,00	1,59	12,95
		1,17	12,48		13,09
			13,31		13,70
n		6	7	5	7
$\bar{x}$		1,17	13,22	1,56	13,54
SD		0,09	0,88	0,12	1,12
CV(%)		7,36	6,67	7,42	8,28

Uittesting 15/05/17

Tabel 4.5: Intra-CV (%) van corticosterone afgelezen met IS testosteron-d3.

		Corticosterone									
		347,3/121,0			347,3/329,3						
		Staal 4	Staal 5	Staal 6	Staal 4	Staal 7	Staal 4	Staal 5	Staal 6	Staal 4	Staal 7
		0205	0205	0205	1505	1505	0205	0205	0205	1505	1505
		pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL
		359,26	192,83	7188,19	213,53	1293,02	326,26	206,24	7631,58	294,46	1415,73
		219,03	160,75	7824,58	192,20	1244,13	261,91	162,82	7969,08	261,21	1285,70

	319,61	187,63	6391,24	200,99	1255,08	317,69	178,21	6934,46	330,14	1291,29
	257,00	234,18	7308,76	179,20	1137,37	363,57	191,53	7146,59	294,70	1231,14
	296,19	183,81	7047,61	220,63	1591,90	332,04	195,97	7236,29	281,91	1430,34
	274,33	207,16	8544,27	219,70	1274,66	307,62	122,59	7919,78	258,87	1357,28
	328,56	160,69	7287,87		1429,63	257,69	169,46	7340,62		1194,71
n	7	7	7	6	7	7	7	7	6	7
$\bar{x}$	293,43	189,58	7370,36	204,38	1317,97	309,54	175,26	7454,06	286,88	1315,17
SD	47,41	25,86	669,70	16,59	148,34	38,15	27,76	395,49	26,30	89,59
CV(%)	16,16	13,64	9,09	8,12	11,26	12,33	15,84	5,31	9,17	6,81

Uittesting op 02/05/17 en 15/05/17

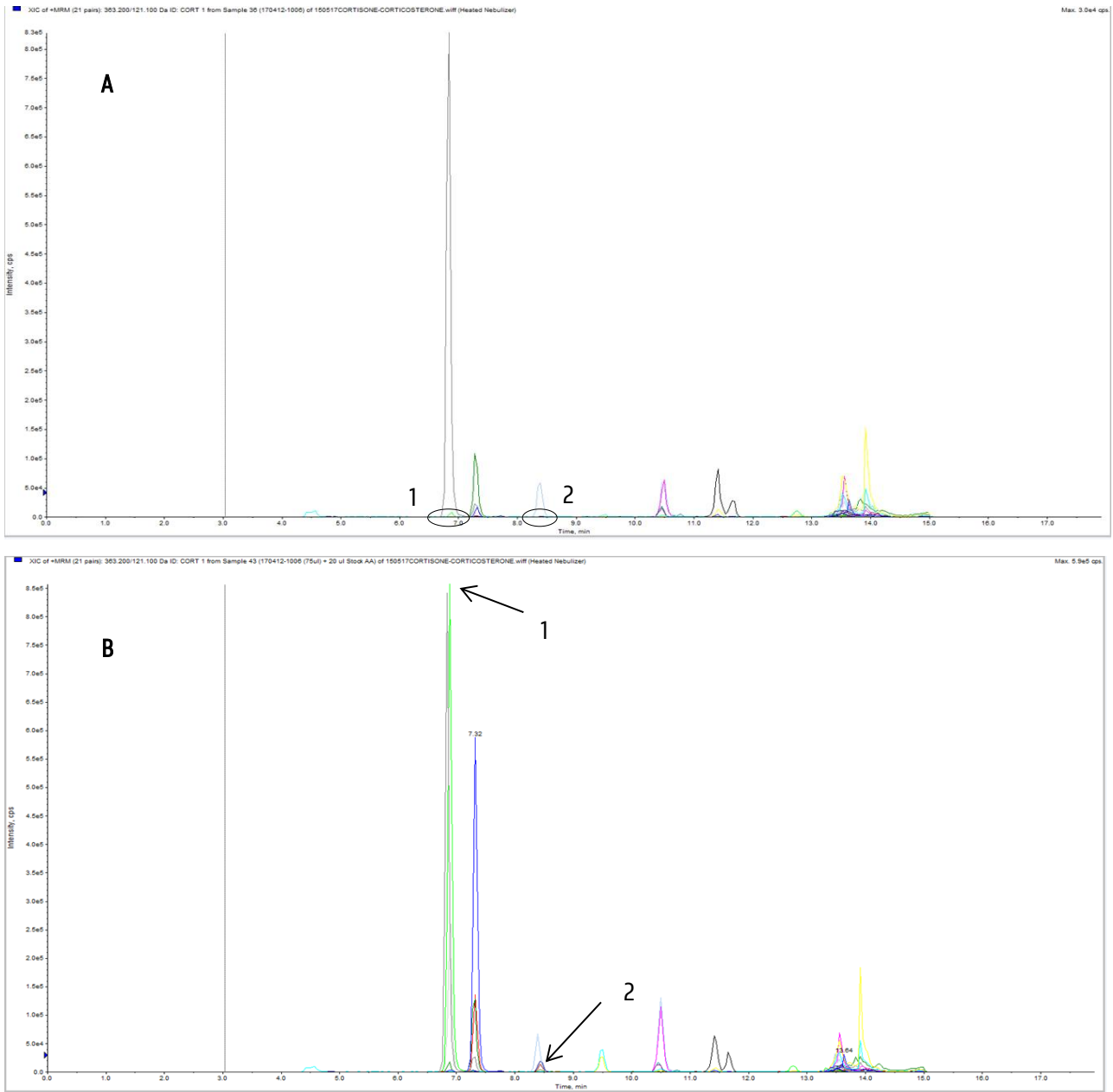
Tabel 4.6: Intra-CV (%) van corticosteroone afgelezen met IS corticosteroone-d4.

	Corticosteroone			
	347,3/121,0		347,3/329,3	
	Staal 4	Staal 7	Staal 4	Staal 7
	1505	1505	1505	1505
	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL
	167,39	914,22	164,69	951,10
	159,52	966,15	147,68	944,27
	168,28	970,31	206,60	944,37
	159,55	864,71	188,69	881,86
	176,52	1145,98	158,51	979,21
	179,72	1010,21	143,74	1021,67
		1007,95		789,75
n	6	7	6	7
$\bar{x}$	168,50	982,79	168,32	930,32
SD	8,39	88,60	24,58	74,91
CV(%)	4,98	9,01	14,60	8,05

Uittesting op 15/05/17

#### 4.1.3. Onjuistheid

Om de recovery te bepalen wordt een blanco matrix of serumstaal met een gekende hoeveelheid analiet belast met een gekende hoeveelheid standaard. In de volgende figuur 4.2 wordt een chromatogram weergegeven voor en na de *spiking*.



**Figuur 4.2:** [A] Chromatogram van een blanco serumstaal met x-as: retentietijd (min) en y-as: intensiteit (cps). [B] Chromatogram van een serumstaal belast met 200 ng/mL cortisone en 4000 pg/mL corticosterone. Noot: 1= cortisone; 2= corticosterone.

Bij de eerste uittesting worden de recovery's (zie tabel 4.7) in tweevoud bepaald op serumstalen met een cortisone concentratie van 17,18 en 19,64 ng/mL voor staal 2 en 11,91 en 13,76 ng/mL voor staal 3, respectievelijk voor de massa transitie 361,2/120,8 en 361,2/163,1 na het *spiken* met 10 en 51 ng/mL. Bij de derde uittesting (zie tabel 4.7) worden de recovery's ook in tweevoud (m.u.v. staal 4) bepaald op serumstalen na het *spiken* met 100 en 200 ng/mL. De cortisone concentratie voor staal 4 en staal 7 wordt weergegeven in tabel 4.3 en voor staal 8 bedraagt de

concentratie 17,13 en 17,57 ng/mL en voor staal 9 27,37 en 28,73 ng/mL. De recovery's worden afgelezen met cortisol-d4.

**Tabel 4.7: Recovery (%) van cortisone afgelezen met IS cortisol-d4.**

Staal	Cortisone					
	361,2/120,8			361,2/163,1		
	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery
	ng/mL	ng/mL	%	ng/mL	ng/mL	%
2	27,18	31,16	114,62	29,64	36,53	123,22
	27,18	30,42	111,91	29,64	30,29	102,20
	68,18	63,64	93,34	70,64	68,72	97,28
	68,18	66,10	96,94	70,64	67,32	95,29
3	21,91	19,44	88,71	23,76	22,87	96,23
	21,91	27,02	123,32	23,76	27,27	114,74
	62,91	53,44	84,95	64,76	57,63	88,99
	62,91	54,49	86,62	64,76	67,16	103,70
Uittesting op 30/03/17						
4	102,42	145,93	142,49	102,89	140,72	136,77
	202,42	343,13	169,52	202,89	321,81	158,62
7	119,52	179,68	150,33	119,72	172,28	143,90
	119,52	152,93	127,95	119,72	135,86	113,48
	219,52	289,07	131,68	219,72	307,96	140,16
	219,52	279,26	127,21	219,72	238,89	108,72
8	117,13	157,76	134,68	117,57	157,58	134,03
	117,13	156,33	133,47	117,57	158,05	134,42
	217,13	335,02	154,29	217,57	326,16	149,91
	217,13	297,49	137,01	217,57	299,47	137,64
9	127,37	144,23	113,24	128,73	171,18	132,98
	127,37	157,13	123,37	128,73	163,24	126,81
	227,37	265,58	116,81	228,73	270,37	118,21
	227,37	301,83	132,75	228,73	296,09	129,45
Uittesting op 15/05/17						

De recovery's (zie tabel 4.8) worden nogmaals bepaald in tweevoud (m.u.v. staal 4) op serumstalen na het *spiken* met 100 en 200 ng/mL. Staal 4 heeft een cortisone concentratie kleiner dan de LoQ, staal 7 zie tabel 4.4, staal 8 met 12,48 en 12,91 ng/mL en staal 9 met 19,12 en 20,25 ng/mL, respectievelijk voor massatransitie 361,2/120,8 en 361,2/163,1. Deze recovery's worden afgelezen met cortisone-d8.

**Tabel 4.8: Recovery (%) van cortisone afgelezen met IS cortisone-d8.**

Cortisone						
Staal	361,2/120,8			361,2/163,1		
	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery
	ng/mL	ng/mL	%	ng/mL	ng/mL	%
4	100,00	100,77	100,77	100,00	97,37	97,37
	200,00	243,35	121,68	200,00	228,53	114,27
7	113,22	122,87	108,53	113,54	118,02	103,94
	113,22	121,67	107,46	113,54	108,24	95,33
	213,22	218,16	102,32	213,54	232,69	108,97
	213,22	211,87	99,37	213,54	181,43	84,96
8	112,48	108,09	96,10	112,91	108,18	95,82
	112,48	112,97	100,43	112,91	114,41	101,33
	212,48	233,16	109,73	212,91	227,27	106,75
	212,48	221,75	104,36	212,91	223,49	104,97
9	119,12	99,69	83,68	120,25	118,57	98,60
	119,12	113,44	95,23	120,25	118,06	98,18
	219,12	201,44	91,93	220,25	205,31	93,22
	219,12	212,53	96,99	220,25	208,75	94,78

Uittesting 15/05/17

De recovery's van corticosterone (zie tabel 4.9) worden bepaald in tweevoud (m.u.v. staal 4) op serumstalen nadat ze belast zijn met 2000 en 4000 pg/mL. Staal 4 bevat een corticosterone concentratie kleiner dan de LoQ en 286,88 pg/mL, staal 7 zie tabel 4.5, staal 8 met 15079,10 en 15065,83 pg/mL en staal 9 met 8372,90 en 8596,20 pg/mL, respectievelijk voor de massatransitie 347,3/121,0 en 347,3/329,3. De recovery's worden afgelezen met testosteron-d3.

**Tabel 4.9: Recovery (%) van corticosterone afgelezen met IS testosteron-d3.**

Corticosterone						
Staal	Theoretische concentratie	347,3/121,0		347,3/329,3		Recovery
		Gevonden concentratie	Recovery	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	
	pg/mL	pg/mL	%	pg/mL	pg/mL	%
4	2000,00	2377,03	118,85	2286,88	2420,16	105,83
	4000,00	5108,17	127,70	4286,88	4978,03	116,12
7	3317,97	4065,02	122,52	3315,17	4011,13	120,99
	3317,97	3815,15	114,98	3315,17	3596,55	108,49

	5317,97	6766,99	127,25	5315,17	6615,28	124,46
	5317,97	6077,61	114,28	5315,17	5604,38	105,44
8	17079,10	17100,98	100,13	17065,83	16448,93	96,39
	17079,10	19988,76	117,04	17065,83	19609,40	114,90
	19079,10	20554,57	107,73	19065,83	19950,90	104,64
	19079,10	20400,6	106,93	19065,83	19709,31	103,38
9	10372,90	9620,24	92,74	10596,20	10865,98	102,55
	10372,90	11077,72	106,79	10596,20	10797,56	101,90
	12372,90	11840,76	95,70	12596,20	12226,78	97,07
	12372,90	12380,06	100,06	12596,20	13732,80	109,02

Uittesting 15/05/17

De recovery's (zie tabel 4.10) worden opnieuw bepaald in tweevoud (m.u.v. staal 4) op serumstalen na het *spiken* met 2000 en 4000 pg/mL. Staal 4 heeft een corticosterone concentratie kleiner dan de LoQ, staal 7 zie tabel 4.6, staal 8 met 12562,53 en 12590,79 pg/mL en staal 9 met 6568,06 en 6774,86 pg/mL. Ditmaal wordt er afgelezen met corticosterone-d4.

**Tabel 4.10: Recovery (%) van corticosterone afgelezen met IS corticosterone-d4.**

Staal	Corticosterone					
	347,3/121,0	347,3/329,3			347,3/329,3	
	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery
	pg/mL	pg/mL	%	pg/mL	pg/mL	%
4	2000,00	2170,38	108,52	2000,00	2165,39	108,27
	4000,00	5399,81	135,00	4000,00	5247,02	131,18
7	2982,79	3155,99	105,81	2930,32	3091,35	105,50
	2982,79	2765,43	92,71	2930,32	2579,65	88,03
	4982,79	4755,60	95,44	4930,32	4653,21	94,38
	4982,79	4945,81	99,26	4930,32	4557,33	92,43
8	14562,53	12993,53	89,23	14590,79	12615,16	86,46
	14562,53	15490,97	106,38	14590,79	15353,08	105,22
	16562,53	16392,90	98,98	16590,79	16076,84	96,90
	16562,53	17136,13	103,46	16590,79	16727,93	100,83
9	8568,06	8104,35	94,59	8774,86	9215,78	105,02
	8568,06	8361,43	97,59	8774,86	8202,97	93,48
	10568,06	9469,31	89,60	10774,86	9852,32	91,44
	10568,06	10955,77	103,67	10774,86	12256,57	113,75

Uittesting 15/05/17

#### 4.1.4. Matrix-effect

Het matrix-effect wordt bepaald in tweevoud door het *spiken* van een blanco serumstaal met 100 en 200 ng/mL cortisone en 2000 en 4000 pg/mL corticosterone na extractie (zie tabel 4.11).

**Tabel 4.11: Matrix-effect (%) van cortisone en corticosterone van staal 5.**

Spike concentratie	Cortisone (361,2/163,1)		Corticosterone (347,3/329,3)	
	Cortisone-d8	Cortisol-d4	Corticosterone-d4	Testosteron-d3
	%	%	%	%
100 ng/mL en 2000 pg/mL	125,86	80,87	102,22	60,89
100 ng/mL en 2000 pg/mL	135,14	92,60	120,66	63,44
200 ng/mL en 4000 pg/mL	149,74	89,35	92,26	54,98
200 ng/mL en 4000 pg/mL	113,33	82,71	91,88	84,74
$\bar{x}$	131,02	86,38	101,76	66,02
SD	15,35	5,51	13,48	12,98
CV	11,72	6,38	13,25	19,66

Uittesting op 15/05/17

#### 4.1.5. Methode vergelijking: Passing-Bablok regressie

Om de resultaten van de verschillende interne standaarden en de verschillende massa transitie voor cortisone en corticosterone te vergelijken wordt een statistische test toegepast. De Passing-Bablok regressie drukt de verkregen relatie uit door middel van een regressievergelijking  $y = A + Bx$ . Het snijpunt A van de curve is een maat voor de systematische verschillen en de richtingscoëfficiënt B voor de proportionele verschillen [43]. In de volgende tabel 4.12 worden de verschillende vergelijkingen weergegeven afkomstig van alle resultaten van de derde uittesting.

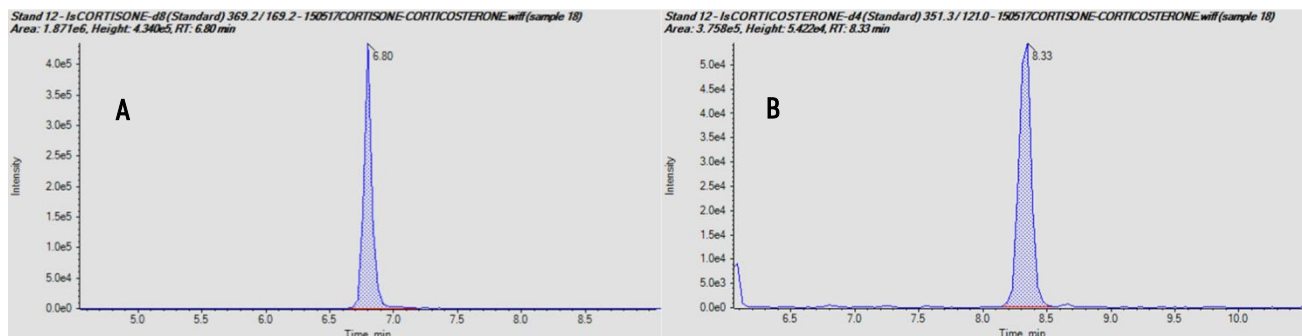
Tabel 4.12: Passing-Bablok regressies van de derde uittesting waarbij de ene methode (y-as) wordt geplot in functie van de andere methode (x-as). (cortico = corticosterone, testo= testosteron)

	<p>Variabele X: cortisone 361,2/120,8 cortisone-d8            Variabele Y: cortisone 361,2/120,8 cortisol-d4            Aantal: 87</p> <p>Regressievergelijking: <math>y = 0,55 + 1,42x</math></p> <p>Systematisch verschil            Snijpunt A: 0,55            95% BI [0,081; 0,930]            Proportioneel verschil            Rico B: 1,42            95% BI [1,385; 1,447]</p>
	<p>Variabele X: cortisone 361,2/163,1 cortisone-d8            Variabele Y: cortisone 361,2/163,1 cortisol-d4            Aantal: 87</p> <p>Regressievergelijking: <math>y = 0,31 + 1,42x</math></p> <p>Systematisch verschil            Snijpunt A: 0,31            95% BI [-0,001; 0,695]            Proportioneel verschil            Rico B: 1,42            95% BI [1,382; 1,445]</p>
	<p>Variabele X: cortisone 361,2/163,1 cortisone-d8            Variabele Y: cortisone 361,2/120,8 cortisone-d8            Aantal: 87</p> <p>Regressievergelijking: <math>y = -0,22 + 0,98x</math></p> <p>Systematisch verschil            Snijpunt A: -0,22            95% BI [-0,513; 0,013]            Proportioneel verschil            Rico B: 0,98            95% BI [0,963; 1,002]</p>



	<p>Variabele X: corticosterone 347,3/121,0 cortico- d4            Variabele Y: corticosterone 347,3/121,0 testo-d3            Aantal: 84</p> <p>Regressievergelijking: <math>y = -1,13 + 1,26 x</math></p> <p>Systematisch verschil            Snijpunt A: -1,13            95% BI [-16,493; 44,387]</p> <p>Proportioneel verschil            Rico B: 1,26            95% BI [1,220; 1,300]</p>
	<p>Variabele X: corticosterone 347,3/329,3 cortico-d4            Variabele Y: corticosterone 347,3/329,3 testo-d3            Aantal: 84</p> <p>Regressievergelijking: <math>y = 86,04 + 1,25x</math></p> <p>Systematisch verschil            Snijpunt A: 86,04            95% BI [67,470; 120,990]</p> <p>Proportioneel verschil            Rico B: 1,25            95% BI [1,205; 1,287]</p>
	<p>Variabele X: corticosterone 347,3/329,3 cortico-d4            Variabele Y: corticosterone 347,3/121,0 cortico-d4            Aantal: 84</p> <p>Regressievergelijking: <math>y = 11,11 + 0,99x</math></p> <p>Systematisch verschil            Snijpunt A: 11,11            95% BI [-9,342; 25,768]</p> <p>Proportioneel verschil            Rico B: 0,99            95% BI [0,981; 1,013]</p>

Uit de voorgaande resultaten wordt besloten (zie discussie) om cortisone af te lezen met interne standaard cortisone-d8 en corticosterone met interne standaard corticosterone-d4. In onderstaande figuur 4.3 wordt weergegeven hoe de twee interne standaarden chromatograferen.



**Figuur 4.3:** [A] Chromatogram van IS cortisone-d8 (369,2/169,2). [B] Chromatogram van IS corticosterone-d4 (351,3/121,0).

## 4.2. URINE

De aangepaste acquisitie methode wordt kort getest in urine in derde uittesting (15/05/17). Hiervoor worden urinestalen gebruikt afkomstig van drie verschillende vrouwen (staal 10: 86 jaar, staal 11: 35 jaar en staal 12: 41 jaar). Op de urinestalen wordt een *spiking* uitgevoerd om de onjuistheid van de methode te schatten. Ook wordt de ratio cortisol/cortisone nagegaan in urine.

### 4.2.1. Onjuistheid

De recovery's van cortisone en corticosterone (zie tabel 4.13) worden bepaald in tweevoud op urinestalen met een cortisone concentratie van 30,01; 22,25 en 29,76 ng/mL en een corticosterone concentratie kleiner dan de LoQ voor de respectievelijke stalen 10, 11 en 12 na het *spiken* met 100 en 200 ng/mL voor cortisone en met 2000 en 4000 pg/mL voor corticosterone. Deze recovery waarden worden afgelezen met IS cortisone-d8 voor cortisone en IS corticosterone-d4 voor corticosterone.

**Tabel 4.13: Recovery (%) van cortisone en corticosterone in urinestalen.**

Staal	Cortisone (361,2/163,1)			Corticosterone (347,3/329,3)		
	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery	Theoretische concentratie	Gevonden concentratie	Recovery
	ng/mL	ng/mL	%	pg/mL	pg/mL	%
10	130,01	110,74	85,17	2000,00	1951,95	97,60

	130,01	128,75	99,03	2000,00	2054,28	102,71
	230,01	237,48	103,25	4000,00	3350,81	83,77
	230,01	233,59	101,56	4000,00	3905,04	97,63
11	122,25	111,86	91,50	2000,00	2059,37	102,97
	122,25	108,48	88,74	2000,00	2143,89	107,19
	222,25	202,65	91,18	4000,00	3944,81	98,62
	222,25	213,85	96,22	4000,00	4502,41	112,56
12	129,76	144,61	111,44	2000,00	2090,18	104,51
	129,76	125,73	96,89	2000,00	1978,62	98,93
	229,76	231,96	100,96	4000,00	4207,74	105,19
	229,76	218,98	95,31	4000,00	4046,50	101,16

Uittesting 15/05/17

#### 4.2.2. Ratio cortisol/cortisone

De concentraties van cortisol en cortisone uitgedrukt in  $\mu\text{g}/24\text{h}$  worden weergegeven van staal 10,11 en 12 voor en na het *spiken* van 100 en 200 ng/mL cortisone (zie tabel 4.14). Hierop wordt vervolgens de ratio F/E bepaald.

**Tabel 4.14: Resultaten van cortisol en cortisone in urine en de ratio F/E.**

	Cortisol (363,2/121,1) $\mu\text{g}/24\text{h}$	Cortisone (361,2/163,1) $\mu\text{g}/24\text{h}$	Ratio F/E
Staal 10	9,55	61,27	0,16
Staal 10	9,83	72,58	0,14
Staal 10 + 100 ng/mL	154,57	253,11	0,61
Staal 10 + 100 ng/mL	171,89	294,94	0,58
Staal 10 + 200 ng/mL	358,32	618,45	0,58
Staal 10 + 200 ng/mL	340,39	511,51	0,67
Staal 11	9,12	44,91	0,20
Staal 11	9,19	42,84	0,21
Staal 11 + 100 ng/mL	157,17	241,35	0,65
Staal 11 + 100 ng/mL	137,08	220,27	0,62
Staal 11 + 200 ng/mL	293,11	388,17	0,76
Staal 11 + 200 ng/mL	283,03	416,37	0,68
Staal 12	27,31	159,63	0,17
Staal 12	28,44	142,86	0,20
Staal 12 + 100 ng/mL	340,31	669,35	0,51
Staal 12 + 100 ng/mL	362,32	616,12	0,59
Staal 12 + 200 ng/mL	642,77	1048,70	0,61
Staal 12 + 200 ng/mL	783,49	1065,21	0,74

Uittesting 15/05/17

## 5. DISCUSSIE

In de literatuur wordt onderzocht welke  $m/z$  waarden voor het precursor ion en de product ionen van elk analiet worden weergegeven. De  $m/z$  waarden uit Kushnir *et al.* [5] en Gao *et al.* [42] vormen het uitgangspunt voor de manuele tuning. Voor cortisone worden de volgende precursor ion/product ionen gevonden: 361,2/120,8 en 361,2/163,1. Voor corticosterone worden 347,3/329,3; 347,3/121,0 en 347,3/97,1 vastgesteld. Deze massatransities met elk hun component afhankelijke parameters worden toegevoegd aan de bestaande cortisol-testosteron methode op de LC-MS/MS met APCI in de positieve modus. De optimalisatie van elke analiet zorgt ervoor dat de componenten met een hoge gevoeligheid en specificiteit gedetecteerd kunnen worden in de MRM modus.

De methode moet primair geschikt zijn voor kwantitatieve bepaling van cortisone en corticosterone in serum. Tijdens de dag varieert het gehalte van cortisone tussen 6-35 ng/mL en van corticosterone tussen 600-18600 pg/mL, geïllustreerd in tabel 1.1. Het meetbereik wordt zo opgesteld dat de courante concentraties in het serum kunnen gemeten worden en dat de kritische concentraties niet helemaal aan de uitersten van het meetbereik liggen. Cortisone en corticosterone worden voor een eerste keer bepaald in serum om na te gaan of het meetbereik van de standaardcurve voldoende is om deze concentraties in het lichaam te bepalen. Volgens de retentietijd wordt de best passende interne standaard van de bestaande cortisol-testosteron methode gekozen voor elke analiet. Cortisone wordt afgelezen met interne standaard cortisol-d4 en corticosterone wordt afgelezen met interne standaard testosteron-d3. Er wordt een goede kalibratiecurve bekomen per analiet. Bij de eerste uittesting kan alleen de intra-CV en recovery berekend worden van cortisone afgelezen met interne standaard cortisol-d4 en niet bij de component corticosterone, omdat er slechts één goede kalibratiecurve wordt teruggevonden (zie figuur 4.1). Er worden twee nieuwe interne standaarden, namelijk IS cortisone-d8 en IS corticosterone-d4 toegevoegd aan de mix van IS vooraleer een tweede uittesting wordt uitgevoerd. Hierbij wordt er opgemerkt dat de concentratie van de interne standaard cortisone-d8 en corticosterone-d4 aan de lage kant is (respectievelijk 100 ng/mL en 5 ng/mL), waardoor het verlies tijdens de extractiestap onvoldoende kan gecorrigeerd worden. Naar aanleiding van de derde uittesting wordt de mix van IS opgedreven voor cortisone-d8 naar 1 µg/mL en voor corticosterone-d4 naar 100 ng/mL.

Uit tabel 4.3 en 4.4 kan de bepaalbaarheidsgrens van cortisone vastgelegd worden op  $\pm 2,29$  ng/mL, want er wordt een goede intra-CV (<7,50%) teruggevonden voor een cortisone concentratie kleiner dan 2 ng/mL. Voor corticosterone wordt de LoQ vastgelegd op  $\pm 215,9$  pg/mL, omdat de intra-CV (<15%) voldoet voor een corticosterone

concentratie kleiner dan 200 pg/mL (zie tabel 4.5 en 4.6). De bepaalbaarheidsgrens voor cortisone is standaard 4 en voor corticosterone standaard 6, geïllustreerd in tabel 3.1. Het meetbereik voor cortisone schommelt tussen 2,29-1018 ng/mL en voor corticosterone tussen 215,9-21592 pg/mL.

Via de recovery's wordt de onjuistheid van de methode geschat. De resultaten van de recovery's worden geëvalueerd aan de hand van de 'Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation' uitgegeven door de Food and Drug Administration (FDA). Deze criteria stellen dat de bekomen resultaten 15% mogen afwijken van de referentiewaarde, met uitzondering voor de LoQ 20% [38]. In de derde uittesting voldoen de recovery's in serum van cortisone afgelezen met interne standaard cortisol-d4 niet aan de voorwaarden. Echter de recovery's afgelezen met interne standaard cortisone-d8 voldoen grotendeels aan de voorwaarden. De recovery's in serum voor corticosterone afgelezen met interne standaard corticosterone-d4 en met interne standaard testosteron-d3 voldoen aan de voorwaarden, hoewel er meer afwijkingen zijn met testosteron-d3 ten opzichte van corticosterone-d4.

De massatransitie 361,2/163,1 van cortisone wordt geselecteerd voor kwantificatie omdat het piekoppervlak 3,8 keer groter is ten opzichte van de massatransitie 361,2/120,8, waardoor de eerst genoemde massa transitie gemakkelijker afleest. In de Passing-Bablok regressie van beide transities (zie tabel 4.12) wordt er geen verschil gevonden tussen de gemeten waarden vermits 1 tot het 95% betrouwbaarheidsinterval behoort. Daarom fungeert de massatransitie 361,2/163,1 als *quantifier*. De massatransitie 361,2/120,8 wordt gebruikt voor confirmatie van de analiet bij twijfelgevallen. Dezelfde argumenten worden aangehaald bij de tweede analiet corticosterone. Het piekoppervlak van de massatransitie 347,3/329,3 is 1,6 keer groter dan 347,3/121,0, dus de massatransitie 347,3/329,3 wordt geselecteerd als *quantifier*. Indien nodig wordt de massatransitie 347,3/121,0 gebruikt voor confirmatie. De massa transitie 347,3/97,1 komt niet in aanmerking voor confirmatie, want dit product ion komt voor als een dubbele piek in het chromatogram, wat het aflezen en dus de kwalificatie bemoeilijkt.

Het matrix-effect in serum (tabel 4.11) wordt weergegeven van de gekozen *quantifier* transities van de analieten en er wordt een vergelijking gemaakt tussen de twee interne standaarden voor elke analiet. De interne standaard cortisol-d4 en interne standaard corticosterone-d4 geven de beste resultaten weer voor de beoogde 100%.

Aan de hand van de Passing-Bablok regressies (tabel 4.12) en de voorgaande resultaten wordt uitsluitend gegeven over welke interne standaard het meest geschikt is voor de te bepalen analiet. Uit de Passing-Bablok

regressies waarin IS cortisone-d8 wordt uitgezet ten opzichte van IS cortisol-d4 wordt afgeleid dat de cortisone concentraties  $\pm 42\%$  hoger liggen bij IS cortisol-d4. Door deze analyse wordt besloten dat de IS cortisone-d8 het meest geschikt is voor de analiet cortisone, ondanks dat de resultaten voor het matrix-effect tegenvallen. Verder onderzoek is noodzakelijk om een juiste vaststelling te maken over de aanwezigheid van een matrix-effect, omdat het in deze masterproef slechts eenmalig werd bepaald. Bij de vergelijking van IS corticosterone-d4 en IS testosteron-d3 in de Passing-Bablok regressie wordt er waargenomen dat de corticosterone concentraties met IS testosteron-d3  $\pm 25,5\%$  hoger liggen. Dus voor de analiet corticosterone wordt geopteerd voor de IS corticosterone-d4. Bij deze interne standaard is er hoogstwaarschijnlijk geen matrix-effect aanwezig.

In urine wordt vervolgens kort de aangepaste acquisitie methode getest. Er wordt vastgesteld dat de resultaten van de recovery's van cortisone en corticosterone voldoen aan de voorwaarden van de FDA, op voorwaarde dat de afwijking voor corticosterone buiten beschouwing wordt gelaten. De gevonden waarden van cortisone vallen binnen de referentiewaarden, behalve voor staal 12. De berekende ratio's cortisol/cortisone worden getoetst aan de publicatie Antonelli *et al.* [7]. Er wordt een range van 0,14-0,76 bekomen en deze ligt binnen de gepubliceerde referentierange (0,14-1,09).

De aangepaste acquisitie methode heeft de capaciteit verworven om de 21-koolstof glucocorticoïden cortisol, cortisone en corticosterone gescheiden te analyseren. Dit is mogelijk door de introductie van de gedeutereerde interne standaarden van elke analiet, namelijk cortisol-d4, cortisone-d8 en corticosterone-d4. De imprecisie van deze methode kon slechts gedeeltelijk gevalideerd worden wegens tijdsgebrek. In verder onderzoek is het essentieel om de inter-run variatiecoëfficiënt te bepalen. De recovery's schatten de onjuistheid van deze methode, waarbij interne standaarden cortisone-d8 en corticosterone-d4 voldeden aan de voorwaarden, mits die ene waarde voor corticosterone aangenomen wordt als een afwijking. Een nog betere inschatting van potentiële onjuistheid kan gemaakt worden door een vergelijking met andere MS deelnemers in externe kwaliteitsevaluatie. Het is wenselijk om het matrix-effect experiment opnieuw uit te voeren, zodat er een duidelijk beeld wordt geschetst over dit fenomeen voor beide analieten. Dit is momenteel mogelijk beperkend voor cortisone met interne standaard cortisone-d8. De methode werd kort getoetst in urine, waarbij de recovery's voldeden aan de voorwaarden en de ratio's binnen de referentiewaarden lagen. Urine blijkt een haalbare matrix te zijn. Een verder uitgewerkt validatie onderzoek kan hierover definitief uitsluitsel geven. In de toekomst is het interessant om deze aangepaste methode toe te passen in speeksel, omwille van zijn diagnostische functie in bijvoorbeeld het syndroom van Cushing. Deze uittesting kon niet plaatsvinden wegens tijdsgebrek.

## 6. CONCLUSIE

In dit onderzoek werd een LC-MS/MS methode ontwikkeld die simultaan cortisol, cortisone en corticosterone kan identificeren in serumstalen. Dit is mogelijk door verder te bouwen op de bestaande cortisol-testosteron methode. Tijdens de tuning werden de verschillende massa transities voor cortisone en corticosterone bepaald. Tegelijk werden de component afhankelijke parameters per massa transitie vastgelegd. Aansluitend volgde een beperkt validatie onderzoek.

De bepaalbaarheidsgrens in serum is 2,29 ng/mL voor cortisone en 215,9 pg/mL voor corticosterone. De imprecisie wordt gestaafd door de intra-CV, namelijk <7,50% voor cortisone en <15% voor corticosterone. Uit de resultaten van de recovery's en de Passing-Bablok regressies wordt geconcludeerd dat de beste IS voor cortisone IS cortisone-d8 is en voor corticosterone IS corticosterone-d4. De range van de recovery's van cortisone variëren van 85% tot 114% met interne standaard cortisone-d8 en voor corticosterone van 87% tot 114% met interne standaard corticosterone-d4. Deze recovery's van beide analieten voldoen aan de criteria volgens de FDA richtlijnen. Er wordt wel een matrix-effect vastgesteld voor cortisone met IS cortisone-d8. Dit is niet het geval voor IS corticosterone-d4. Als *quantifier* wordt de massatransitie 361,2/163,1 van cortisone en 347,3/329,3 van corticosterone geselecteerd. De massatransitie 361,2/120,8 van cortisone en 347,3/121,0 van corticosterone worden geselecteerd voor confirmatie van de analieten.

De toetsing van deze aangepaste acquisitie methode in urine was succesvol. De recovery's van cortisone variëren van 85% tot 111% en voor corticosterone van 98% tot 113% en de ratio's cortisol/cortisone liggen binnen het gepubliceerde referentiebereik van Antonelli *et al.* [7].

Introductie van deze aangepaste LC-MS/MS methode in de routine vereist bijkomende validatie zoals de bepaling van inter-run variatiecoëfficiënt. Ook is het noodzakelijk om het matrix-effect opnieuw te bepalen en op zoek te gaan naar externe kwaliteitsevaluaties, zodat de onjuistheid van deze methode beter benaderd wordt. De gunstige resultaten in urine moeten de stimulans geven om dit uit te werken in verder onderzoek. Bovendien is het interessant om deze methode ook te toetsen in speeksel.

## 7. LITERATUURLIJST

- [1] Norman AW, Dean MC, Henry HL. Hormones. Academic Press; 2014. 430 p.
- [2] Nussey S, Whitehead SA, National Institutes of Health (U.S.). PubMed Central, National Center for Biotechnology Information (U.S.). Endocrinology : an integrated approach. Bios; 2001. 358 p.
- [3] Arlt W, Stewart PM. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34(2):293–313.
- [4] Hu J, Zhang Z, Shen W-J, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7(1):47.
- [5] Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J, Meikle AW. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem.* 2011;44(1):77–88.
- [6] Tomlinson JW, Stewart PM. Cortisol metabolism and the role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001;15(1):61–78.
- [7] Antonelli G, Artusi C, Marinova M, Brugnolo L, Zaninotto M, Scaroni C, et al. Cortisol and cortisone ratio in urine: LC-MS/MS method validation and preliminary clinical application. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(2):213–20.
- [8] The PubChem Project [Internet]. [cited 2017 Mar 17]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [9] Carvalho VM, Nakamura OH, Vieira JGH. Simultaneous quantitation of seven endogenous C-21 adrenal steroids by liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2008;872(1–2):154–61.
- [10] Ceccato F, Boscaro M. Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2016;23(3):209–15.
- [11] Jacobson L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34(2):271–92.
- [12] Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin Biochem.* 2009;42(12):1205–17.
- [13] Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002;53(4):865–71.
- [14] Lab Test Directory [Internet]. [cited 2017 Mar 13]. Available from: <http://ltd.aruplab.com/>
- [15] Taylor RL, Machacek D, Singh RJ. Validation of a high-throughput liquid chromatography - Tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone. *Clin Chem.* 2002;48(9):1511–9.
- [16] Hawley JM, Keevil BG. Endogenous glucocorticoid analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in routine clinical laboratories. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;162:27–40.



- [17] Perogamvros I, Keevil BG, Ray DW, Trainer PJ. Salivary cortisone is a potential biomarker for serum free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):4951–8.
- [18] Raubenheimer PJ, Young EA, Andrew R, Seckl JR. The role of corticosterone in human hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65(1):22–6.
- [19] Kuhnle U, Lewicka S, Fuller PJ. Endocrine disorders of sodium regulation: Role of adrenal steroids in genetic defects causing sodium loss or sodium retention. *Horm Res.* 2004;61(2):68–83.
- [20] Symptoms and causes - Congenital adrenal hyperplasia - Mayo Clinic [Internet]. [cited 2017 Mar 9]. Available from: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/congenital-adrenal-hyperplasia/symptoms-causes/dxc-20309080>
- [21] Nieman LK, Chanco Turner ML. Addison's disease. *Clin Dermatol.* 2006;24(4):276–80.
- [22] Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis : Basic Methodology and Recent Advances. *Int J Biomed Science.* 2006;2(2):217–35.
- [23] He JL, Wang DS, Fan SK. Opto-microfluidic immunosensors: From colorimetric to plasmonic. *Micromachines.* 2016;7(2).
- [24] Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol.* 2013;133(9):e12.
- [25] Blood Grouping Reagents | Lorne Laboratories UK [Internet]. [cited 2017 Mar 22]. Available from: <http://www.lornelabs.com/>
- [26] Richter MM. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem Rev.* 2004;104(6):3003–36.
- [27] Hu L, Xu G. Applications and trends in electrochemiluminescence. *Chem Soc Rev.* 2010;39(8):3275–304.
- [28] Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: How to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(2):D1–12.
- [29] Bunch DR, Wang S. Steroid Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Derivatization Consideration. *J Chromatogr Sep Tech.* 2014;5(4):1.
- [30] Hoffmann E De, Stroobant V. Mass Spectrometry - Principles and Applications. Vol. 29, Mass spectrometry reviews. 2007. 945-61 p.
- [31] Keevil BG. LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory. *Clin Biochem.* 2016;49(13–14):989–97.
- [32] Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009;30:19–34.
- [33] Gao W, Stalder T, Kirschbaum C. Quantitative analysis of estradiol and six other steroid hormones in human saliva using a high throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *Talanta.* 2015;143:353–8.

- [34] How Does High Performance Liquid Chromatography Work? : Waters [Internet]. [cited 2017 Apr 9]. Available from: [http://www.waters.com/waters/en\\_BE/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_BE](http://www.waters.com/waters/en_BE/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_BE)
- [35] Grebe SKG, Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? Clin Biochem Rev. 2011;32(1):5-31.
- [36] Gross JH. Mass spectrometry : a textbook. Springer; 2010. 753 p.
- [37] Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. Forensic Sci Int. 2007;165(2-3):216-24.
- [38] Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Dep Heal Hum Serv. 2001;4-10.
- [39] Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. TrAC - Trends Anal Chem. 2004;23(8):535-52.
- [40] Taylor PJ. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Clin Biochem. 2005;38(4):328-34.
- [41] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal Chem. 2003;75(13):3019-30.
- [42] Gao W, Stalder T, Foley P, Rauh M, Deng H, Kirschbaum C. Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2013;928:1-8.
- [43] Z-14: Estimating Analytical Errors Using Regression Statistics - Westgard [Internet]. [cited 2017 Jun 1]. Available from: <https://www.westgard.com/lesson44.htm>

## ADDENDUM: VERSLAG INTERNATIONALIZATION@HOME

### Therapietrouw en communicatie; van woorden naar daden.

Vooral bij chronische aandoeningen is het van belang dat de therapietrouwheid hoog is. Professor Sandra Van Dulmen expliciteert dat dit in veel gevallen een groot probleem vormt, waarbij verschillende factoren aan de basis liggen zoals het gezondheidssysteem, psychologische factoren, ziektekenmerken... De patiënten kunnen intentioneel en niet-intentioneel therapieontrouw zijn. Bij intentionele therapieontrouwheid ligt de misvatting over het geneesmiddel aan de basis zoals zorgen om bijwerkingen en de noodzaak van inname niet inzien. Het vergeten innemen van een geneesmiddel of het niet in staat zijn om een geneesmiddel op de juiste manier te gebruiken zijn vormen van niet-intentionele therapieontrouwheid. Optimale communicatie tussen patiënt en zorgverlener is een belangrijk hulpmiddel in het voorkomen, signaleren en oplossen van deze ontrouw. Hiervoor is een individuele aanpak nodig, die afhankelijk is van de patiënt, het geneesmiddel, de aandoening en de omstandigheden. Ik vind dat aandacht besteden aan therapietrouwheid moet behoren tot een van de hoofdtaken als apotheker. Het begrijpen van de problemen en de zorgen rond het geneesmiddeleengebruik en deze op te lossen of te ontcrachten zal ervoor zorgen dat de gezondheid van de patiënt verbetert en zal de gezondheidseconomie ten goede komen.

### Nanomedicine – Opportunities for non-invasive Drug Delivery and Combatting Infectious Diseases.

Recently, the importance of anti-infective drugs has increased due to the elevated antimicrobial resistance. Therefore a non-invasive targeted drug delivery is a preferred and very efficient route of administration according to Prof. Claus-Michael Lehr. For the treatment of infections, it is important to cross barriers of the body in a safe and effective manner. This is possible by the use of nanocarriers which require some characteristics such as an optimal lipophilicity. When an intestinal infection is targeted, a newly designed nanocarrier with the surface of Yersinia invasion, loaded with gentamicin, may enter the enterocyte and kill the intracellular bacteria. A model of the cell wall of gram negative bacteria was developed in order to achieve a better prediction of the cellular activity and delivery of new anti-infective agents. For the treatment of inflammatory bowel disease (IBD), there were biodegradable nanoparticles loaded with budesonide developed, which are able to penetrate the skin via hair follicles. Another interesting non-invasive drug delivery method is via inhalation. I think that the non-invasive targeted drug delivery will become more important, because the risk of contamination decrease, it's painless and the side-effects are reduced.

### Designing and evaluating interventions to reduce medication errors: challenges and opportunities.

Medication safety counts at three different levels: avoiding adverse drug interactions, avoiding medication errors and optimising the use by the patient. Currently, prescribed medication is half paper and half computer based in the UK. This leads to a high number of prescribing errors. To avoid this, it's important to examine and understand the possible root-cause. Prof. Bryony Dean Franklin suggests a possible solution: the prescribing improvement model (PIM). It describes that feedback from the pharmacist to the doctor extremely important is, in case there are issues with the initial prescribing doctor. In many cases the name of the prescribing doctor is not mentioned and that of course complicates the feedback. Another solution is to facilitate group learning on prescribing errors. My opinion about this subject is that cooperation between a pharmacist and a doctor and mutual doctors must be encouraged as much as possible, so that for example prescribing errors can be avoided and this to the benefit of the patient's health.

### Samen werken aan onze gezondheidszorg van morgen.

Hoeveel willen we uitgeven aan de gezondheidszorg? Dat is een van de hoofdvragen waarover de overheid zijn hoofd breekt. Het doel is een welvaartsvaste gezondheidszorg te realiseren, rekening houdend met de grote besparingen. België scoort redelijk goed volgens de Euro Health Consumer Index, vooral op het vlak van toegankelijkheid (bv. de wachttijden bij de huisarts). Dit verdoezelt de andere mindere gemiddelden, zoals preventie op alcoholgebruik, nieuwe medicatie op de markt brengen of antibioticagebruik reduceren. Om alle aspecten van de gezondheidszorg nog beter te maken is het van belang om integraal met alle instellingen zo efficiënt mogelijk samen te werken, zodat de hervormingen zo goed mogelijk uitgevoerd worden. Ik ga dan ook akkoord met de visie van Pedro Facon: het is de opdracht van de instelling die belangrijk is, niet de instelling zelf.

