



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021/2022 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Kvantitativ analyse av kortisol og kortison ved LC-HRMS i Atlantisk laks (*Salmo salar*), og sammenlikning av analysedata mellom LC-HRMS og ELISA

Quantitative analysis of cortisol and cortisone by LC-HRMS in Atlantic salmon (*Salmo salar*), and comparison of analysis data between LC-HRMS and ELISA

Iselin Maidili Arumairasa

Kjemi

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Veterinærinstituttet, avdeling for kjemi og toksikologi i samarbeid ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU). Masteroppgaven ble gjennomført hos forskningsgruppen BioDirect på Veterinærinstituttet i perioden august 2021 til og med mai 2022, og utgjør 60 studiepoeng av en 120 stp. mastergrad i kjemi.

Jeg ønsker å gi en stor takk til mine veiledere Silvio Uhlig, Lada Ivanova og Dag Ekeberg. Dere har vært tålmodige veiledere og en verdifull hjelp på laboratoriet og under skriveprosessen. Jeg vil også utrette en stor takk til forskningsgruppen BIO- DIRECT for finansiering, god informasjon om prosjektet og teoretisk grunnlag for oppgaven. Tusen takk til personalet på avdeling for kjemi og toksikologi som var behjelpelige på laboratoriet på Veterinærinstituttet. Tusen takk til medstudent Betty Ploss for fine kaffestunder og oppmuntring under oppgaven. Til slutt vil jeg rette en spesiell takk til min samboer, Øyvind Holmqvist og familien min som ikke bare var en uvurderlig støtte under arbeidet- men for å også minne meg på at det er viktigere ting i livet enn mastergraden.

Norges miljø og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2022

Iselin Maidili Arumairasa

Sammendrag

Oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar*) har lenge vært en stor og viktig næring i norsk økonomi. Oppdrettsindustrien har i lengre tid opplevd problemer med ulike sykdommer som medført høy dødelighet. I den siste tiden har også fokuset på god fiskevelferd og bærekraft økt. I forskningsprosjektet BioDirect forskes det på ulike diagnostiske verktøy som raskt og presist kan påvise sykdom ut fra forskjellige biomarkører som utskilles av individet ved negative ytre påvirkninger. Det forskes også på etablering av bioassays som i fremtiden kan erstatte forsøk på dyr. Ved bruk av biomarkører er det mulig å innhente informasjon om sykdommer og fiskens helsetilstand fra ulike matrikser, eksempelvis blod, slim og avføring. Ut fra dette kan den molekylære sammensetningen i disse matriksene gi informasjon om dyrets helsetilstand. På denne måten kan sykdommer diagnostiseres raskt, samt klargjøre påvirkningen av det ytre miljøet. Denne oppgaven setter fokus på kvantitativ analyse av kortison og kortisol som biomarkører for stress hos Atlantisk laks. Kronisk stress kan påvirke laksen negativt ved suppresjon av laksens immunforsvar, og på denne måten øke mottakeligheten for sykdommer som kan føre til død. Det er viktig å praktisere god fiskevelferd av etiske og kvalitetsmessige grunner.

Kortison og kortisol utskilles i laksen ved stress. Plasma og overflateslim kan være egnede matrikser for å påvise akutt stress, og fiskeskjell kan være en god matriks å påvise kronisk stress. Ut fra dette ble det utviklet en metode for kvantitative analyser av disse matriksene med hensyn på kortison og kortisol. Kortison og kortisol ble ekstrahert fra plasma, overflateslim og fiskeskjell ved væske-væske-ekstraksjon og fast stoff-væske-ekstraksjon med metyl tert-butyleter (MTBE). Analysen ble gjennomført ved mobilfasegradient på 35 % mobilfase B og 65 % mobilfase A. Mobilfasesammensetningen ble bestemt til ultrarent vann og MeOH (metanol) tilsatt maursyre (0,1 %, v/v). Kvantifisering ble gjennomført ut fra adduksjonen $[M+H]^+$. Det ble gjennomført forsøk med derivatisering for å prøve å øke sensitiviteten og dermed oppnå lavere deteksjonsgrense (LOD) for overflateslim. Det ble ikke oppnådd tilstrekkelig økning i signal, og av den grunn frafalt bruk av derivasjonsreagenser.

Ut fra validering av kvantitative analyser av kortison og kortisol i plasma ble god linearitet oppnådd ($R^2 \geq 0,97$). LOD for kortison og kortisol ble bestemt til henholdsvis 2,1 ng/mL og 2,3 ng/mL. Kvantifiseringsgrensen (LOQ) for kortison og kortisol ble bestemt til henholdsvis 7,1 ng/mL og 7,7 ng/mL. Det ble ikke påvist matrikseffekter i plasma. Utvidet måleusikkerhet for metoden ble beregnet til 8,0 % for kortison og 9,0 % for kortisol. For kvantitative analyser av kortison og kortisol i overflateslim ble også god linearitet oppnådd ($R^2 \geq 0,97$). LOD for kortison og kortisol ble bestemt til henholdsvis 2,9 ng/mL og 1,8 ng/mL. LOQ for kortison og kortisol ble bestemt til henholdsvis 9,6 ng/mL og 6,0 ng/mL. Det ble ikke påvist matrikseffekter i overflateslim. Utvidet måleusikkerhet for metoden ble beregnet til 10 % for kortison og 15 % for kortisol. For kvantitative analyser av kortison og kortisol i fiskeskjell ble også god linearitet oppnådd ($R^2 \geq 0,97$). LOD for kortison og kortisol ble bestemt til henholdsvis 0,18 ng/g og 0,11 ng/g. LOQ for kortison og kortisol ble bestemt til henholdsvis 0,62 ng/g og 0,36 ng/g. Det ble påvist matrikseffekter i fiskeskjell ved økning i signal for kortison og hemming av signal for kortisol. Metodens riktighet ble beregnet ved gjenfinning (%) og ble beregnet til 74- 89 % for kortison og 71- 92 % for kortisol.

Det ble oppnådd veldig høy til høy korrelasjon mellom væskrokromatografi med høytoppløsende MS (LC-HRMS) og enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) i matriksene plasma og overflateslim. Det ble oppnådd ubetydelig korrelasjon mellom plasma og overflateslimprøver fra samme individ analysert med ELISA og LC-HRMS.

Abstract

Farming of Atlantic salmon (*Salmo salar*) has been a large and important industry in Norway for a long time. In this time, the fish farming industry has experienced problems with various diseases that have led to high mortality. In recent times, the focus on good fish welfare and sustainability has increased. In the research project BioDirect, research is carried out on various diagnostic tools that can quickly and accurately detect disease based on various biomarkers that are secreted by the individual in the event of negative external influences. Research is also being carried out into the establishment of bioassays, which in the future may replace experiments on animals. By using biomarkers, it is possible to obtain information about diseases and the health of the fish from various matrixes such as blood, mucus and feces. Based on this, the molecular composition of these matrices can provide information about the animal's state of health. In this way, diseases can be diagnosed quickly, as well as clarify the impact of the external environment. This thesis focuses on quantitative analysis of cortisone and cortisol biomarkers for stress for Atlantic salmon. Chronic stress can adversely affect salmon by suppressing the salmon's immune system, and in this way increase susceptibility to diseases that can lead to death. It is also a challenging task to interpret the welfare of the salmon because the salmon does not give a direct expression to well-being and welfare. It is important to practice good fish welfare for ethical and quality reasons.

Cortisone and cortisol are excreted in salmon during stress. Plasma and mucus can be suitable matrixes to detect acute stress, and fish scales can be good a good matrix to detect chronic stress. Based on this, a method for quantitative analyses of these matrixes with respect to cortisone and cortisol was developed. Cortisone and cortisol was extracted from plasma, mucus and fish scales by liquid-liquid-extraction and solid- liquid extraction with methyl tert-butyl ether (MTBE). The analysis was performed by a mobile phase gradient of 35 % mobile phase B and 65 % mobile phase A. The mobile phase composition was determined to ultrapure water and methanol (MeOH) with formic acid (0.1 %). The quantification of analytes was performed from the adduct ion $[M+H]^+$. Experiments with derivatation was carried out to increase the signal and achieve lower limit of detection (LOD) for mucus. A sufficient increase in signal was not achieved, and therefor the use of derivative reagents was discontinued.

Good linearity was achieved with $R^2 \geq 0.97$ based on validation of quantitative analyses of cortisone and cortisol in plasma. The methods LOD was determined to 2.1 ng/mL and 2.3 ng/mL, respectively. The methods limit of quantitation (LOQ) for cortisone and cortisol was determined to 7.1 ng/mL and 7.7 ng/mL, respectively. No matrix effects were detected in plasma. Extended measurement uncertainty for the method was calculated to 8.0 % for cortisone and 9.0 for cortisol. For mucus, good linearity was achieved with $R^2 \geq 0.97$ based on validation of quantitative analyses of cortisone and cortisol in mucus. The methods LOD was determined to 2.9 ng/mL and 1.8 ng/mL for cortisone and cortisol. The methods LOQ was determined to 9.6 ng/mL 6.0 ng/mL, respectively. No matrix effect was detected in mucus. The extended measurement uncertainty for cortisol and cortisone was calculated to be 10 % and 15 %, respectively. For fish scales, good linearity was achieved with $R^2 \geq 0.97$, also based on validation of quantitative analyses of cortisone and cortisol in fish scales. The methods LOD for cortisone and cortisol was determined to 0.18 ng/g and 0.11 ng/g, respectively. The methods LOQ for cortisone and cortisol was determined to be 0.62 ng/g and 0.36 ng/g, respectively. Matrix effects was detected by an enhancement in signal fort cortisone and a reduction in signal for cortisol. The methods accuracy was calculated by recovery (%), and was calculated to 74- 89 % for cortisone and 71- 92 % for cortisol. A very high to high correlation was obtained between liquid chromatography with high-resolution MS (LC-HRMS) and enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA) in the matrixes plasma and surface mucus. Insignificant correlation was obtained between plasma and surface mucus samples from the same individual analyzed by ELISA and LC-HRMS.

Innhold

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Forkortelser	vii
1 Innledning.....	1
1.1 BIO-DIRECTS overordnende mål	3
2 Teori.....	3
2.1 Stress	3
2.2 Stressresponser hos fisk	5
2.2.1 HSC-aksen- Dannelse av adrenalin og noradrenalin	8
2.2.2 HPI-aksen- Dannelse av kortison og kortisol	8
2.3 Kortison og kortisol som biomarkører på stress	10
2.3.1 Kortison og kortisol i ulike matrikser.....	13
2.4 Instrumenter og analyseteknikker	15
2.4.1 Ultra-høy ytelse væskechromatografi (UHPLC).....	15
2.4.2 Massespektrometri (MS).....	17
2.4.3 Elektrospray ionisering (ESI).....	18
2.4.4 Q-Exacte massespektrometer	19
2.4.5 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA)	22
2.4.6 Kvantitative analyser med LC-HRMS (væskechromatografi med høytoppløsende MS).....	23
2.4.7 Korrelasjon mellom ELISA og LC-HRMS.....	24
2.5 Derivatisering av analytt.....	24
2.6 Metodevalidering	28
3 Materialer og metode	32
3.1 Løsninger	32
3.2 Prøveuttak og prøveopparbeidelse for LC-HRMS av plasma, slim og fiskeskjell	34
3.2.1 Plasma	34
3.2.2 Overflateslim	35
3.2.3 Fiskeskjell.....	36
3.3 Analyse med LC-HRMS	37
3.4 Instrumentell metodeutvikling.....	38
3.5 Metodevalidering	39
3.5 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA)	40
4 Resultater og diskusjon	41

4.1 Instrumentell metodeutvikling.....	41
4.2 Metodevalidering	52
4.1.1 Metodevalidering for overflateslim	55
4.1.2 Metodevalidering for fiskeskjell	58
4.1.3 Korrelasjon mellom LC-HRMS og ELISA.....	60
4.1.4 Videre arbeid	64
5 Konklusjon.....	66
6 Litteraturliste.....	67
7 Vedlegg.....	73
Vedlegg 1.....	73
Kjemikalier, standarder, utstyr og analyseinstrumenter.....	73
Vedlegg 2.....	76
Prosedyre for prøveopparbeidelse av kortison og kortisol ved plasmaprøver	76
Vedlegg 3.....	77
Prosedyre for prøveopparbeidelse for gjenvinningsforsøk i plasmaprøver.....	77
Vedlegg 4.....	78
Prosedyre for prøveopparbeidelse for bestemmelse av metodens linearitet, LOD, LOQ og matrikseffekter i plasma.....	78
Vedlegg 5.....	79
Prosedyre for prøveopparbeidelse av kortison og kortisol ved overflateslimprøver	79
Vedlegg 6.....	80
Prosedyre for prøveopparbeidelse for gjenvinningsforsøk i overflateslimprøver	80
Vedlegg 7.....	81
Prosedyre for prøveopparbeidelse for bestemmelse av metodens linearitet, LOD, LOQ og matrikseffekter i overflateslim	81
Vedlegg 8.....	82
Prosedyre for test av derivatiseringsreagensene GRT og 2-HP.....	82
Vedlegg 9.....	83
Prosedyre for prøveopparbeidelse av kortison og kortisol ved fiskeskjellprøver.....	83
Vedlegg 10.....	84
Prosedyre for prøveopparbeidelse for gjenvinningsforsøk i fiskeskjellprøver	84
Vedlegg 11.....	85
Prosedyre for prøveopparbeidelse for bestemmelse av metodens linearitet, LOD, LOQ og matrikseffekter i fiskeskjell.....	85
Vedlegg 12.....	86
Matriksassistert kalibreringskurve i plasma	86
Vedlegg 13.....	87

Derivatisering med GRT med maursyre (0,1 %, v/v) for kortison mono-derivat med eksakt $m/z = 474.2962$	87
Derivasjon med GRT med maursyre (0,1 %, v/v) for kortisol mono-derivat med eksakt $m/z = 476.3119$	93
Vedlegg 14.....	99
Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortison mono-derivat med eksakt $m/z = 452,2549$	99
Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortisol mono-derivat med eksakt $m/z = 454,2706$	104
Vedlegg 15.....	109
Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortison di-derivat med eksakt $m/z = 543,3083$	109
Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortisol-di-derivat med eksakt masse 545,3240.....	110

Forkortelser

2-HP: 2-hydrazinopyridin, C₅H₇N₃

ACTH: Adrenokortikotropisk hormon

AVT: Arginin vasotocin

BSC: Hjerne-sympatisk-kromaffincelle-aksen

CA: Katekolamin

CAS-nummer: Identifiseringsnummer for kjemiske forbindelser

CBG: Kortisol bindende globulin

CRH/CRF: Kortikotropin frigjørende faktor

DA: Dopamin

DBE: Dobbelbindingsekvivalenter

EI: Elektronionisering

ELISA: Fra engelsk «enzyme-linked immunosorbent assay», enzymkoblet immunadsorberende analyse

ESI: Elektrospray-ionisering

EtOAc: Etylacetat

FFA: Frie fettsyrer

GRT: Girards reagens T, C₅H₁₄ClN₃O

HPI: Hypothalamus- hypofyse- interrenal-aksen

HPLC: Høy-presisjonsvæskekromatografi

HPM: 2-hydrazino-1-metylpyridin

HRP: Fra engelsk "enzyme horseradish peroxidase"

IT: Iisotocin

LC: Fra engelsk «Liquid Chromatography», væskekromatografi

LOD: Deteksjonsgrense

LOQ: Kvantifiseringsgrense

MC2R: Melanokortin 2 reseptor

ME (%): Matrikseffekter

MeOH: Metanol, CH₃OH.

MRM: Fra engelsk «Multiple-Reaction Monitoring»

MS: Massespektrometri

MTBE: Metyl tert-butyleter, C₅H₁₂O

NPO: Hypotalamus nucleus preopticus

RF: Referansemateriale

RIA: Radioimmunoassay

RT: Retensjonstid

S/N: Signal/støy forhold

SIM: Fra engelsk «selected ion monitoring»

SLE: Fra engelsk «solid liquid extraction», fast stoff- væske ekstraksjon

SLP: Ringtest, der en prøve med kjent konsentrasjon av analytt sendes rundt til ulike laboratorier før resultatene sammenliknes og vurderes.

SPE: Fra engelsk «solid phase extraction», fast fase ekstraksjon

SPME: Fra engelsk «solid phase microextraction», solid fase mikroekstraksjon

SRM: Sertifisert referansemateriale som er homogent og stabilt, med verdi angitt med usikkerhet og med egenskaper som på en bestemt måte gir sporbarhet. (Akkreditering)

TIC: Fra engelsk “total-ion chromatogram”, total-ione kromatogram

TMB: 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin

TRH: Thyrotropin-frigjørende hormon

UFLC: Fra engelsk «Ultra- Fast Liquid Chromatography», ultra-rask væskeromatografi

UHPLC: Fra engelsk “Ultra High-Performance Liquid Chromatography”, ultrahøy presisjonsvæskerkromatografi

UI: Urotensin I

α -MSH: α - Melanocyt stimulerende hormon

1 Innledning

I Norge er oppdrett av atlantehavslaksen *Salmo salar* en viktig og solid næring som har vært en del av norsk næringsøkonomi siden 1970-tallet. Norge produserer mest laks i hele verden med en produksjonsandel på 55,3 % og produksjonen har vært økende de siste årene. Omgivelsene som Norge disponerer gir et godt grunnlag for slik oppdrett (Einarsdóttir and Nilssen 1996, Iversen, Asche et al. 2020, Veterinærinstituttet 2020).

Om oppdrettsindustrien skal være livskraftig er det viktig at laksen har god evne til å motstå sykdommer som kan oppstå i oppdrettsanleggene og sikre god fiskevelferd. Utfordringer som er utbredt innen velferd og sykdom i norske oppdrettsanlegg er blant annet virussykdommene kardiomyopatisyndrom (CMS), infeksjøs lakseanemi (ILA), pankreasesykdom (PD), hertil kommer lakselus og i det siste også pasteurellose. De siste årene har bakteriesykdommen pasteurellose forekommet hos laks i økende grad. Disse utfordringene innen fiskevelferd har vedvart i en årrekke ifølge Veterinærinstituttets rapport 2020 innen fiskehelse. I 2020 døde 52 millioner oppdrettsfisk før slaktetidspunkt. Dette tilsvarer 14,8 %. Tidligere erfaringer og forskning har indikert at stress over lengre tid kan føre til at fisken blir mer mottagelig for sykdommer, og at vaksiner ikke i alle tilfeller vil ha tilfredsstillende effekt (Einarsdóttir and Nilssen 1996, Veterinærinstituttet 2020).

Stress påvirker alle levende organismer, og fisk er intet unntak. Stress er naturlig i vill fisk og hjelper fisken med å sikre overlevelse, eksempelvis ved flukt fra rovdyr i form av akutt stress. Hos laks i fangenskap kan fisken utsettes for større negative påvirkninger i form av håndtering, innesperring og endringer i miljø over lengre tid som kronisk stress. Dette kan bidra til en negativ påvirkning av fiskens immunforsvar og dermed øke mottakeligheten for sykdommer. Oppdrettsindustrien utfører en intensiv produksjon, og et høyt antall fisker vil kunne bidra med økt smittetrykk. Underliggende sykdom kombinert med håndtering som virker stressende øker fiskens dødelighet. For å kunne praktisere en bærekraftig vekst i havindustrien er reduksjon av stress, og hindre sykdom viktige faktorer for å sikre god fiskevelferd. God fiskevelferd er viktig av både etiske og kvalitetsmessige grunner (Kalamarz-Kubiak 2017, Uren Webster, Rodriguez-Barreto et al. 2018).

Fisk utsettes for høy stress i oppdrettsindustrien grunnet innesperring, håndtering av mennesker, etc. Forbedring av stress- og sykdomsresistens er svært viktig for å sikre en bærekraftig vekst av akvakulturen, som skal gi en god dyrevelferd, redusere påvirkningen på miljøet og være en trygg og pålitelig matkilde for en stadig voksende befolkning. Det er i fremtiden nødvendig å anskaffe mer mat fra havet, men det har blitt påpekt at dagens drift i laksenæringen ikke er forsvarlig med tanke på blant annet fiskevelferden, den høye dødeligheten og klimapåvirkninger laksenæringen medbringer. Forskning har beskrevet flere nye eksperimentelle metoder de siste årene for å beskrive og verifisere stress hos fisk ved hjelp av biomarkører som kortisol og kortison ved hjelp av væskechromatografi koblet med høytoppløsende massespektrometer («Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry») (LC-HRMS). Resultatet av slik forskning har vist at kortisol og kortison er pålitelige indikatorer for å påvise stress hos fisk. Måling av konsentrasjoner av stresshormon som kortisol og kortison er av den grunn utbredt. I en studie med regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble det konkludert med at basale konsentrasjonen av kortisol i plasma relativt lave, <5,0 ng/mL, men hos stresset fisk kan konsentrasjonen øke flere hundre ganger (Pottinger and Moran 1993, Geffroy 2018, Uren Webster, Rodriguez-Barreto et al. 2018, Svendsen 2022).

Kvantitative og kvalitative analyser av kortison og kortisol, samt andre steroider har tradisjonelt blitt utført ved hjelp av ulike former av immunoassay, eksempelvis radioimmunoassay (RIA) og i den senere tid enzymkoblet immunadsorberende analyse («enzyme-linked immunosorbent assay», ELISA).

Ved å benytte LC-HRMS vil økt sensitivitet og spesifisitet oppnås i ulike biologiske matrikser, som eksempelvis i blodplasma, slim og skjell sammenliknet med immunoassay (Nadarajah, Skadberg et al. 2017)

I denne oppgaven var målet å utvikle en metode og videre validere metoden for kvantitativ analyse av stresshormonene kortisol og kortison i blodplasma, fiskeskjell og slim fra oppdrettslaks ved hjelp av LC-HRMS. Videre var målet å sammenlikne resultater fra LC-HRMS med analyser av samme prøvemateriale utført med ELISA for å undersøke hvordan nivået av kortison og kortisol korrelerer mellom disse metodene. Dette er av interesse fordi det er et kontinuerlig mål hos oppdrettsnæringen å redusere uønsket dødelighet. Et mål lakseindustrien har er å redusere økonomiske tap. Det er uetisk og lite økonomisk å drive oppdrett med høy dødelighet. For at oppdrettsindustrien skal kunne nå målsetninger om redusert svinn og øke velferden til laksen er det viktig å utvikle nye metoder for å kunne undersøke og overvåke stress hos laksen, og derved innføre tiltak som kan få ned antall syke og døde fisk (Sæle 2021).

Kunnskap om hva som gjør fisken stresset bidra til å utvikle bedre fiskevelferd i framtiden. Eksempler på slik kunnskap kan genereres er å undersøke hvordan laks bedre kan tilpasses et liv i fangenskap eller å undersøke hvordan laks takler raske miljøendringer forårsaket av mennesker. For å bedre forholdene til fisken er det viktig med indirekte metoder for å fastslå fiskens velferd. Dette innebærer målinger av miljøparametere og overvåke fiskens adferd, vekst, helse og fysiologiske funksjon. For å sikre god fiskevelferd er det også nødvendig å gi fisken et miljø den trives i. Det kan gjøres ved gradvis tilvenning til livet i sjøen ved smoltifisering. Det er også avgjørende å redusere smittefaren fra patogene mikroorganismer, samt utvikling av nye vaksiner for å bedre fiskevelferden. Andre tiltak som merder på land og delvis lukkede anlegg vil bidra til å redusere smitte og behov for behandling. En annen måte å gjøre dette på er ved selektiv avl av laks som er i høyere grad motstandsdyktig mot sykdom og stress. Forskning på selektiv avl av laks som er mer motstandsdyktig mot eksempelvis lakselus er noe som finner sted i dag, og er en aktuell problemstilling i forhold til dagens utfordringer i oppdrettsindustrien (Gharbi, Matthews et al. 2015).

Et stort antall fisk skades og dør under hard behandling mot parasitter og lakselus, og svekkede fisk som lever under dårlige forhold er særlig utsatte for å dø. Det kan ut fra dette med fordel utvikles mildere metoder som er mer skånsomme for fisken. Et langsiktig mål er å utvikle fisk som har god motstandsdyktighet mot patogene mikroorganismer og har bedre trivsel i oppdrettsanleggene. I dag har forekomsten av virussykdommen IPN (Infeksiøs pankreasnekrose) blitt kraftig redusert de siste årene grunnet selektiv avl på fisker som har god toleranse mot denne virussykdommen (Havforskningsinstituttet 2022).

Marine omgivelser er veldig komplekse som kan påvirke fisken. Laks, som andre organismer tåler stress over kort tid- men stress over lengre tid vil ha en negativ påvirkning. Stress over tid vil føre til et nedsatt immunsystem og sykdomsutbrudd kan ramme hardere og oppstå oftere. Det er derfor av stor interesse å finne optimale indikatorer for stress i fisk som er enkle og pålitelige, slik at stressfaktorene kan korrigeres ved behov. Tidligere har stress blitt bestemt i laks ut fra konsentrasjonen av kortisol i blodplasma. Prøvetaking av blodplasma regnes som en invasiv metode. Utviklingen har nå i senere tid blitt forflyttet i retning av å finne nye metoder for å måle kortisol og kortison på som ikke er like inngripende. På denne måten kan det utføres flere målinger fra samme individ over tid (Geffroy 2018).

1.1 BIO-DIRECTS overordnende mål

BIO-DIRECT er et forskningsprosjekt finansiert av Norges forskningsråd (NFR) og strategisk instituttsatsning (SIS), og utføres av Veterinærinstituttet i samarbeid med Norges miljø- og biovitenskapelige Universitet (NMBU) og Universitetet i Oslo (UiO). BIO-DIRECT har som målsetning å utvikle nye og sensitive diagnostiske metoder for å påvise sykdom ved hjelp av biomarkører, i tillegg til å konstruere ulike cellemodeller som i fremtiden kan erstatte dyreforsøk. Biomarkører er «biologiske indikatorer» som frigis i sirkulasjonssystemet i organismen ved sykdom, og som etter hvert utskilles i blant annet blod, slim og avføring. På denne måten kan validerte analyser av ulike biomarkører gi informasjon om dyrenes helsetilstand. Analysene utvikles med hensyn på å måle flere biomarkører på en gang, såkalt «multiplexing». Dette krever kartlegging av biomarkører fra mange dyr, og dette er også en av målene med dette prosjektet. Prosjektet inndeles i fem ulike arbeidspakker der denne oppgaven inkluderes i arbeidspakke 1, som omhandler funn av biomarkører i matrikser som plasma, overflateslim og fiskeskjell i Atlantisk laks (*Salmo salar*).

2 Teori

Atlantisk laks (*Salmo salar*) tilhører laksefamilien og er en vanlig fisk i Norge, både som villaks og som oppdrettslaks. Som villaks lever laksen den første tiden i elver før den vandrer ut i sjøen som smolt, og returnerer tilbake til elvene etter kjønnsmodning for å gyte før den returnerer tilbake til sjøen. I oppdrettsindustrien klekkes eggene i et klekkeri og laksen bringes frem som yngel. Dette kalles settefiskproduksjon og foregår i ferskvann i lukkede anlegg på land. Når yngelen blir store nok gjennomgår den en prosess som kalles smoltifisering, der det oppstår fysiologiske endringer hos smolten som gjør den i stand til å tåle overgangen fra ferskvann til saltvann. Oppdrettsindustrien kan måle ATPase, som er en gruppe enzymer som er viktige i omstillingsprosessen fra ferskvann til sjøvann og benyttes som en indikator på smoltifiseringsprosessen. Etter smoltifisering settes laksen ut i merder der den vokser til slaktestørrelse på 5 kg (Havforskningsinstituttet 2019).

2.1 Stress

Stress regnes for å være en generell fysiologisk respons hos fisk og dyr i truende situasjoner og er en viktig reaksjon for å sikre overlevelse i naturen. Stress fører til at energi er lett tilgjengelig når dette er nødvendig for eksempel ved flukt eller kamp. Stress over kort tid kan derfor være positivt for fisken i slike situasjoner. Ved oppfattelse av en stressfaktor fører det til endring i fiskens vev- og organfunksjon som gjør fisken i stand til å håndtere eller kompensere for stresset. Denne prosessen påvirker fiskens homeostase, som er fiskens indre likevekt. Homeostase i fisk oppstår ved opprettholdelsen av den fysiologiske og dynamiske likevekten til fisken. Funksjonen til stressresponsene er å bringe homeostatiske nivåer hos fisken tilbake til opprinnelige basale nivåer. Dersom fisken utsettes for varig stress kan fisken miste denne funksjonen. Dette fører til negative innvirkninger på fiskens liv og helse, eksempelvis redusert vekst, redusert motstandsdyktighet mot patogene mikroorganismer og reproduksjonssvikt. For å vurdere hvor stor påvirkning stress over tid vil ha på fisken er det nødvendig å vurdere hvor lang tid fisken kan utsettes for stress før fisken påvirkes negativt. Omfanget av selve stressfaktoren er også en viktig faktor å ha med i vurderingen. Stress inndeles derfor i akutt stress og kronisk stress (Iversen and Eliassen 2009, Uren Webster, Rodriguez-Barreto et al. 2018, Jerez-Cepa, Gorissen et al. 2019).

Akutt stress defineres som stress med relativt kort varighet, fra minutter til timer. Den fysiologiske effekten av akutt stress er relativt godt kjent. Akutt stress kan være fordelaktig der immunresponser forbedres ved at immunceller og cytokiner stimuleres raskere til modning, sekresjon og refordeling. Kronisk stress defineres ut fra stress med lengre varighet, fra flere dager, uker eller lengre. Kronisk stress kan bidra til å påvirke immunsystemet på en negativt måte som fører til langsiktige endringer i metabolismen, og redusere frigjøring av immunceller og cytokiner. Ved kronisk stress vil en betydelig mengde kortisol skilles ut i fiskens blod som fører til at leukocyttenes evne til å danne antistoffer mot patogene mikroorganismer reduseres. Studier har konkludert med at forhøyede konsentrasjoner av kortisol over lengre tid fører til økt dødelighet ved infeksjon med patogene mikroorganismer. Dette er negativt for oppdrettsnæringen som relativt ofte konfronteres med flere alvorlige sykdommer knyttet til patogene mikroorganismer som tar livet av laksen (Schreck, Contreras-Sanchez et al. 2001, Schreck and Tort 2016, Uren Webster, Rodriguez-Barreto et al. 2018, Veterinærinstituttet 2020).

Ved kronisk stress vil energi som normalt ville blitt brukt til eksempelvis muskelaktivitet og vekst overføres til funksjoner for å gjenopprette homeostase. Resultatet er ofte redusert vekst fordi fisken prioriterer energi for å takle stresset ved økt mobilitet, respirasjon og regulering av elektrolytter. Kronisk stress kan også påvirke utviklingen av laks fra eggstadiet. Studier gjennomført på brunørret (*Salmo trutta*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) konkluderte med redusert størrelse på egg samt redusert overlevelse av yngel (Schreck, Contreras-Sanchez et al. 2001). Kronisk stress har blitt studert grundig i voksen fisk, men hvordan stress påvirker fisken under fiskens tidlige utvikling og senere i livet er fortsatt mindre utforsket. En utfordring oppdrettsindustrien har i dag er å skille mellom kronisk og akutt stress, og i tillegg kan stress oppleves forskjellig for hvert individ (Schreck, Contreras-Sanchez et al. 2001, Lankford, Adams et al. 2005, Uren Webster, Rodriguez-Barreto et al. 2018).

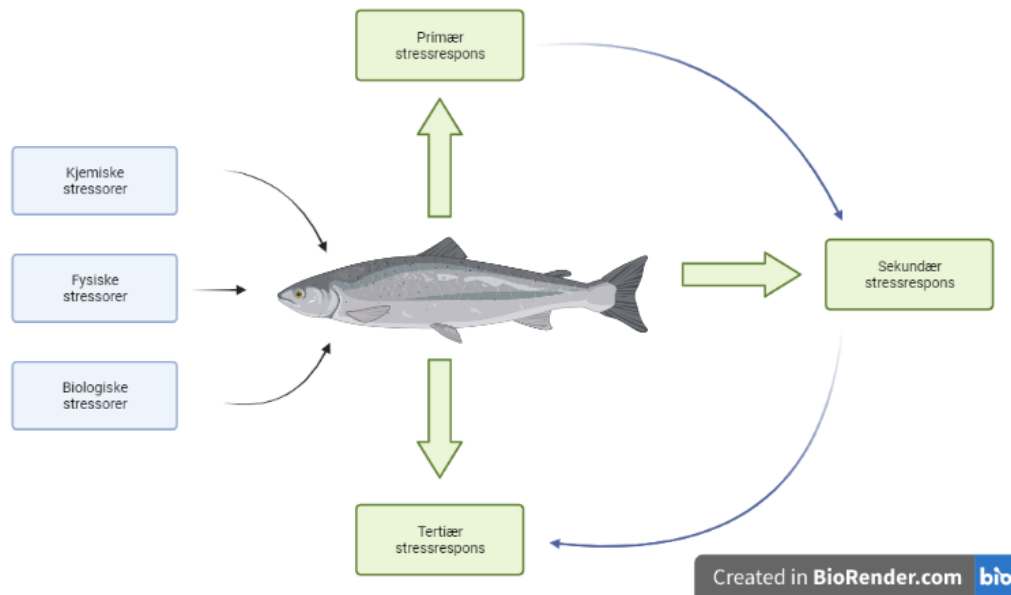
Studier har også bekreftet at kronisk stress fører til hypertrofi og misdannelse av hjertet i form av forstørrede ventrikler, som fører til at hjertet ikke klarer å pumpe nok blod rundt i kroppen. Figur 1 viser hvordan hjertet blir forstørret og deformert. Villaks har et mindre hjerte med en triangulær form, men hos oppdrettslaks er hjertet betydelig større i tillegg til at det er misdannet. I samme studie ble det også bevist at de samme genene som forårsaker hypertrofi i fisk likner mye på de samme genene som forårsaker tilsvarende hjertesykdom hos mennesket (Johansen, Lunde et al. 2011). En utfordring som er aktuell i dag er at fisken ikke utviser tydelige kliniske tegn på at den er stresset. Det kan dermed være fare for alvorlig stress hos fisk ikke oppfattes og det er utfordringer med å fastslå alvorlighetsgraden av en stressfaktor. Antallet stressfaktorer og tiden det tar mellom stressepisodene påvirker stressresponsen hos fisk. Studier har vist at laks har en kumulativ stressrespons basert på gjentatte målinger av kortisol og glukose i blodplasma, der laksen ble håndtert hver tredje time. Studien konkluderte med at oppholdet mellom hver runde med håndtering kun trengte å være noen få timer for å oppnå en kumulativ effekt. Dersom stressnivået ligger på lavt til moderat nivå kan laksen tilvennes stresset over tid. En stressepisode kan dermed resultere i lavere stressrespons. En tilvenning vil kunne føre til at laksen oppnår lavere konsentrasjoner av kortisol, glukose og laktat, samt raskere gjenoppretting av homeostase sammenliknet med laks som ikke hadde gjennomgått tilvenning (Schreck 2000, Lankford, Adams et al. 2005, Johansen, Lunde et al. 2011, Kalamarz-Kubiak 2017).



Figur 1: Ida Beitnes Johansen fra Veterinærhøgskolen viser frem fiskehjerte fra villaks og oppdrettslaks. Hjertet til venstre er tatt fra villaks og hjertet til høyre er tatt fra oppdrettslaks (Sæle 2021).

2.2 Stressresponser hos fisk

Stressrespons i fisk og dyr er adaptivt og ved oppfattelsen av en stressfaktor vil en stressrespons oppstå umiddelbart. Stressfaktorene kan være biologiske, (for eksempel eksterne og interne parasitter, overpopulasjon av individer, rovdyr, patogene mikroorganismer), kjemiske (for eksempel lave konsentrasjoner av oppløst oksygen i vannet, uorganisk og organisk forurensing) eller fysiske (pH, vanntemperatur, andre oppløste gasser i vannet, håndtering og transport av fisk, behandling mot sykdommer, innesperring, lyd og lys). I oppdrettsanlegg kan laksen være eksponert for flere slike stressfaktorer, særlig dersom fisken holdes i et åpent anlegg i sjøen. I åpent anlegg i sjøen er det flere faktorer som kan påvirke disse stressfaktorene sammenliknet med oppdrettsanlegg på land, der flere av disse faktorene kan kontrolleres i større grad. Flere stressfaktorer kan også oppstå som følge av klimaforandringer som innebærer eksempelvis økte temperaturer i sjøen. Dette medfører konsekvenser som kan være alvorlige for fisk som holdes innesperret, for eksempel oppblomstring av alger som kan true laksen. Den fysiologiske responsen til ulike stressfaktorer kan inndeles i primære, sekundære og tertiære stress responser. En oversikt er vist i Figur 2 (Wendelaar Bonga 1997, Site 2013).



Figur 2: Flytskjema over de fysiologiske stressresponsene som er fordelt i primær, sekundær og tertiær stressrespons. Figuren er omtegnet fra (Barton 2002) ved hjelp av BioRender.

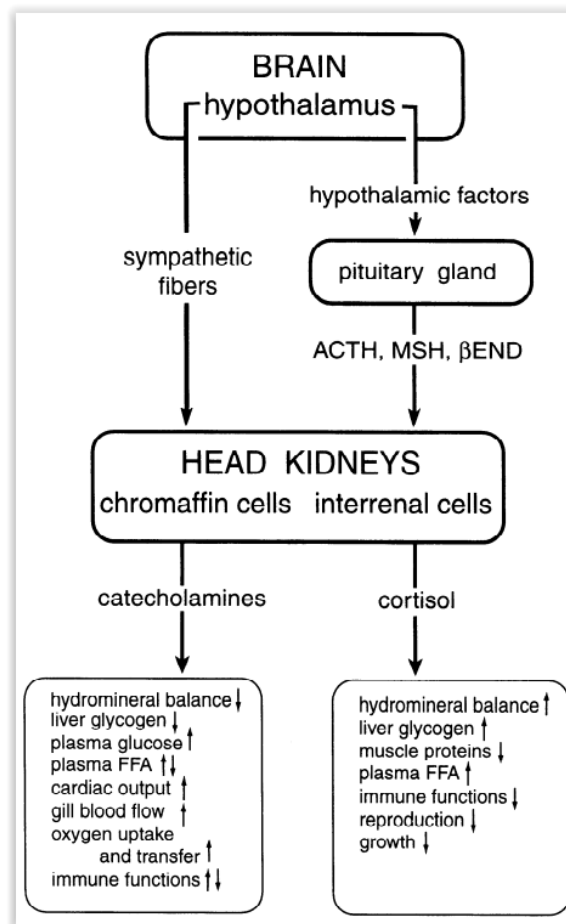
Den primære responsen innebærer biosyntese av primære stresshormoner av typen katekolaminer(KA) og glukokortikoider, deriblant kortison og kortisol. Av den grunn kalles den også den neuroendokrine stressresponsen. KA er hormoner som er relatert til aminosyren tyrosin. Eksempler på dette er adrenalin og noradrenalin. Glukokortikoider er steroider som produseres av interrenale celler som er lokalisert i nyrevevet hos fisken. Eksempler på glukokortikoider er kortison og kortisol. Økt produksjon av disse stresshormonene fører til blant annet økt puls og blodgjennomstrømning til muskler og gjør fisken klar til å kjempe eller flykte (Barton 2002, Kalamarz-Kubiak 2017).

Den sekundære stressresponsen kan oppstå umiddelbart eller utløses som følge av primære stressresponser. Den sekundære stressresponsen medfører ulike fysiologiske og biokjemiske forandringer hos fisken. Eksempler på dette er endringer i metabolske, kardiovaskulære, cellulære, immunologiske og respiratoriske funksjoner i tillegg til endringer i likevekten av oppløste mineraler. Metabolske forandringer innebærer økning i laktat og glukose og reduksjon av glykogen i vev. Kardiovaskulære forandringer fører til endringer i hematologi, som omfatter forandringer i konsentrasjoner av røde blodceller, leukocytter, og hemoglobin. Cellulære responser omfatter endringer i konsentrasjonen av såkalte varmesjokkproteiner, som er proteiner som produseres ved eksponering for stress. Osmoseregulering er regulering av vann og oppløste ioner som Na^+ og Cl^- , og ved stress kan denne likevekten forstyrres. Reduksjon i immunresponsen er også et vanlig symptom på sekundær stressrespons (Barton and Iwama 1991, Barton 2002, Bernier, Flik et al. 2009, Kalamarz-Kubiak 2017).

Tertiære stressresponser kan oppstå umiddelbart eller utløses som følge av sekundære stressresponser. Tertiære stressresponser omfatter negative endringer i hele fisken som individ. Dette innebærer eksempelvis individets evne til å vokse, svømmekapasitet, motstandsdyktighet mot sykdom, reproduksjon og generell adferd. Generell adferd kan eksempelvis være fiskens evne til å konsumere mat eller utvise aggresjon (Barton and Iwama 1991, Barton 2002, Bernier, Flik et al. 2009, Kalamarz-Kubiak 2017).

Anordningen med stressresponser er forenklet fordi stresspåvirkningen hos fisken er avhengig av varighet og størrelse. Det kan være variasjoner i hvordan fisk responderer på en stressfaktor blant stammer eller ulike bestander innen samme art. En hypotese på dette kan være ulike genetiske forskjeller innen bestandene eller artene av fisk. Variasjonene kan være fiskens miljøhistorie, omgivelser fisken lever i og fiskens fysiologiske tilstand, men et klart svar på dette har ikke vitenskapen i dag. En annen hypotese på dette kan være at de forskjellige artene av fisk har forskjellige typer bæreprøteiner i plasma eller at det finnes en forskjell i affinitet mellom bæreprøteiner og stresshormonet (Wendelaar Bonga 1997, Barton 2002, Kalamarz-Kubiak 2017).

Når en stressrespons oppstår hos fisken medfører dette aktivering av to endokrine akser: Hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI-aksen) og hjerne-sympatisk-kromaffincelle-aksen (HSC-aksen). En akse er kun en konseptuell tilnærming for å kunne beskrive det endokrine systemet når en stressrespons oppstår. De ulike aksene starter biosyntese av forskjellige hormoner, der HPI-aksen forklarer utskillelse av kortisol og kortison, og HSC-aksen forklarer utskillelse av KA. Det er den primære stressresponsen som står bak aktiviseringen av disse aksene. Figur 3 viser et flytskjema over de endokrine aksene, og hva som skjer når en stressrespons oppfattes av fisken. Den skjematisk oversikten er en forenkling av prosessene som er svært komplisert og enda ikke helt forstått (Wendelaar Bonga 1997).



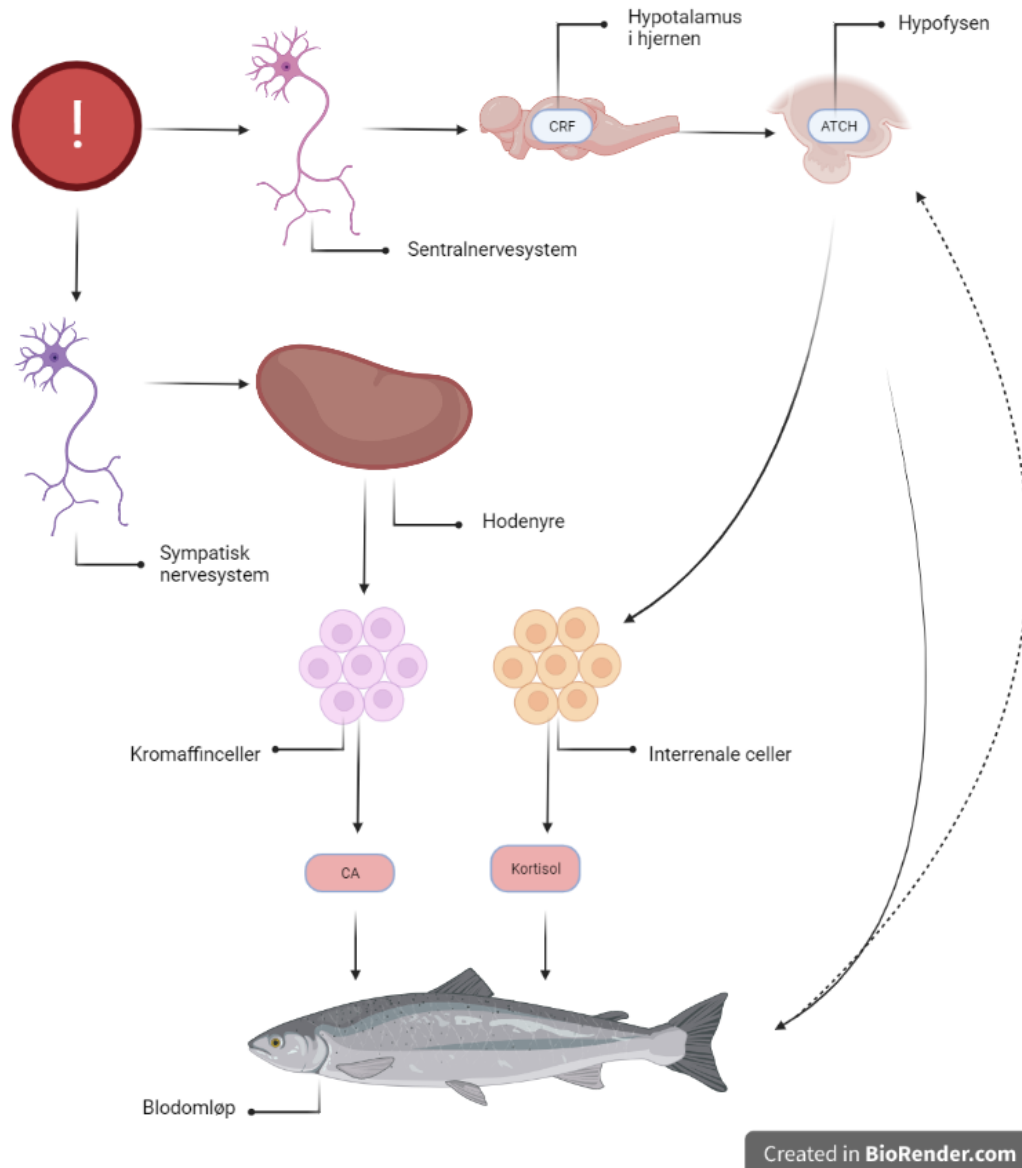
Figur 3: Flytskjema over de endokrine elementene som inngår i en stressrespons. Her går stressresponsen via de sympatiske nervene og via hypothalamus gjennom sentralnervesystemet. Sistnevnte involverer hormonene adrenokortikotropisk hormon (ACTH), melanocytstimulerende hormon (MSH) og β -endorfiner (β END). Piler pekende opp og ned representerer henholdsvis økning og reduksjon av de ulike funksjonene. FFA står for frie fettsyrer. Figuren er gjengitt med tillatelse fra "The American Physiological Society". S. E. Wendelaar Bonga, *The stress response in fish*, Figur 2. Copyright (1997) (Wendelaar Bonga 1997).

2.2.1 HSC-aksen- Dannelse av adrenalin og noradrenalin

Syntese av KA starter med en stressrespons som fører til en reaksjon fra det sympatiske nervesystemet. Her vil sympatiske nerveterminaler stimulere syntesen av KA fra kromaffine celler som er lokalisert i hodenyrene. Syntese og frigjøring av KA kontrolleres hovedsakelig av ulike faktorer fra sympatiske nerveterminaler, hovedsakelig acetylkolin og angiotensin. Figur 4 viser et forenklet flytskjema av produksjonen av KA fra en stressfaktor oppfattes av fisken. Utskillelsen av KA til blodomløpet skjer øyeblikkelig, og konsentrasjonen av KA vil derfor øke og synke raskt. Frigjøringen av KA vil finne sted i løpet av minutter. Det er lokasjonen til de kromaffine cellene som fører til at KA frigjøres hurtig sammenliknet med kortison og kortisol. Av samme grunn er KA en mindre egnet biomarkør å benytte ved stressmålinger av fisk med en halveringstid på 10 minutter i blodet. Det fører til vanskeligheter å måle basale nivåer av KA i blod (Lockridge 1997, Saligaut, Linard et al. 1999, Kalamarz-Kubiak 2017, Conde-Sieira, Chivite et al. 2018).

2.2.2 HPI-aksen- Dannelse av kortison og kortisol

Syntese av kortisol og kortison blir trigget som en respons på stress som fører til en reaksjon fra det sentrale nervesystemet. Sentralnervesystemet vil deretter frigjøre kortikoliberin hormon (CRH), som er et hormon som produseres i hypotalamus. CRH kalles også kortikoliberin faktor (CRF). CRH stimulerer produksjonen av ACTH i celler som kalles kortikotrope celler. Disse cellene er lokalisert i fremre lapp i hypofysen i hjernen. ACTH frigjøres i sirkulasjonssystemet i fisken før den bindes til melanokortin 2 reseptor (MC2R) som er lokalisert på interrenale steroidogene celler. På disse cellene vil det starte en kjede av biokjemiske reaksjoner som til slutt fører til biosyntesen av kortisol. Figur 4 viser et forenklet flytskjema over produksjonen av kortisol som et resultat av at fisken utsettes for stress. Kortisol har lenge vært anerkjent som biomarkører for stress, og er det viktigste kortikosteroidet i benfisk- som biomarkør for stress (Wendelaar Bonga 1997, Alsop and Aluru 2011, Kalamarz-Kubiak 2017).

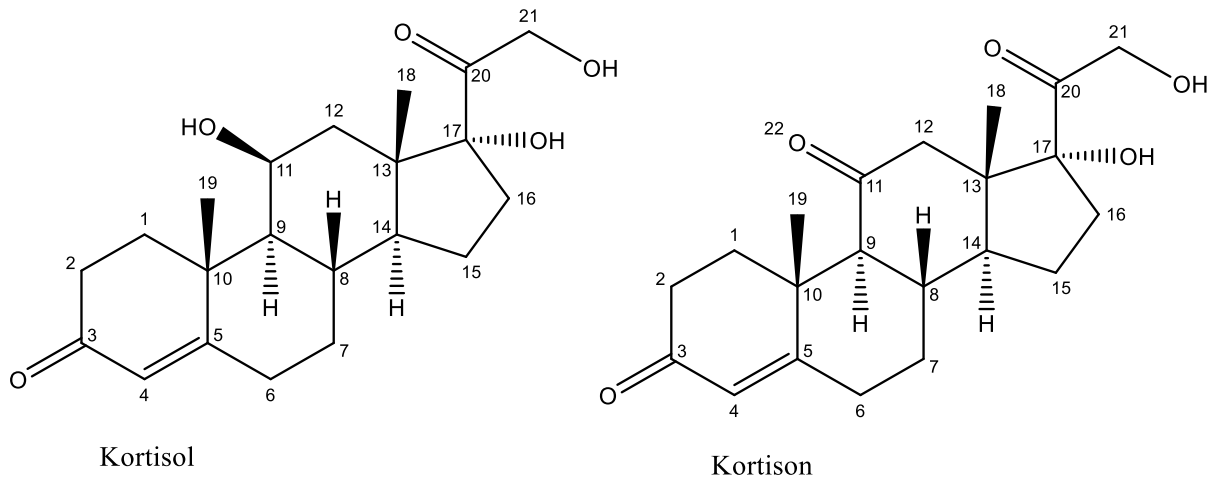


Figur 4: Enkelt flytskjema av syntese av stresshormoner, dannet av BCS-aksen og HPI-aksen. De stiplede pilene viser tilbakekoblingsreaksjoner der sekresjon av ACTH og CRF hemmes ved forhøyede konsentrasjoner av kortisol ved en negativ tilbakekobling. Figuren er omtegnet fra (Kalamarz-Kubiak 2017) ved hjelp av BioRender.

Det er andre sentrale hormoner som også er involvert i den endokrine stressresponsen i fisk som påvirker HPI-aksen, for eksempel tyrotropin-frigjørende hormon (TRH) som dannes i hypothalamus, arginin vasotosin (AVT) som dannes i hypofysen og urotensin I (UI) som produseres i hjernen. Disse hormonene har mulighet til å initiere produksjonen og frigjøre kortisol direkte i de interrenale cellene, eller indirekte ved å øke produksjonen av ACTH og α -MSH. Andre hormoner som tyroksin, atostatin og prolaktin vil også øke under stress, men ingen studier til nå har vist at disse er pålitelige indikatorer på stress (Lockridge 1997, Wendelaar Bonga 1997, Flik, Klaren et al. 2006, Bernier, Flik et al. 2009).

2.3 Kortison og kortisol som biomarkører på stress

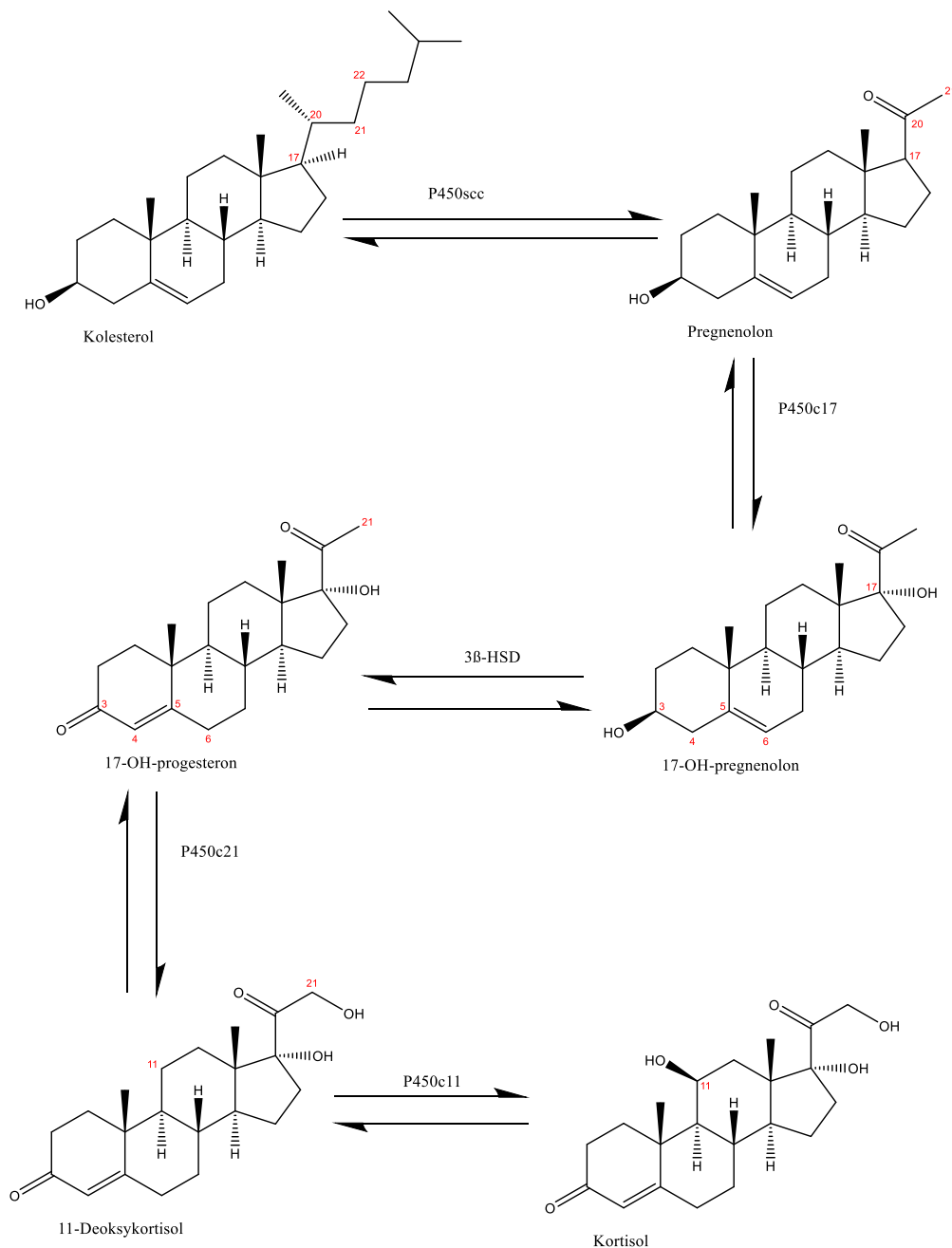
Kortisol og kortison klassifiseres som steroider grunnet det karakteristiske C₂₁ karbonskjelettet som består av fire ringer. Kortisol og kortison er steroider, og alle steroider er lipider. Kortisol og kortison vil derfor være lipofile forbindelser som løses best i upolare løsemidler. Figur 5 viser kjemisk struktur av kortisol og kortison (Dewick 2009).



Figur 5: Kjemisk struktur av kortisol og kortison tegnet i programmet ChemDraw Prime.

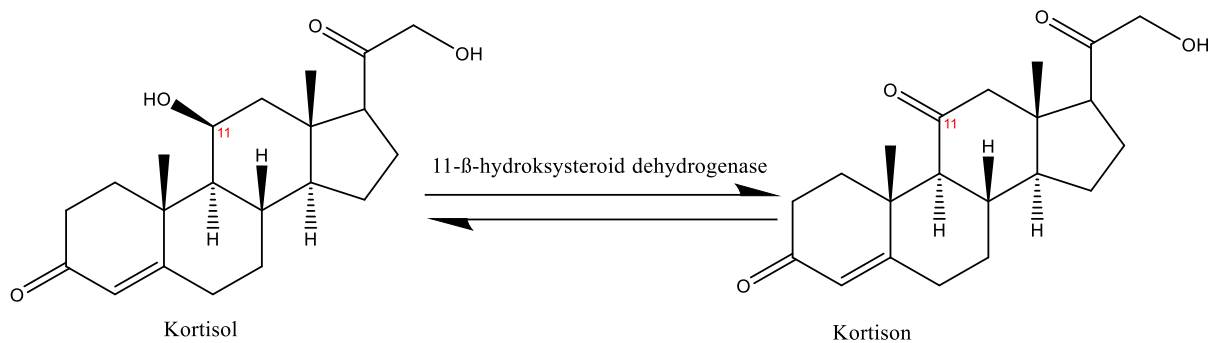
Kortison faller under kategoriene glukokortikoid og mineralokortikoid. Et glukokortikoid er en gruppe steroider relatert til syntese av karbohydrater, og et mineralokortikoid er en gruppe steroider som relateres til regulering av vann og elektrolytt-balansen i fisken. Kortison er en metabolitt avledet av kortisol, men denne forbindelsen har en ikke-aktiv biologisk rolle. Selv om kortisol er det mest anerkjente steroidet knyttet til vurdering av stress hos fisk, viser flere nylige studier at stress også øker konsentrasjonen av kortison i blodplasma. Kortison har ikke blitt vektlagt i like stor grad sammenliknet med kortisol i tidligere studier av stressrespons i fisk. En forenklet versjon av steroidogenesen av kortisol er vist i Figur 6. Biosyntesen av kortisol finner sted ut fra kolesterol, og omdanningen katalyseres ved hjelp av enzymgruppen cytochrom P450. Alle enzymene i denne gruppen er oksidative enzymer som består av 500 aminosyrer med en hem-gruppe, som er en syklisk forbindelse som inneholder et jernatom. Navnet P450 kommer av at denne gruppen forbindelser absorberer lys ved 450 nm. Disse enzymene er i hovedsak oksidative forbindelser. Enzymet P450_{sc} vil katalysere hydroksyleringsreaksjonen på C₂₀ og C₂₂-atomet på kolesterol-molekylet, og i denne prosessen avspaltes karbonkjeden på C₂₁-atomet og danner samtidig et keton på C₂₀-atomet som vist i Figur 6. Dette danner steroidet pregnenolon. Pregnenolon vil gjennomgå en hydroksylering på C₂₁-atomet der reaksjonen er katalysert av enzymet P450_{o17}. Navnet indikerer at enzymet hydroksylerer C₁₇-atomet slik at en hydroksylgruppe (OH-gruppe) innføres på dette karbonatomet. Produktet av denne prosessen er 17-OH-pregnenolon. Omdanningen av dette steroidet til 17-OH-progesteron er katalysert av enzymet 3β-hydroksysteroid dehydrogenase (3β-HSD), som flytter dobbeltbindingen fra C₅-C₆ til C₄-C₅ ved reduksjon på C₅-C₆ og reduksjon på karbonyl på C₃ til en alkohol. Denne reaksjonen danner produktet 17-OH-progesteron. 17-OH-progesteron katalyseres deretter av enzymer P450_{c21} ved hydroksylering på C₂₁ som videre danner 11-deoksykortisol. Til slutt vil 11-deoksykortisol katalyseres av enzymet P450_{c11} til kortisol ved hydroksylering på C₁₁. Steroidogenesen av kortisol og kortison er meget kompleks, og kortison og kortisol er biosyntetisk relatert til mange andre steroidhormoner.

Denne figuren er kun en liten del av steroidogenesen til kortisol og alle omdanningsreaksjonene inntreffer alltid som likevekter (Patiño, Redding et al. 1987, Mommsen, Vijayan et al. 1999, Dewick 2009).



Figur 6: Forenklet versjon av steroidogenesen av kortisol i fisk. Figuren er tegnet ved hjelp av ChemDraw Prime. Pilene indikerer at de ulike steroidene i steroidogenesen er i en dynamisk likevekt med hverandre (Mommsen, Vijayan et al. 1999).

Kortison syntetiseres i fisk ved 11-β-oksidasjon av C11-atomet på kortisol ved hjelp av enzymet 11-β-hydroxysteroid-dehydrogenase. Reaksjonen mellom de to molekylene er i en dynamisk likevekt. I laks er biosynteseveien fra kortisol til kortison den foretrukne mekanisme sammenliknet med omdanning fra kortisol til kortisol. Detaljer angående omdanningen er enda ikke fullstendig kartlagt hos fisk. Figur 7 viser oksidasjon av kortisol til kortison. (Weisbart and McGowan 1984, Mommsen, Vijayan et al. 1999).



Figur 7: Forenklet skisse av omdanningsvei for dannelse av kortisol til kortison (og omvendt). Skissen er tegnet i programmet ChemDraw Prime (Pradhan, Solomon-Lane et al. 2015).

I blodplasma forekommer kortisol i tre former. Den første formen er i fri form der kortisol ikke er bundet til andre komponenter i blodet. Den andre formen er kortisol bundet til ulike bærepoteiner hvilket utgjør 5 % av den totale konsentrasjonen av kortisol. Den tredje formen er som kortisolmetabolitter. Ved en stressrespons vil konsentrasjonen av den totale mengden kortisol øke, og dette inkluderer også en økning i fritt kortison. Hos virveldyr på land er det bærepoteinet kortisol bindende globulin («corticosteroid-binding globulin», CBG) som er bundet til kortisol. CBG vil ha en høy affinitet til kortisol, men proteinet forekommer kun i lave konsentrasjoner i blodet. Hos fisk er ikke CBG påvist slik som i virveldyr på land. Det er derimot påvist andre typer bærepoteiner som kortison og kortisol bindes til, og dermed reduserer tilgjengeligheten av fritt kortisol i blodplasma. Hvilke proteiner som er involvert er ikke kjent (Anitescu, Benzon et al. 2014, Geffroy 2018).

Transport av kortisol gjennom cellemembranen finner sted ved hjelp av passiv diffusjon. Når kortisol har blitt transportert gjennom celleveggen vil kortisol bindes til spesifikke reseptorer som glukokortikoid reseptorer («glucocorticoid receptor») GR og mineralokortikol reseptorer («mineralocorticoid receptor») MR. Det er også en hypotese at kortisol tas opp av fisken eksogent, og at dette kan bidra til økningen av fritt kortison og kortisol. Kortisol vil etter binding til GR og MR-reseptorer metaboliseres og inaktiveres til kortison som deretter frigjøres gjennom urin og avføring. Kortisol kan også diffundere ut av fiskekroppen over til omgivelsene ved passiv diffusjon. På denne måten kan kortison og kortisol påvises kvantitativt og kvalitativt i andre matrikser som eksempelvis slim og vann. Nærmere studier av biosyntesen av kortisol kan være nyttig på flere områder, blant annet for videre forskning av hvordan miljø og forurensing påvirker fisken i habitatet den lever i. Få studer har blitt utført på dette området, men det er et viktig og aktuelt felt for fiskehelse og velferd, spesielt med hensyn på hormonforstyrrende virkninger som følge av miljøforurensinger. Forskning viser også at det er forskjeller i andelen kortisol som er bundet til bærepoteiner i forhold til kjønn. Hunnfisk har en høyere konsentrasjon av bundet kortisol (45 %) sammenliknet med hannfisk (37 %). Hvorfor hunnfisk har en høyere konsentrasjon av bundet kortisol er enda ikke kjent. Tidligere har glukose og laktat blitt benyttet som en biomarkør for stress men i de senere årene har det blitt forsket på andre biomarkører for stress, eksempelvis aminosyrene kynurenin og tryptofan (Mommsen, Vijayan et al. 1999, Fast, Hosoya et al. 2008, Geffroy 2018, Wish, Bulloch et al. 2022).

.3.1 Kortison og kortisol i ulike matrikser

Ved prøvetaking er det viktige faktorer som må tas til etterretning med tanke på at produksjonen av kortison og kortisol varierer over tid, og hvilke faktorer som påvirker biosyntese og frigjøringen av disse. Dette kan dreie omfatte sesong, kjønn og art av fisk, samt livsfase, sosial status, sykdom og reproduksjonstilstand. Inntak av fôr samt sammensetningen av fôret er også noe som kan påvirke konsentrasjonen av kortisol og kortison. Fisk som gjennomgår sult har et høyere nivå av stresshormoner i kroppen i motsetning til fisk som har god tilgang på fôr. Valg av anestesimiddel kan også være en faktor som kan påvirke målinger av kortison og kortisol spesielt i blod, fordi ulike anestesimiddel kan virke stressende på fisken. Studier har vist at 2-fenoksyetanol er et effektivt anestesimiddel som virker mindre stressende på fisk (Brown 1988). Andre vanlige anestesimiddel for fisk er trikainmesilat, benzokain, og eugenol. Disse anestesimidlene hindrer dannelse og overføring av nerveimpulser i sentralnervesystemet hos fisken. De absorberes primært over gjellene og vil fordeles til alle organer og vevene i fisken (Brown 1988, Johansen, Lunde et al. 2011, Geffroy 2018).

Kvantitative analyser av kortisol og kortison i blodplasma har tidligere blitt rapportert, men nå har ulike metoder for å måle disse stresshormonene i andre matrikser fått økt fokus, fordi prøvetaking fra plasma regnes en invasiv metode. En invasiv metode betegnes som en prøvetakingsmetode som involverer penetrering av hud eller i tilfeller der fisken må bøte med livet for å ta vevsprøver. I den senere tid har fokuset blitt flyttet fra invasive metoder over til ikke-invasive metoder som er mer i tråd med dyrevelferd ved å ikke stresse fisken mer enn nødvendig. Forskjellige matrikser kan gi forskjellig informasjon i form akutt eller kronisk stress. En utbredt metode for å kvantifisere kortisol er diverse typer immunoassay, som hovedsakelig baseres på spesifikke interaksjoner mellom et antistoff og det korresponderende antigen til antistoffet. Dette fungerer ved at antistoffet vil gjenkjenne antigenet ved hjelp av et spesifikt sete på antigenet som kalles epitop. Flere antistoffer kan kobles sammen med flere antigener som har en egen epitop. Denne bindingen varierer i affinitet og spesifitet. Dette gjelder også for analyser av kortisol fordi kortisol-antistoffer kan kryss reagere med kortison-antistoffer og andre antistoffer tilstede i prøven. Dette kan føre til feil i analyseresultatene (Weisbart and McGowan 1984, Geffroy 2018).

Prøveopparbeidelse av kortison og kortisol gjennomføres ofte ved hjelp av væske-væske-ekstraksjon eller ved bruk av fast-fase ekstraksjon («solid-phase extraction», SPE) for å overføre analytt fra matriks over i egnet løsemiddel som kan analyseres. I denne oppgaven benyttes væske-væske-ekstraksjon med egnet løsemiddel for plasma og slim. Ved analyse av fiskeskjell må prøven i forkant renses, tørkes og knuses i mindre biter før homogenisering og ekstraksjon. Ved bruk av ELISA kan matrikser som plasma og slim analyseres direkte uten noen form for ekstraksjon i forkant av analysen.

Plasma

Plasma inneholder hovedsakelig vann, elektrolytter og ulike proteiner. De vanligste proteinene er albumin som kontrollerer osmotisk trykk, lipoproteiner som transporterer lipider, ceruloplasmin som fungerer som transportprotein for kobber og fibrinogen som er ansvarlig for koagulering. Plasma har vært matriksen som tidligere har blitt mest benyttet for vurdering av stress i fisk fordi blodet vil sirkulere gjennom hele fisken og alle fiskens organer. Av den grunn kan blodprøver gi en god indikasjon på fiskens helsetilstand. Konsentrasjonen av kortison og kortisol øker ved stressituasjoner, og konsentrasjonen kan fortsette å stige selv etter at fisken er død. Basale nivåer av kortisol i plasma av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) har tidligere blitt målt til 0-6 ng/mL og ved stressituasjoner kan konsentrasjonen øke til rundt 500 ng/mL. Disse resultatene har blitt målt ved hjelp av LC-HRMS, ELISA og RIA, og disse tallene er kun omtrentlige målinger. Konsentrasjonen av kortison og kortisol i plasma vil øke ved akutte stressituasjoner, men vil også synke relativt fort. Dette fører til utfordringer knyttet til vurdering av kronisk stress.

Prøvetaking av overflateslim er sammenliknet med plasma en mindre invasiv matriks å innhente prøver fra (Pickering and Pottinger 1989, Geffroy 2018, Tahir, Shariff et al. 2018).

Slim

Slim utskilles av slimproduserende begerceller lokalisert i epidermis-laget i huden sammen med spesialiserte celler som kalles keratocytter. Slimet består hovedsakelig av glykoproteiner, også kalt muciner i tillegg til andre komponenter som lipider, karbohydrater, proteiner og andre metabolitter. Endring i sammensetningen i slimet kan gi viktig informasjon om fiskens helsetilstand og velferd. Slimet dekker hele fiskens overflate inkludert gjeller og slimet fungerer som et lag med en beskyttende barriere mot friksjon og patogene mikroorganismer. Slimlaget vil også kontrollere osmotisk og ionisk regulering. Stresset eller syk fisk har et høyere antall slimproduserende celler, og produksjonen av slim vil også øke betraktelig samtidig som viskositeten til slimet øker. Ved høy stressrespons kan fisken miste slimlaget og dette gjør fisken ekstra sårbar mot sykdom og skader. Basale nivåer av kortisol i slim har tidligere blitt målt til <0,5 ng/mL og kan øke til 100 ng/mL ved stressituasjoner. Dette er resultater av stressforsøk med gyllenhodet havkarrus (*Sparus auratus*). Disse resultatene har blitt målt ved hjelp av ELISA og tallene er kun omtrentlige målinger. Slim vurderes som en mild til ikke-invasiv prøvetakingsmetode, men det er nødvendig å fange og bedøve fisken for å utføre prøvetakingen. Prøvetakingen foregår ved at slimet skrapes av fiskens side ved eksempelvis hjelp av en celleskraper eller ved absorberende papir. Fordelen ved å benytte slim som matriks er at den antas å korrelere bra med kortisol og kortison-nivåer i plasma selv om konsentrasjonen i slim er lavere sammenliknet med plasma. Under prøvetaking er det viktig å unngå forurensing av tarmvæsker, skjell og blod (Dash, Das et al. 2018, Carbajal, Reyes-López et al. 2019, Ivanova, Rangel-Huerta et al. 2021).

Fiskeskjell

Fiskeskjell er forkalkede strukturer som er lokalisert i epidermis og dermis og fungerer som et ekstra lag med beskyttelse under slimlaget. Fiskeskjell hos laks består av et indre og ytre lag. Det indre laget består av lamellært bein, som kalles isopedin. Isopedin dekkes av en annen beinformasjon som fungerer som det ytre laget, og dette laget forsynes med blod. Det ytre laget er dekket med keratin. Skjellene til Atlantisk laks (*Salmo salar*) er runde sykloide skjell. Kortisol og kortison utskilles og akkumuleres over tid i fiskeskjellene, og kan påvises i flere uker etter at fisken har vært eksponert for stress over lengre tid. Fiskeskjell kan ut fra dette være en lovende matriks for vurdering av kronisk stress hos laks og andre fiskearter. Basale nivåer av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) av kortisol i fiskeskjell har tidligere blitt målt til 0,05-1 ng/mL og kan øke til 3 ng/mg. Disse resultatene har også blitt målt ved hjelp av ELISA og disse tallene er kun omtrentlige målinger. En studie utført på bukstripet bonitt (*Katsuwonus pelamis*) og gulfinnetunfisk (*Thunnus albacares*) viste at kortisol i plasma sank til basale nivåer 3 dager etter en akutt stresspåvirkning. For kortisol i fiskeskjell tok det 27 dager å synke til basale nivåer (Roque d'orbcastel, Bettarel et al. 2021). En hypotese på hvorfor det tar lengre tid for kortisol i fiskeskjell å synke tilbake til opprinnelige nivåer kan være fordi kortisol er innkapslet i de forkalkede strukturene (Kacem, Baglinière et al. 2013, Sherman, Yaraghi et al. 2016, Geffroy 2018, Roque d'orbcastel, Bettarel et al. 2021).

Det er også utført studier på kvantitative analyser av kortison og kortisol i vann, avføring, hele fisk, finner og egg. I denne masteroppgaven er kortisol og kortisonmålinger gjennomført på matriksene plasma, slim og fiskeskjell.

2.4 Instrumenter og analyseteknikker

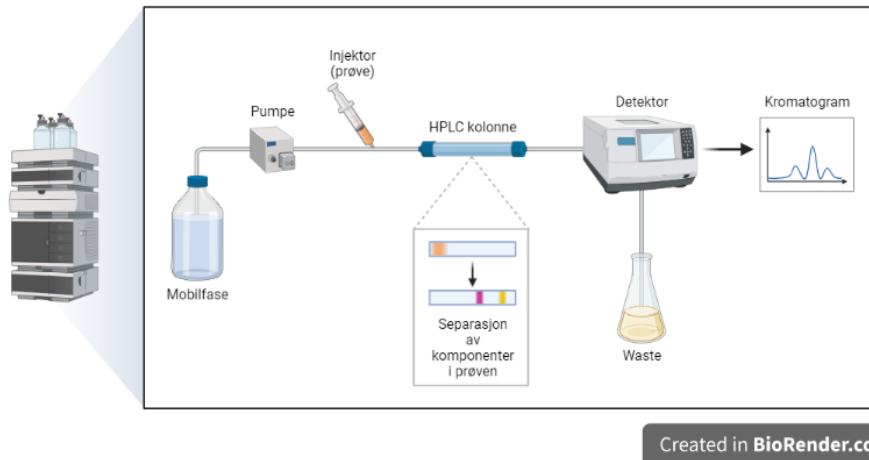
Analytt av interesse kan foreligge i matrikser som kan være komplekse, og må separeres før videre identifisering og kvantifisering. I den anledning kan det være en utfordring å separere analytter som har en høy grad av strukturelle likheter som kortison og kortisol. I slike tilfeller er det viktig med hydrofob selektivitet og høy effektivitet for å forbedre oppløsningen ved topper som kan eluere tett.

2.4.1 Ultra-høy ytelse væskekromatografi (UHPLC)

Ultra-høy ytelse væskekromatografi («Ultra-high performance liquid chromatography», UHPLC) brukes for å separere, isolere og rense komponenter i en prøve. Et UHPLC-instrument fungerer i praksis som et høy ytelsevæskekromatografi-instrument («High-performance liquid chromatography», HPLC), men en vesentlig forskjell er partikkelstørrelsen i kolonnen. Partikkelstørrelsen i UHPLC er typisk $\leq 2 \mu\text{m}$, i motsetning til HPLC der partikkelstørrelsen varierer mellom 3-5 μm . Den indre diameteren til den analytiske kolonnen kan også være forskjellig. Den analytiske kolonnen har typisk en indre diameter på 2 mm, mens et typisk HPLC-instrument har en indre diameter mellom 3,0-4,6 mm. Analysetiden er også kortere med UHPLC, og det foreligger flere muligheter for optimalisering og metodeutviklingsmuligheter. Det forekommer to varianter av væskekromatografi (LC); normal-fase HPLC og omvendt fase HPLC (Miller 2005, Dong and Zhang 2014, Knauer 2021, Shimadzu 2021).

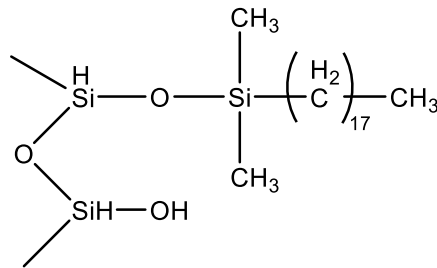
I normal-fase HPLC benyttes en upolar mobilfase og en polar stasjonærfase. Mobilfasen består typisk av organiske løsemidler, eksempelvis etylacetat (EtOAc) eller heksan. Denne formen for HPLC er i dag ikke like utbredt sammenliknet med omvendt fase HPLC. I omvendt fase HPLC benyttes en relativ polar mobilfase og en upolar stasjonærfase. Mobilfasen består gjerne av en vandig løsning av polare og blandbare organiske løsemidler, eksempelvis metanol (MeOH) eller acetonitril. Det er viktig at stasjonærfasen og mobilfasen tilpasses hvilken analytt som er av interesse i prøven. Partiklene i kolonnen er funksjonalisert med hydrokarbonkjeder slik at partiklene blir upolare. Av den grunn vil upolare analytter løst i den polare mobilfasen holdes igjen lengre i kolonnen i motsetning til polare forbindelser. Omvendt fase-HPLC er den mest utbredte fordi den har god reproducerbarhet og bred anvendelighet. For å kunne benytte HPLC er det viktig at analytten er løst i et egnet løsemiddel fordi analyttmolekylene må komme i kontakt med den stasjonære fasen i kolonnen. Etter separasjonen vil analytten fraktes til en detektor ved hjelp av mobilfasen som kan være et massespektrometer (MS). Figur 8 viser et enkelt flytskjema over komponentene og funksjoner som inngår i en HPLC (Miller 2005, Shimadzu 2021).

Høypresisjonsvæskerkromatografi (HPLC)



Figur 8: Enkelt flytskjema av HPLC. Den mobile fasen passerer gjennom systemet ved hjelp av en pumpe før analytt injiseres i den mobile fasen. Videre separeres komponentene i prøven i kolonnen før analytt når frem til en detektor som kan være et MS-instrument. Illustrasjonen er hentet som en mal fra BioRender.

En pumpe vil sørge for at den mobile fasen beveges med konstant strømningshastighet gjennom kolonnen og resten av systemet. Pumpen er viktig for å skape et tilstrekkelig trykk for å tillate prøven å passere hurtig gjennom kolonnen. En avgasser er ofte benyttet for å fjerne luft som er løst i den mobile fasen. En avgasser er en viktig komponent dersom den mobile fasen kan inneholde luftbobler som kan havne i pumpen. Dette kan føre til økt støy i baselinjen, i tillegg til drift og fluktuasjoner i strømningshastigheten. Dette kommer av standard atmosfærisk trykk i omgivelsene UHPLC-maskinen arbeider i. Etter avgassing av den mobile fase pumpes mobilfasen videre til kolonnen. Før kolonnen vil en prøveinjektor overføre prøven med analytt til den mobile fasen. Prøven vil deretter nå kolonnen der de ulike komponentene i prøven separeres. Kolonnematerialet består av granulært materiale av små partikler laget av polymerer eller silika (SiO_2), men silika er det mest vanlige pakkematerialet. Overflaten er dekket av silanol-grupper (Si-O-H) og fordi partiklene i kolonnen er små fører dette til økt overflate og dermed økt interaksjon med analytt. I HPLC kan flere typer kolonner benyttes. I denne masteroppgaven benyttes en C18-kolonne, og i denne kolonnen er partiklene funksjonalisert med C18-kjeder. Figur 9 viser strukturen i en C18-kolonne der karbonatomene i kolonnen er bundet til silika. En C18-kolonne benyttes i denne masteroppgaven fordi analytt av interesse er lipofile, og C18 kolonnen har tette C18-bindinger koblet til silika med høyt overflateareal (Miller 2005, Sadjadi 2018, Develosil 2021).



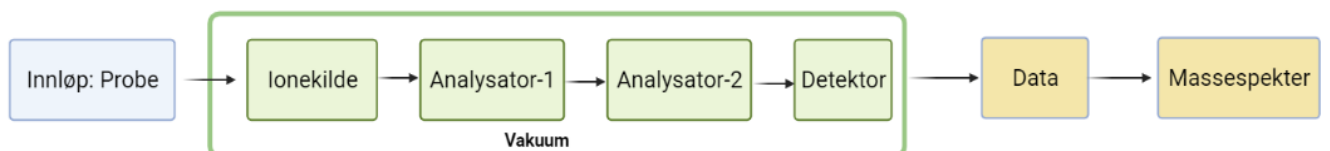
C18-kolonne

Figur 9: Kjemisk struktur for karbonatomer bundet til silika i en C18-kolonne. De kjemiske strukturene er tegnet ved hjelp av ChemDraw Prime (Sadjadi 2018).

C18-kolonnen er dermed relativt hydrofob og er ut fra dette i stand til å separere forbindelser som er mer hydrofobe og upolare. C18-kolonnen er dermed godt egnet for å separere organiske molekyler som kortison og kortisol i organiske matrikser. Kolonnen er også relativt rimelig og bruken er utbredt i tilsvarende analyser. Separasjonen i kolonnen baseres på polaritet der prøven med analytt er løst i den polare mobilfasen. Når prøven med analytt kommer i kontakt med den upolare stasjonærfasen vil de polare molekylerne i prøven passere raskt gjennom kolonnen, fordi de polare molekylerne ikke oppnår en affinitet med den mobile fasen i form av Van der Waals krefter. De upolare analyttmolekylerne i prøven vil derimot danne svake bånd med den stasjonære fasen. Desto sterkere van der Waals krefter som virker mellom den stasjonære fasen og analyttmolekylerne, desto lengre blir retensjonstiden (RT). Av den grunn vil de ulike komponentene i prøven eluere ut av kolonnen i rekkefølge fra mest polar til minst polar. Det er viktig å holde temperaturen så konstant som mulig fordi endringer i temperatur kan påvirke separasjonen av de ulike komponentene i kolonnen. Derfor er kolonnen plassert i en kolonneovn. Komponentene detekteres til slutt ved hjelp av en detektor, eller føres videre inn i et massespektrometer (MS). Ved bruk av en detektor i stedet for en MS vil en datamaskin omgjøre signalet fra detektoren til et tolkbart kromatogram for å være i stand til å kvantifisere og identifisere forbindelsene som var i prøven. Ved bruk av MS vil et kromatogram i tillegg til et massespekter oppnås (Miller 2005, Shimadzu 2021).

2.4.2 Massespektrometri (MS)

Et massespektrometer (MS) er et måleinstrument som benyttes for å bestemme struktur og kvantifisere ulike molekyler. Et massespektrometer vil bestå av et prøveinnløp, en ioniseringskilde, masseanalyzer(er) og en detektor. Figur 10 viser en generell oppbygning av et MS-instrument (Ho, Lam et al. 2003, Edmond de Hoffmann 2007).



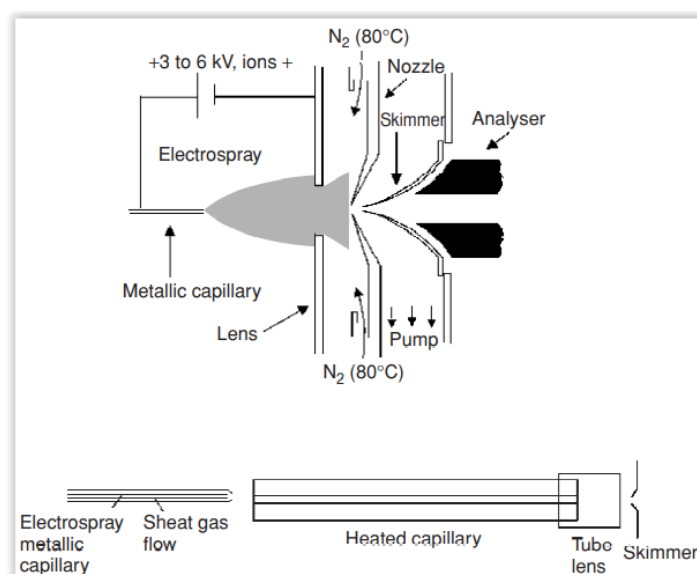
Created in BioRender.com

Figur 10: Oversikt over et generelt MS-instrument avtegnet ved hjelp av BioRender (Edmond de Hoffmann 2007).

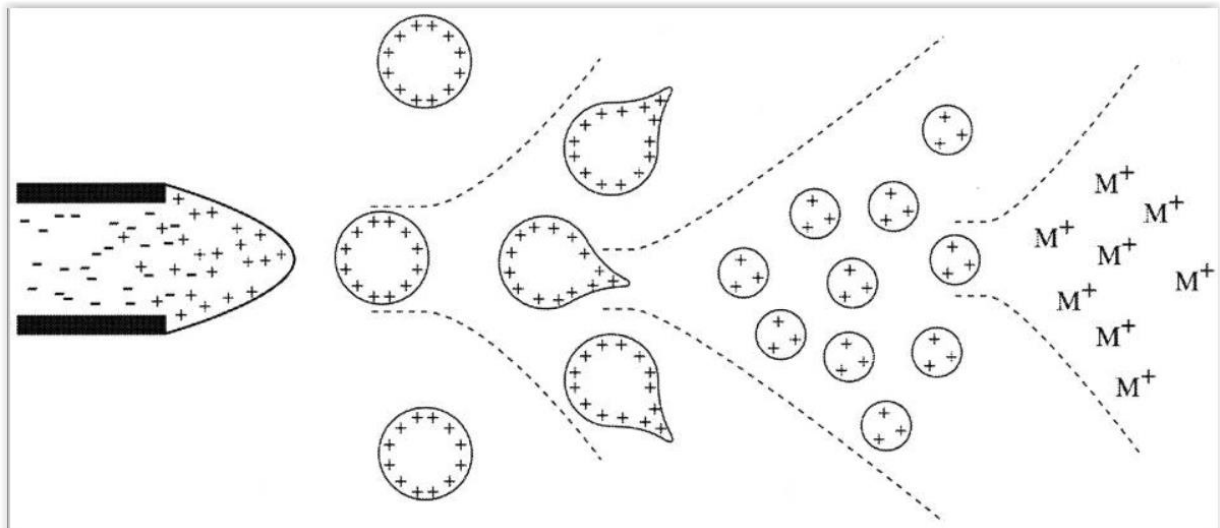
Analytten overføres først til gassfase (Figur 10). I ionekilden kan det produseres positive eller negative ioner. Etter analytten er ionisert føres ionene inn i masseanalysatoren eller-analysatorene. Disse sorterer ionene ut fra ionenes m/z -forhold. Denne prosessen forgår under høyt vakuum, og dette er viktig for at ionene skal kunne nå frem til detektoren uten å kolliderer med andre molekyler. I detektoren måles mengden av ionene ved at den konverterer ionene til elektriske signaler som genereres videre til et massespektrum. I denne oppgaven benyttes elektro spray ionisering (ESI) koblet med et hybridinstrument, som består av en kvadrupol og orbitrap masseanalysator. I oppgaven ble det kun benyttet et slikt instrument, men det finnes et stort utvalg av ioniseringsmetoder, masseanalysatorer og detektorer (Ho, Lam et al. 2003, Edmond de Hoffmann 2007).

2.4.3 Elektro spray ionisering (ESI)

Elektrospray ionisering (ESI) er en fordampende ioniseringsteknikk som betegnes som en myk ioniseringsmetode. Det betyr at ioneringen ikke resulterer i høy grad av fragmentering som eksempelvis skjer med elektronionisering (EI). ESI kan dermed være fordelaktig ved analyse av større biomolekyler med høy vekt, og andre labile, ikke-flyktige forbindelser fordi det er mulig å observere protonerte eller deprotonerte molekyllion. ESI har også evnen til å produsere ioner med flere ladninger, og det kan være en fordel det det forbedrer følsomheten. Denne ioniseringsteknikken er et populært valg sammen med kromatografi fordi den ofte gir høy sensitivitet og er lett å koble på eksempelvis UHPLC. For å benytte ESI må analyttmolekylene løses i eksempelvis vann eller annet egnet flyktig løsemiddel fordi dannelsen av ioner er avhengig av fordamping. Ofte tilsettes også organiske svake syrer eller en buffer for å forenkle ioniseringsprosessen. Løsningen strømmer gjennom et kapillarrør der kapillarrøret plasseres under et elektrisk felt (2,5-6,0 kV) under atmosfærisk trykk. Løsningen vil deretter sprøytes gjennom kapillarrøret ved hjelp av en forstøvergass, eksempelvis N_2 -gass, og vil danne aerosoler som ioniseres av den høye elektriske spenningen. Figur 11 viser en illustrasjon av en ESI. Det vil til slutt føres inn en fordampingsgass, eksempelvis N_2 -gass som holder en høy temperatur og fordamer løsemiddelet som analyttmolekylene er løst i. Dette fører til økt overflatespenning på aerosolene og aerosolene minker i radius samtidig som ladningen overføres til analyttmolekylene. Figur 12 viser mekanismen bak en elektro spray-ioniseringsenhet (Ho, Lam et al. 2003, Robert M. Silverstein 2005, Edmond de Hoffmann 2007).



Figur 11: Illustrasjon av ESI (Edmond de Hoffmann 2007).

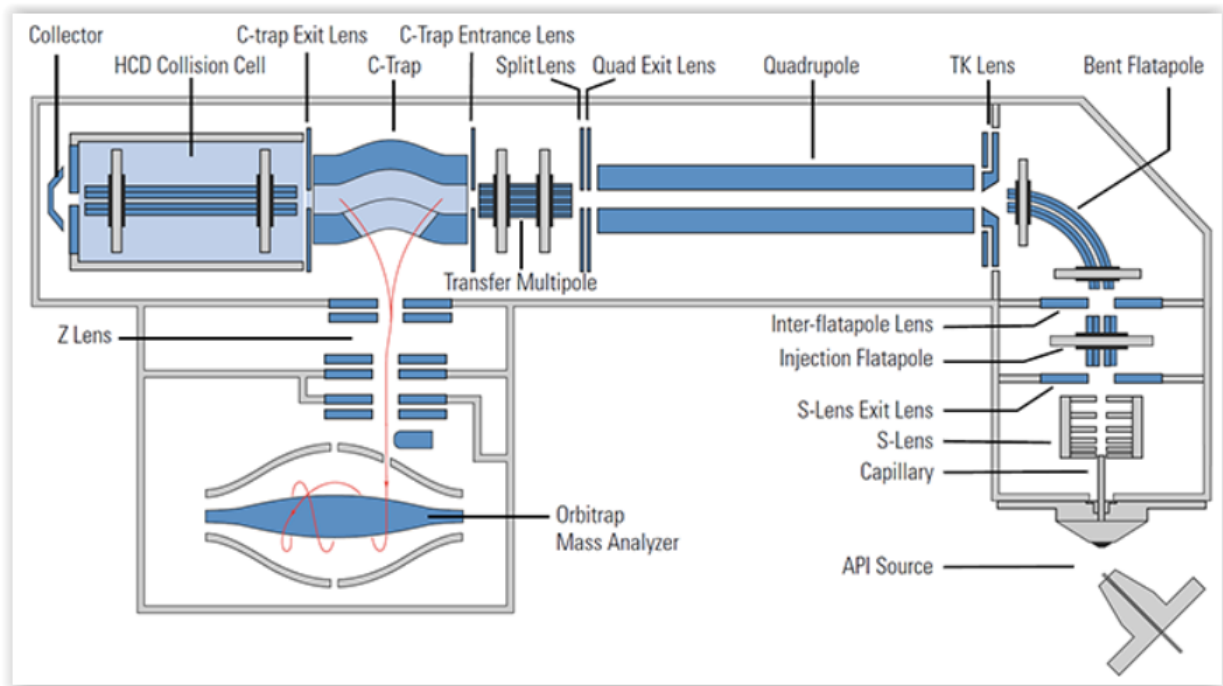


Figur 12: Mekanismen ved elektropray-ionisering. I ionekilden vil en jevn strøm av løsemiddel som inneholder analyttmolekylet av interesse strømme gjennom et kapillarrør. Kapillarrøret består ofte av rustfritt stål eller silika (Ho, Lam et al. 2003).

Til slutt vil den elektriske feltstyrken i den ladede aerosol-dråpen nå et kritisk punkt og eksplodere som danner mindre dråper. Denne prosessen kalles Coulomb fisjon og tilsvarende reaksjon vil skje til det til slutt dannes ioner i gassfase. Ionene vil overføres videre til masseanalysatorenheten ved hjelp av en «skimmer». En «skimmer» er en kjegle med en prøveåpning øverst på kjeglen. Åpningen har en liten diameter for å kunne motta og overføre ioner i gassfase til et vakuumsystem i masseanalysatorenheten. ESI vil vanligvis danne $[M+H]^+$ -ioner i positivt ionmodus eller $[M-H]^-$ i negativt ionmodus ved deprotonering. Det kan også dannes adduksjoner i positivt ionmodus, for eksempel $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, eller $[M+NH_4]^+$. Dannelsen av adduksjoner kan påvises i massespektret men detaljer rundt mekanismen er ikke nøyaktig studert. En hypotese er at karbonyleter-, karboksyl-, eller estergrupper danner bindinger til alkalimetallioner (Ho, Lam et al. 2003, Mortier, Zhang et al. 2004).

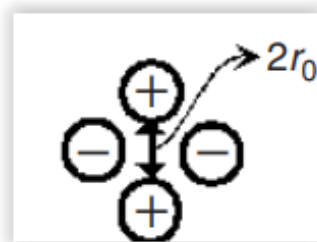
2.4.4 Q-Exacte massespektrometer

Massespektrometeret (MS) som benyttes i denne masteroppgaven er et høytoppløsende hybridinstrument. Det innebærer at instrumentet er i stand til å måle ulike m/z -verdier svært nøyaktig med flere desimaler sammenliknet med et lavtoppløsende instrument. Figur 13 viser en oversikt over et Q-Exacte massespektrometer som ble benyttet i denne masteroppgaven. Instrumentet kombinerer en kvadrupol og en Orbitrap masseanalysator.



Figur 13: Oversikt over Q-Exactive massespektromeret. I denne masteroppgaven vil ionene passere ulike linser som fokuserer ionene før de filtreres ved hjelp av kvadrupolen. Etter dette oppsamles ionene og stabiliseres i C-fellen før ionene sendes inn i Orbitrap for deteksjon (Proteomics 2021).

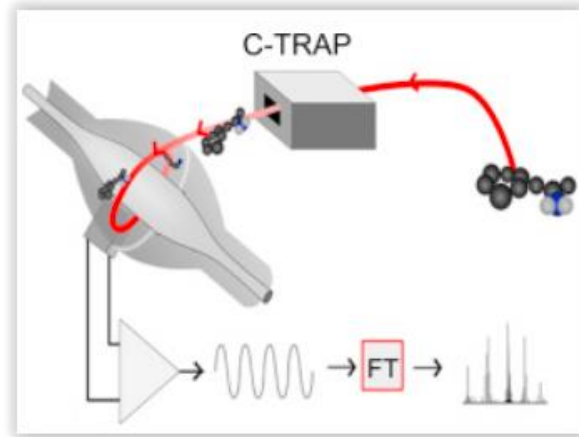
Kvadrupol-delen av instrumentet benyttes som et massefilter bestående av fire stavformede poler. Polene er parallelle og vil ha lik polaritet i forhold til motsatt stav. På disse polene påsettes det spenning med konstant likevekts-potensiale som kombineres med en vekselspenning i RF-frekvensområdet (radiofrekvensområde). Når ionene entrer masseanalysatoren vil ionene oppnå en oscillerende bevegelse gjennom masseanalysatoren. Disse ionene vil fanges opp og fokuseres. Figur 14 illustrerer hvordan stavene er plassert i forhold til hverandre (Glish and Burinsky 2008).



Figur 14: Illustrert oppsett av de fire stavformede polene i en kvadrupol masseanalysator. Her illustreres det hvordan de er plassert med lik polaritet i forhold til motsatt stav (Edmond de Hoffmann 2007).

Både positive og negative ioner vil etter ionisering av analytt entrer kammeret der de stavformede polene er plassert. Fordi polene er ladet vil de kunne påvirke ionene som føres inn. Eksempelvis vil et positivt ion tiltrekkes den negativt ladede polen, mens et negativt ladet ion vil tiltrekkes den positivt ladede polen. Uladede nøytrale ioner filtreres ut, og kun ioner av interesse vil velges ut basert på m/z -verdi. Ioner som har for høy eller lav m/z -verdi i forhold til valgte innstillinger vil kollideres med veggen i masseanalysatoren og tilintetgjøres. På denne måten er det kun ioner med et bestemt m/z -forhold som kan føres uskadet gjennom masseanalysatoren. Det er mulig med en kvadrupol å bestemme fortløpende hvilke ioner som har ønskelig m/z -verdi som skal slippe gjennom ved å endre det elektriske feltet som påsettes de ladede polene (Robert M. Silverstein 2005, Edmond de Hoffmann 2007).

I hybridinstrumentet vil kvadrupol-delen sortere ionene ut fra ionenes m/z -forhold og sende ionene videre til C-fellen der ionene samles i klynger og stabiliseres. Deretter sendes ionene videre til orbitrapen for detektering. Figur 15 viser hvordan dette finner sted før ionene sendes videre til Orbitrap-delen. Orbitrap er en type masseanalysator som baseres på at ioner fanges i et elektrostatisk felt. (Edmond de Hoffmann 2007).



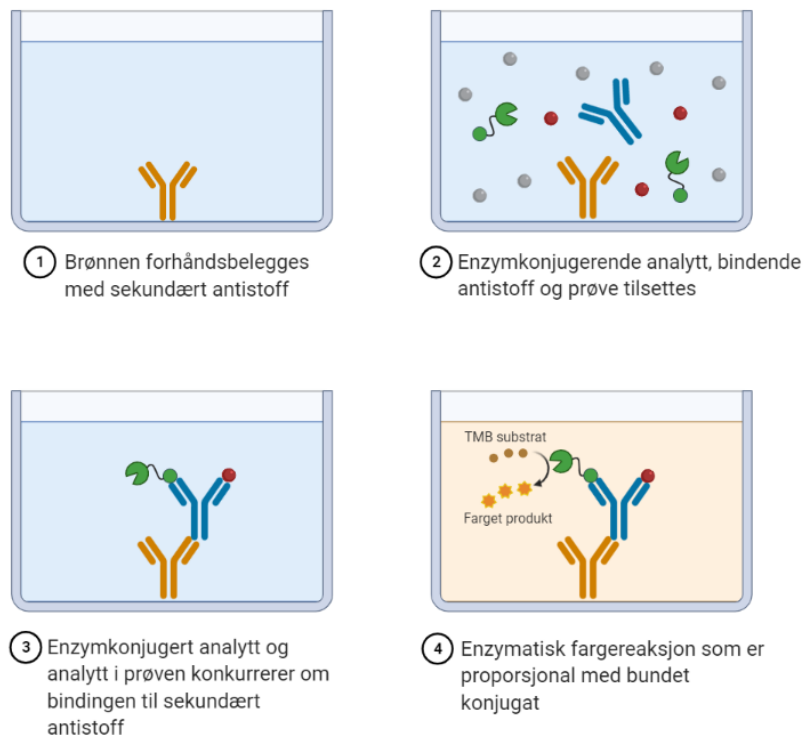
Figur 15: Illustrasjon som viser hvordan ionene fanges i et elektrostatisk felt etter at ionene har blitt oppsamlet og stabilisert i C-fellen (Beck, Rylski et al. 2019).

Orbitrap består av en sylindrisk elektrode som er lokalisert i sentrum av en tønneformet elektrode med koniske ender, illustrert i Figur 15. Den indre elektroden og ionene har motsatt ladning i forhold til hverandre. Ionene vil entre orbitrapen fra C-fellen i klynger og roterer rundt den indre sylindriske elektroden i en aksial orbital bevegelse, samtidig som ionene går frem og tilbake langs den indre elektroden. Dette fører til økt ladning som oppbygges gradvis til et elektrostatisk felt mellom den indre og ytre elektroden. Separasjonen av ionene finner sted ved at de forskjellige ionene sirkulerer rundt den indre elektroden ved forskjellige frekvenser. Når ionene beveges frem og tilbake langs den indre elektroden produserer ionene strøm på den ytre elektroden som kalles «picture image». Signalet fra dette omgjøres til frekvenser ved hjelp av Fourier-transformasjoner. Det er dette som danner MS-spektrene (Kyle 2017, Beck, Rylski et al. 2019).

2.4.5 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA)

Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) er en kjent og etablert metode for å detektere og kvantifisere kortisol, og har erstattet radioimmunoassay (RIA) fordi metoden involverer en vesentlig HMS-risiko og kostnader ved håndtering og oppbevaring av radioisotoper som ikke er stabile over tid. Analyser ved hjelp av ELISA eliminerer disse utfordringene. ELISA fungerer på generell basis ved at det dannes et målbart fargekompleks med et antistoff og et antigen, som i dette tilfellet vil være kortisol. Det finnes i hovedsak fire varianter av ELISA; direkte ELISA, indirekte ELISA, «sandwich»-ELISA og konkurrerende ELISA. For kvalitative analyser av kortisol benyttes konkurrerende ELISA fordi denne varianten av ELISA har vist relativ høy spesifisitet og selektivitet, og krever ikke dyrt instrumentelt utstyr. Reaksjonen finner sted i brønner på ELISA-plater bestående av polystyren eller polyvinyl klorid. Platene er spesiallaget med tanke på at det skal oppstå høy affinitet slik at analytt lettere bindes til veggen og bunnen av brønnen. I de andre variantene av ELISA tilsettes reagensene og prøve i en bestemt rekkefølge, en og en. I konkurrerende ELISA tilsettes prøven et reagens før eller ved tilsetning til brønnene. Dette steget skiller konkurrerende ELISA fra de andre variantene (Weisbart and McGowan 1984, Velasco-Santamaría and Cruz-Casallas 2007, Geffroy 2018).

I metoden som ble benyttet i dette arbeidet var overflaten av brønnene er på forhånd dekket med et antistoff som spesifikt bindes til kortisol. Prøven tilsettes brønnene sammen med en enzymkonjugert utgave av kortisol i tillegg til antistoffer. Her vil kortisol fra prøven konkurrere med enzymkonjugert kortisol. Begge vil prøve å kobles til antistoffene som er festet i bunnen og langs veggen av brønnene, men plassene på antistoffet er begrenset. Etter inkubasjon vaskes ubundet kortisol og enzymkonjugert kortisol ut fra brønnene. 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinsubstrat (TMB) tilsettes brønnene. Her vil enzymet som er koblet til enzymkonjugert kortisol gå fra blank til blå farge. For å stoppe reaksjonen tilsettes en sterk syre. Da endres fargen fra blå til gul. Fargen avleses i en plateleser for å detektere hvor mye av den aktuelle analytten det var i prøven. Dersom konsentrasjonen av kortisol er høyere sammenliknet med enzymkonjugerte kortisol betyr det at mesteparten av kortisol har blitt bundet opp til antistoffet som dekker brønnen. På denne måten konkurrerer kortisol og enzymkonjugerte kortisol om setet på antistoffet. Samme prinsipp gjelder dersom det er det enzym-konjugerte kortisol som er i flertall, og «vinner» kampen om setet på antistoffet. Det er kun komplekset mellom det enzym-konjugerte kortisol og antistoffet som danner farge, og dersom prøven inneholder en høy konsentrasjon av kortisol vil få av enzymkonjugert kortisol klare å kobles på setet og fargeforandringen vil bli svakere. Det omvendte gjelder også ved lav konsentrasjon av kortisol som da vil føre til at mer enzymkonjugert kortisol vil festes på setet på antistoffet og dermed produsere sterk farge. En oversikt over denne prosessen er vist i Figur 16. Her vises brønnen på ELISA-platen som er dekt med antistoff. Neste trinn innebærer å tilsette en blanding bestående av prøve og et konjugert enzym. Det konjugerte enzymet bindes til analytten (Parija 2009, Geffroy 2018, Mandy Alhadj 2021).



Created in BioRender.com bio

Figur 16: Enkel oversikt over prosessen der et fargekompleks dannes mellom antistoff og enzym-analytt komplekset. Figuren er avtegnet av hjemmesiden til Enzo, (Science 2019) ved hjelp av BioRender.

2.4.6 Kvantitative analyser med LC-HRMS (væskekromatografi med høyt oppløsende MS)

Ved kvantitative analyser med LC-HRMS kan eksterne og interne (ISTD) standarder benyttes. Ved bruk av ISTD eksisterer isotopmerkede og analoge varianter. Isotopmerkede standarder har samme molekylformel som analytt bortsett fra at noen atomer er erstattet med andre stabile isotoper, for eksempel deuterium ($D/{}^2H$), ${}^{13}C$, ${}^{14}N$, ${}^{18}O$ osv. På denne måten vil ISTD ha tilnærmet like fysiske og kjemiske egenskaper som analytt. ISTD vil korrigere for forandringer og feil som kan skje under hele analysemetoden. Dette inkluderer også matrikseffekter (% ME). ISTD tilsettes så tidlig som mulig i prøveopparbeidingsprosessen og skal gjennomgå alle stegene prøven normalt skal gjennomgå. ISTD må være inert og ikke reagere med analytt eller andre komponenter i prøven (Edmond de Hoffmann 2007, Duxbury, Owen et al. 2008, Dr. Jens Atzrodt 2017).

2.4.7 Korrelasjon mellom ELISA og LC-HRMS

Korrelasjon mellom to variabler beregnes ut fra Pearsons korrelasjonskoeffisient og formidler grad av lineært samsvar mellom to variabler. Pearsons korrelasjonskoeffisient beregnes etter Formel 1. Beregnet r-verdi vil foreligge mellom $\pm 1,00$ og angir negativ eller positiv korrelasjon. Beregnet korrelasjon nær eller lik $+1,00$ eller $-1,00$ indikerer sterkt lineært forhold mellom variablene, og indikerer veldig høy, til høy korrelasjon. Negativ korrelasjon innebærer økning i en variabel forbundet med reduksjon i en annen variabel. Det betyr at variablene beveges i motsatt retning. Positiv korrelasjon indikerer positiv sammenheng. Det betyr at økning i en variabel er forbundet med økning i en annen variabel, og begge variablene beveges i samme retning. Beregnet 0,00-0,30-verdi angir ingen lineær trend mellom variablene, og dermed ingen korrelasjon (Sørliie , Forthofer, Lee et al. 2007, Mennitti, Brancaccio et al. 2020)

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 * \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Formel 1: Formel for beregning av Pearsons korrelasjonskoeffisient r . x_i er verdi av x -variabelen, \bar{x} er beregnet gjennomsnitt av x -variablene, y_i er verdi av y -variabelen og \bar{y} er beregnet gjennomsnitt av y -variablene (Forthofer, Lee et al. 2007).

Grad av korrelasjon vurderes etter

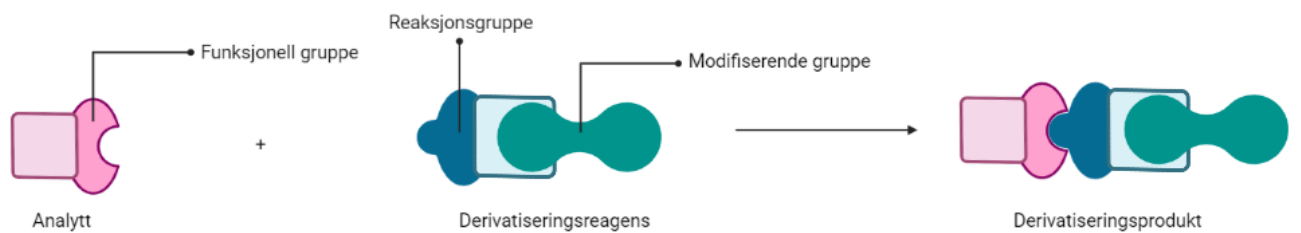
Tabell 1.

Størrelse på beregnet r-verdi	Vurdering
$\pm 0,90$ - $\pm 1,00$	Veldig høy positiv/negativ korrelasjon
$\pm 0,70$ - $\pm 0,90$	Høy positiv/negativ korrelasjon
$\pm 0,50$ - $\pm 0,70$	Moderat positiv/negativ korrelasjon
$\pm 0,30$ - $\pm 0,50$	Lav positiv/negativ korrelasjon
$\pm 0,00$ - $\pm 0,30$	Ubetydelig positiv/negativ korrelasjon

Tabell 1: "Tommelfingerregel" for vurdering av beregnet korrelasjonskoeffisient (r). Tabellen er hentet fra (Mukaka 2012).

2.5 Derivatisering av analytt

I matrikser som eksempelvis overflateslim kan konsentrasjonen av analytt være lav. For å øke signalet på MS-instrumentet er det mulig å gjennomføre derivatisering av analytt der det innføres en funksjonell gruppe på analytter. Ved derivatisering kan sensitivitet økes som kan resultere i lavere deteksjonsgrense (LOD). Derivatisering kan også forbedre separasjon, selektivitet og økt ioniseringseffektivitet. Andre fordeler er at det kan gjøre det enklere å finne struktur eller forenkle separasjon av isomerer. Figur 17 viser en forenklet reaksjon av hvordan derivatisering av analytt finner sted. Her vil de funksjonelle gruppene på analytt reagere med reaksjonsgruppen på derivatiseringsreagenset som også inneholder en modifierende gruppe. Det er den modifierende gruppen på derivatiseringsreagenset som gir nevnte fordeler. Ved derivatisering vil dermed hensikten være å endre strukturen samt fysiske og kjemiske egenskaper av analytt (Qj, Liu et al. 2014).

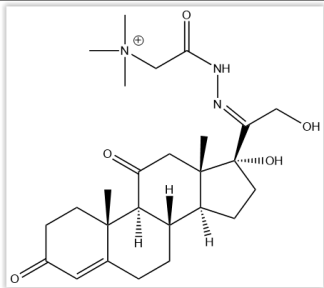
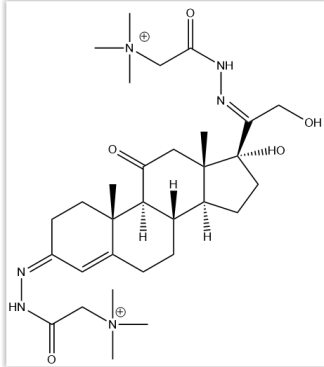
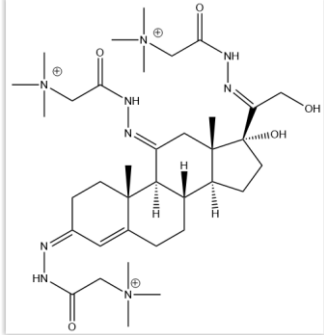
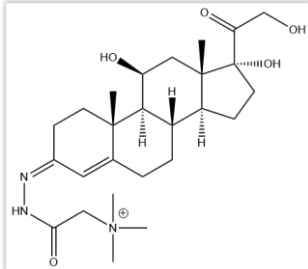
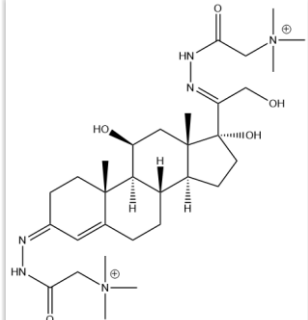


Created in BioRender.com 

Figur 17: Generell reaksjonsmekanisme mellom analytt og derivatiseringsreagens. Her innføres en reaksjonsgruppe fra derivatiseringsreagenset til den funksjonelle gruppen på analytt og danner et derivatiseringsprodukt. Reaksjonsprosessen er tegnet ved hjelp av BioRender (Qi, Liu et al. 2014).

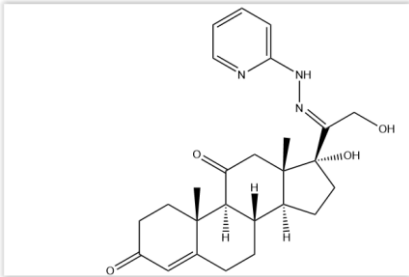
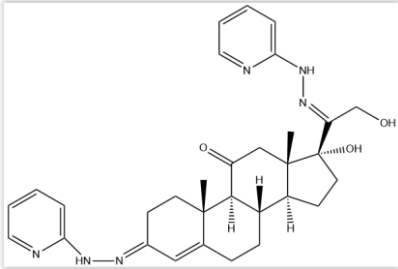
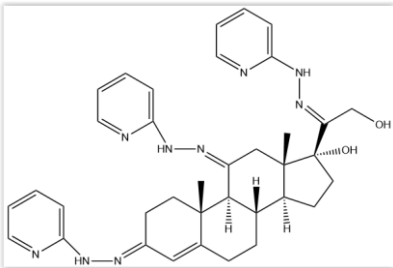
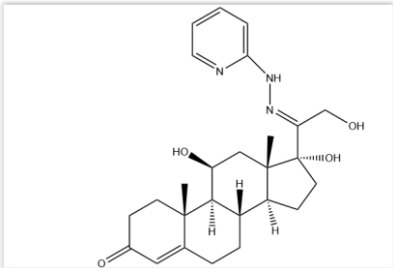
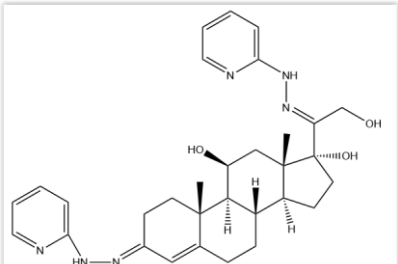
Derivatiseringsreagenset må tilpasses reaksjonsgruppen på analytt, som kan være karboksyl-, karbonyl-, hydroksyl-, amin- eller thiolgrupper. For derivatisering av kortison og kortisol som begge inneholder ketogruener benyttes Girards reagens T (GRT) og 2-hydrazinopyridin (2-HP). GRT er et hydrazid og vil produsere hydrazoner av kortison og kortisol ved innføring av et ladet kvaternært amin på ketogruppen på steroidet ved et nukleofilt angrep på C-atomet på ketonet. Reaksjonen vil spalte av vann og Cl^- som allerede er tilstede i ioneform. Dette vil føre til økning i m/z -verdi av kortison og kortisol. Et kortison- og kortisol-GRT-derivat vil med høy sannsynlighet danne M^+ -ioner, ikke $[\text{M}+\text{H}]^+$ -ioner, fordi derivatet allerede er et ion. Kortison har totalt tre ketogruener og har dermed muligheten for å danne mono, di eller tri-derivater. Kortisol har to ketogruener og danner mono-, og/eller di-derivater. Alle derivatene vil oppnå forskjellig m/z -verdi. Tabell 2 viser en oversikt over derivatene som potensielt kan dannes ved derivatisering av kortison og kortisol med GRT (Whittingham 1995, He 2012, Nadarajah, Skadberg et al. 2017)

Tabell 2: Oversikt over kortisonderivat A, B og C som henholdsvis mono-, di- og tri derivater, og kortisolderivat A og B som henholdsvis mono-, og di-derivater samt m/z-verdi og kjemisk formel av derivatproduktene. Analytt er derivatisert med Girards reagens T (GRT). Molekylstruktur, m/z-verdi og kjemisk formel er tegnet og beregnet med ChemDraw Prime.

Kortisonderivat	Molekylstruktur	Teoretisk m/z-verdi	Kjemisk formel
A		474,2962	$C_{26}H_{40}N_3O_5^+$
B		558,3988	$C_{31}H_{52}N_6O_5^{2+}$
C		702,5014	$C_{36}H_{64}N_9O_5^{3+}$
Kortisolderivat			
A		476,3119	$C_{26}H_{42}N_3O_5^+$
B		590,4145	$C_{31}H_{54}N_6O_5^{2+}$

2-HP er et annet derivatiseringsmiddel som er et hydrasin og produserer hydrasoner av kortison og kortisol. 2-HP har til felles med GRT at det også reagerer med ketogruppene på kortison og kortisol, men det er den funksjonelle gruppen pyridin som innføres og spaltes av vann i prosessen. I denne reaksjonen blir produktet et $[M+1]^+$ -ion fordi derivatiseringsreagenset ikke forekommer i ioneform. Den eksakte massen vil bli $[M+H]$. Tabell 3 viser en oversikt over potensielle derivatiseringsprodukt av kortison og kortisol som kan dannes ved derivatisering med 2-HP.

Tabell 3: Oversikt over kortisonderivat A, B og C som henholdsvis mono-, di- og tri derivater, og kortisolderivat A og B som henholdsvis mono-, og di-derivater samt m/z-verdi og kjemisk formel av derivatproduktene. Analytt er derivatisert med 2-HP. Molekylstruktur, m/z-verdi og kjemisk formel er tegnet og beregnet med ChemDraw Prime.

Kortisonderivat	Molekylstruktur	m/z-verdi	Kjemisk formel
A		451,2471	$C_{26}H_{33}N_3O_4$
B		542,3005	$C_{31}H_{38}N_6O_3$
C		633,3540	$C_{36}H_{43}N_8O_2$
Kortisolderivat			
A		453,2628	$C_{26}H_{35}N_3O_4$
B		544,3162	$C_{31}H_{40}N_6O_3$

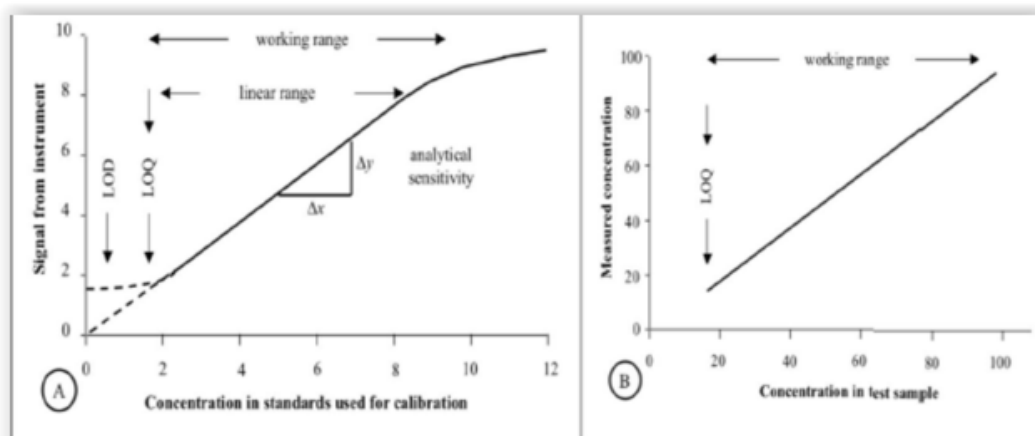
2.6 Metodevalidering

Metodevalidering er en prosess der det bevises at den aktuelle analytiske metoden er egnet for det formålet som er tiltenkt, og analytt som er presentert i prøven kan måles med tilstrekkelig nivå av troverdighet og riktighet. Det er en prosess som resulterer i fastlegging av metodens parametere ut fra eksperimentelle data. Sentrale metodeparametre er selektivitet, linearitet, nøyaktighet, riktighet, presisjon, deteksjonsgrense, kvantitetsgrense og matrikseffekter (NMKL-prosedyre Nr.4; 2009). Selv om metodevalidering er en standardisert prosedyre er det flere faktorer som kan påvirke omfang av en valideringsplan. Under utarbeidelse av valideringsprosedyren er det viktig å ta i betraktning hva som er analytisk mulig og interne forhold i laboratoriet.

Dersom metoden skal være akkreditert må ulike standarder tas i bruk som beskriver valideringen. Standard NS-EN ISO/IEC 17025:2017 formidler «*Valideringen skal være så omfattende som nødvendig for å møte behovene til den aktuelle anvendelsen. Prestasjons egenskaper til validerte metoder, vurdert utfra den tilsiktede bruken, skal være relevante for kundens behov og i samsvar med spesifiserte krav*». Standard 15189 formidler «*Valideringen skal være så omfattende som nødvendig, og skal ved fremlegging av objektivt bevis bekrefte at de spesielle kravene for den tiltenkte bruken av analysen har blitt oppfylt*» (Norge 2017, Geffroy 2018, Akkreditering 2021).

Linearitet

Lineariteten gir informasjon om den lineære sammenhengen mellom signal og konsentrasjon. Lineariteten evalueres etter korrelasjonskoeffisienten (R^2) på en kalibreringskurve med flere relevante konsentrasjonsnivåer. Minst fem punkter bør inkluderes i kalibreringskurven. Figur 18 viser en figur som inkluderer en kurve som gir proporsjonal respons mellom signal og konsentrasjonen til den aktuelle analytten. Arbeidsområde, det lineære område, den analytiske sensitiviteten, LOD og LOQ er også vist i samme figur (Akkreditering 2021)



Figur 18: Et konkret eksempel på en kalibreringskurve som inkluderer arbeidsområde, det lineære området, den analytiske sensitiviteten, LOD og LOQ (Akkreditering 2021).

LOD

Deteksjonsgrensen er bestemt som minimum detekterbar mengde av analytt med et akseptabelt nivå av riktighet og presisjon. Vanligvis bestemmes LOD ved evaluering av signal-til-støy- forholdet i prøven, men denne tilnærmingen er ikke aktuelt ved HRMS der støynivået ikke er målbart. Derfor benyttes en annen tilnærming som baseres på standardavviket (SD) av signalet (y-aksen) og stigningstall for kalibreringskurven. LOD beregnes ut fra Formel 2 (Shrivastava 2011, Akkreditering 2021).

$$LOD = \frac{3 * SD}{Stigningstall, kalibreringskurve}$$

Formel 2: Formel for beregning av LOD (Shrivastava 2011).

LOQ

Kvantifiseringsgrensen er minimum kvantifiserbar mengde av analytt med en akseptabel grad av riktighet og presisjon. LOQ beregnes ut fra Formel 3 der SD er standardavviket av signalet (y-aksen) (Shrivastava 2011, Akkreditering 2021).

$$LOQ = \frac{10 * SD}{Stigningstall, kalibreringskurve}$$

Formel 3: Formel for beregning av LOQ (Shrivastava 2011).

Matrikseffekter

Matrikseffekter oppstår ofte ved analyser av komplekse matriser ved LC-HRMS. Matrikseffekter er forårsaket av ko-eluerende komponenter i matriser som fører til endring i ioniseringseffektiviteten. Dette kan observeres som en økning i respons som ioneforsterkning, eller tap av respons som ionehemming. Både forsterkning og hemming av signalet vil påvirke den analytiske ytelsen til en metode, og det er derfor viktig at matrikseffekter vurderes ved validering av en metode.

Matrikseffekter kan påvirkes av flere ulike faktorer. Noen konkrete eksempler på dette er en kompleks sammensetningen av matriser, ioniseringsteknikk, lav konsentrasjon av analytt, polaritet til analytt, endogene interferenser og ikke- flyktige forbindelser som eksisterer i prøven og mobilfase.

Det eksisterer flere måter å håndtere matrikseffekter, og de vanligste er bruk av isotopmerkede ISTD og matrisassisterte kalibreringskurver. Dersom ME (%) beregnes til > 100 % oppstår forsterkning i signalet, og dersom ME (%) beregnes til < 100 % oppstår det hemming i signalet. Matrikseffekten kan beregnes ved hjelp av

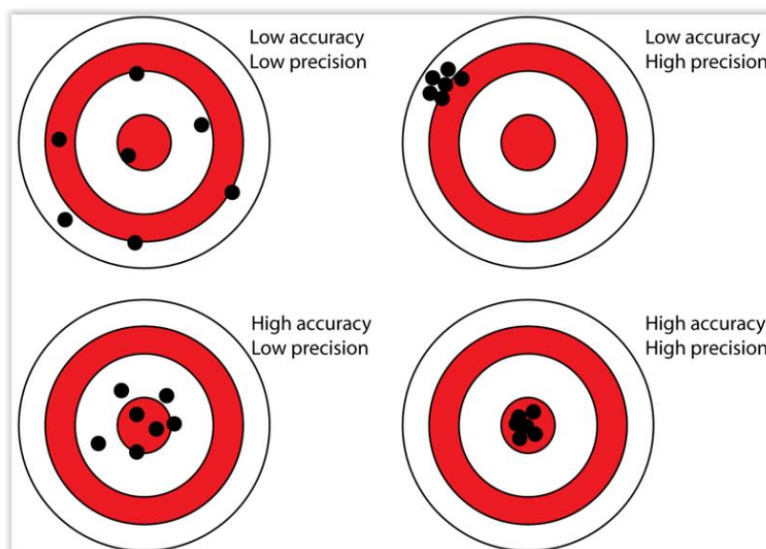
Formel 4 (Zhou, Yang et al. 2017).

$$\% ME = \frac{Stigningstall, kal. kurve løst i matriser}{Stigningstall, kal. kurve løst i MeOH (90 \%)}$$

Formel 4: Formel for beregning av matrikseffekt (Zhou, Yang et al. 2017).

Nøyaktighet

Nøyaktigheten til metoden angir hvor godt måleresultat stemmer med en sann verdi. For å vurdere avvik fra sann verdi er det mulig å bruke et sertifisert referansemateriale eller kontroll-prøver med tilsatt kjent mengde av analytt. Nøyaktighet undersøkes for å forsikre at metoden ikke har systematiske feil. Nøyaktighet til en analyseserien bestemmes av riktighet og presisjon illustrert i Figur 19.



Figur 19: Illustrasjon som viser forskjell mellom nøyaktighet og presisjon. Her representerer sentrum av målskiven den sanne verdi, og de sorte prikkene representerer en måling. Målskiven øverst til venstre viser lav nøyaktighet og lav presisjon fordi alle prikkene har stor spredning og få treff innenfor sentrum av målskiven. Målskiven nederst til venstre viser høy nøyaktighet og lav presisjon fordi prikkene har lav spredning, men få treff innenfor sentrum av målskiven. Målskiven øverst til høyre viser lav nøyaktighet og høy presisjon fordi prikkene er godt samlet men er langt utenfor sentrum av målskiven. Målskiven nederst til høyre viser høy nøyaktighet og høy presisjon fordi alle prikkene er godt samlet innenfor sentrum av målskiven (Ruotsala 2016).

Riktighet

Riktighet er graden av overenstemmelse mellom en prøves sanne innhold av en analytt og resultatet av en analyse. Metodens riktighet kan estimeres med å bruke et sertifisert referansematerialet eller et kontroll materiale som kan lages på laboratoriet ved å tilsette en kjent mengde av analytt til en prøve. I denne masteroppgaven beregnes riktighet ut fra gjenvinning. Gjenvinning beregnes i prosent ut fra Formel 5. Akseptabel verdi for % gjenvinning er 70-120 % (Scientific 2016, (NMKL) 2019, Akkreditering 2021)

$$\% \text{ Gjenvinning} = \frac{\left(\text{Spike resultat, } \frac{ng}{mL} \right) - \left(\text{Ikke - spiket resultat } \frac{ng}{mL} \right)}{\text{Kjent tilsatt spike konsentrasjon, } \frac{ng}{mL}} * 100 \%$$

Formel 5: Formel for beregning av gjenvinning i prosent (Scientific 2016).

Presisjon

Presisjonen til en metode viser spredning mellom uavhengige måleresultater under spesifikke forhold. Observert spredning i resultater kan stamme fra tilfeldig feil. Vanlig angis presisjon som analyseresultatenes standardavvik som gjenspeiler spredning i forhold til gjennomsnittet. Ytterpunktene for presisjon er repeterbarhet (variasjon) og reproduserbarhet (dag til dag variasjonen). For å estimere presisjonen benyttes standardavviket som beregnes ved hjelp av gjentatte dobbeltbestemmelser. Metodens standardavvik for repeterbarheten (s_r) beregnes etter Formel 6. Her er a_i og b_i duplikater av prøve med kjent konsentrasjon og n er antall resultater ((NMKL) 2019).

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (a_i - b_i)^2}{2n}}$$

Formel 6: Formel for beregning av metodens standardavvik for repeterbarhet ((NMKL) 2019).

Metodens standardavvik for reproduserbarhet (s_x) baseres på målinger som gjennomføres ved forskjellige tidspunkt, og det vil være flere personer som utfører analysen. Standardavviket er definert i Formel 7 ((NMKL) 2019).

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Formel 7: Formel for beregning av metodens standardavvik for reproduserbarhet ((NMKL) 2019)

Videre estimeres den totale metodenes presisjon (s_w) ved bruk av Formel 8 ((NMKL) 2019).

$$s_w = \sqrt{s_x^2 + \frac{s_r^2}{2}}$$

Formel 8: Formel for beregning av metodens totale presisjon ((NMKL) 2019).

Utvidet måleusikkerhet (U %)

Alle resultater etter analysen er påvirket av en viss feil der måleusikkerheten formidler størrelsen på målefeilen. Den er derfor en viktig parameter å inkludere ved rapportering av resultater. Den utvidede måleusikkerheten benytter dekningsfaktor $k=2$ som gir et konfidensintervall på 95 %. Det vil si at ved rapportering av et kvantitativt analyseresultat angitt med den utvidede usikkerheten skal 95 % av tilfellene denne den «sanne» verdien. Metodens utvidede usikkerhet er vist i Formel 9. u_c (%) er metodens kombinerte måleusikkerhet ((NMKL) 2019).

$$\% U = 2 * \% u_c$$

Formel 9: Formel for metodens utvidede måleusikkerhet ((NMKL) 2019).

3 Materialer og metode

I dette kapittelet ble prøveopparbeidelsen beskrevet med tilhørende kjemikalier, standarder og utstyr samt utførelsen av ulike parametere som ble inkludert i metodevalideringen. Dette ble gjennomført ved matriksene plasma, slim og sykloide fiskeskjell. Valideringen av sykloide fiskeskjell ble delvis gjennomført. Kjemikalier, standarder, utstyr og analyseinstrumenter benyttet under masteroppgaven er oppgitt i henholdsvis Tabell 37, Tabell 38, Tabell 39 og Tabell 40 i Vedlegg 1.

3.1 Løsninger

Mobilfase A og B ble laget ved å tilsette maursyre (1 mL, 98- 100 %, Merck, Darmstadt, Tyskland) til både vann (999 mL, ultrarent vann, Optima® LC/MS, W6-212, Fisher Scientific, Loughborough, England) og metanol (999 mL, Metanol, Optima® LC/MS grade, Fisher Scientific Loughborough, England). Mobilfase A og B ble oppbevart i medieflasker (1 L) i kjøleskap ved 4 °C.

90 % Metanol (MeOH) (9:1, v/v) ble laget ved å tilsette ultrarent vann (10 mL) til MeOH (90 mL). Løsningen ble oppbevart i medieflaske (100 mL) i avtrekksskap i romtemperatur.

50 % MeOH (1:1, v/v) ble laget ved å tilsette ultrarent vann (50 mL) til MeOH (50 mL). Løsningen ble oppbevart i medieflaske (100 mL) i avtrekksskap i romtemperatur.

Konsentrasjoner av kalibreringsstandarder av kortisol og kortison er presentert i Tabell 4.

Tabell 4: Konsentrasjoner av eksterne standarder (ng/mL) og pipettert volum (µL) av arbeidsløsning av kortison og kortisol (10 µg/mL, standard 500 ng/mL og standard 100 ng/mL).

Fortynnet fra arbeidsløsning	Konsentrasjon, eksterne standarder (ng/mL)	Volum, uttak (µL)
100 ng/mL	1.00	10
	5.00	50
	15.00	150
	35.00	350
500 ng/mL	50.00	100
	70.00	140
	100.00	200
10 µg/mL	250.00	25
	500.00	50

Opgitt volum fra «Volum, uttak (µL)» fra Tabell 4 ble overført ved hjelp av pipette og overført til et prøveglass (2 mL), og inndampet til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper (Thermo Scientific, Waltham, USA, REACTI-THERM I#TS-18822) ved 60 °C. Standardene ble deretter oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 1000 µL) og oppbevart i fryser ved -25 °C.

Arbeidsløsninger av kortison og kortisol, ISTD arbeidsløsninger og derivatiseringsreagenser er presentert i Tabell 5.

Tabell 5: Oversikt over tillagde løsninger som ble benyttet i masteroppgaven. Kortison-2,3,4-¹³C₃-stamløsning og kortisol-D₄-9,11,12,12-D₄-stamløsning ble kjøpt fra henholdsvis Sigma Aldrich og Cerilliant, begge fra Darmstadt, Tyskland. Stamløsninger av kortison (100 µg/mL) og kortisol (1 mg/mL) ble begge kjøpt fra Sigma-Aldrich Darmstadt, Tyskland. Det ble benyttet en N₂-inndamper ved 60 °C for å dampe inn løsningene til tørrhet.

Løsning (µg/mL)	Framgangsmåte	Oppbevaring
Arbeidsløsning (10 µg/mL)	Stamløsning av kortison (500 µL, 100 ug/mL) og kortisol (50 µL, 1 mg/mL) ble overført til en målekolbe (5 mL) og inndampet til tørrhet.	Fryser ved-25 °C
ISTD arbeidsløsning (400 ng/mL)	Kortison-2,3,4- ¹³ C ₃ -stamløsning (20 µL, 100 ug/mL) og kortisol-D ₄ -9,11,12,12-D ₄ -stamløsning (20 µL, 100 ug/mL) ble overført til en målekolbe (5 mL). Dette ble inndampet til tørrhet. ISTD arbeidsløsning (400 ng/mL) ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 5 mL).	Fryser ved-25 °C
Kalibreringsstandarder med ISTD (40 ng/mL)	ISTD arbeidsløsning (20 µL, 400 ng/mL) ble overført til HPLC-rør med «insert» (250 µL), og dampet inn til tørrhet. ISTD- arbeidsløsningen ble deretter oppløst i kalibreringsstandardene (200 µL) gitt i Tabell 4.	Fryser ved-25 °C
Arbeidsløsning (60 ng/mL) med ISTD (240 ng/mL)	Kalibreringsstandard (120 µL, 500 ng/mL) ble overført til et prøveglass (2 mL) og dampet inn til tørrhet. Arbeidsløsningen (60 ng/mL) ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 1000 µL). ISTD arbeidsløsning (200 µL, 240 ng/mL) ble overført til et prøveglass (2 mL) og dampet til tørrhet. ISTD ble deretter oppløst i arbeidsløsning (200 µL, 60 ng/mL).	Fryser ved-25 °C
Arbeidsløsning (150 ng/mL) med ISTD (240 ng/mL)	Kalibreringsstandard (90 µL, 10 µg/mL) ble overført til et prøveglass (2 mL) og dampet inn til tørrhet. Arbeidsløsningen (60 ng/mL) ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 1000 µL). ISTD arbeidsløsning (200 µL, 240 ng/mL) ble overført til et prøveglass (2 mL) og dampet til tørrhet. ISTD ble deretter oppløst i arbeidsløsning (200 µL, 150 ng/mL).	Fryser ved-25 °C
Giards reagens T (GRT) (8 mg/mL)	8 mg GRT ble innveid i et prøveglass (2 mL) og deretter oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 1000 µL) inkludert maursyre (0,1 %, v/v).	Ble kastet etter bruk.
2-Hydrazinopyridin (2-HP) (8 mg/mL)	8 mg 2-HP ble innveid i et prøveglass (2 mL) og deretter oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 1000 µL) inkludert maursyre (0,1 %, v/v).	Ble kastet etter bruk.

3.2 Prøveuttak og prøveopparbeidelse for LC-HRMS av plasma, slim og fiskeskjell

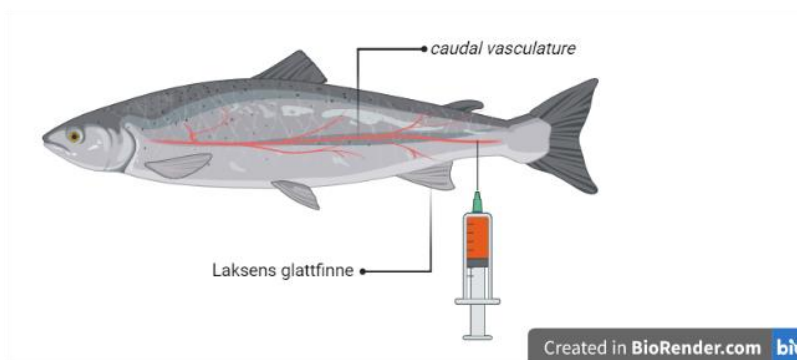
Atlantisk laks (*Salmo salar*) ble benyttet for metodeutvikling og validering av kvantitative analyser for kortisol og kortison i plasma, slim og fiskeskjell (Tabell 6). Laksene som ble benyttet i forsøkene ble fanget enkeltvis ved hjelp av håv fra tanker der fisken holdes. For bestemmelse av korrelasjon mellom LC-HRMS og ELISA ble 18 plasmaprøver fra laks anskaffet fra en av Veterinærinstituttets eksterne kunder, i tillegg til 10 plasmaprøver og 13 overflateslimprøver fra Veterinærinstituttets avdeling i Bergen. Disse laksene var overlevende etter smitte av bakterien *Pasteurella skyensis*.

Tabell 6: Oversikt over hvilket biologisk materiale som ble benyttet i metodeutviklingen og valideringen, hvor laksen ble anskaffet fra, antall laks, vekt (g), alder og benyttet anestesimiddel.

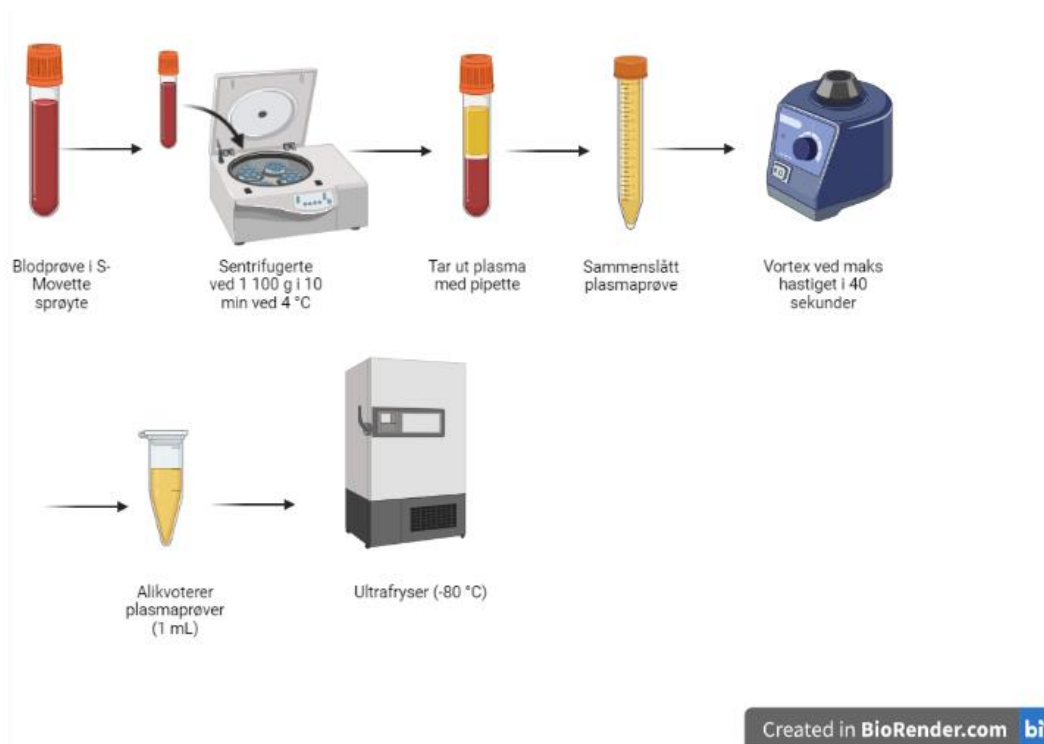
Biologisk materiale	Sted	N	Vekt (g)	Alder	Anestesimiddel: (Finquel; 500 mg/mL)	Kjønn
Plasma, slim	Senter for Bærekraftig Akvakultur ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU)	21	170-290	7 måneder og 17 dager	Ferskvann	ikke kjent
Fiskeskjell	Norsk institutt for vannforskning (NIVA), Solbergstrand i Drøbak	2	Maks 2500	2-2.5 år	Saltvann	ikke kjent

3.2.1 Plasma

Blodprøvene ble innhentet fra hovedpulsåren *caudal vasculature* ved hjelp av en S- Movette sprøyte med oppsamlingsbeholder med heparin (2,7 mL) fra undersiden av fisken (Figur 20). Det ble innhentet 1- 1,5 mL fra hver laks. Blodprøven med heparin ble homogenisert ved å vende på røret i 20 sekunder. Blodprøvene ble oppbevart på is før sentrifugering ved 1 100 g, 4 °C i 10 minutter). Etter sentrifugering ble separert plasma oppsamlet i et sentrifugerør (50 mL) og homogenisert ved hjelp av ristemaskin (Vortex, ristepapparat Mini Vortex mixers, VWR International, Radnor, USA) i 20 sekunder. Plasmaprøvene ble deretter fordelt (1 mL) til Eppendorfrør (1,5 mL) og oppbevart i ultrafryser (NuAire Blizzard-86 Ultra Low Temperature Freezer NuAire, Fernbrook, England) ved -80 °C inntil videre analyse (Figur 21, Vedlegg 2).



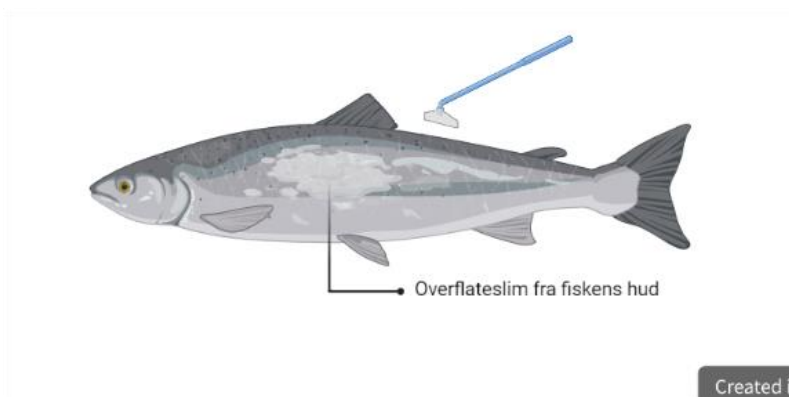
Figur 20: Illustrasjon av uttak av blodprøve fra Atlantisk laks fra hovedpulsåren *caudal vasculature* som er lokalisert like bak fiskens glattfinne. Denne figuren er kun ment som en generell illustrasjon, og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Figuren er tegnet ved hjelp av BioRender.



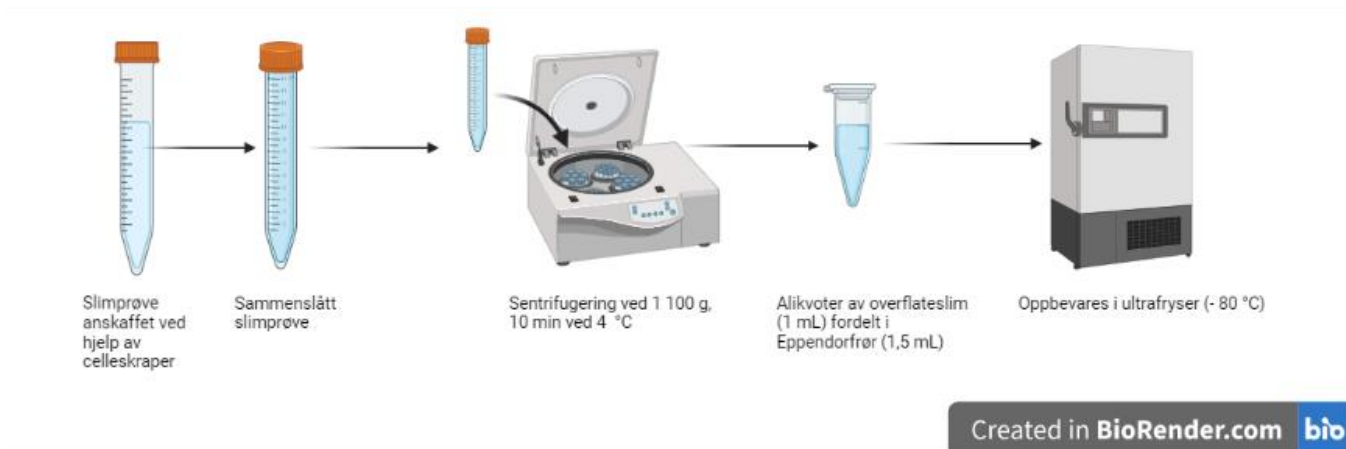
Figur 21: Enkelt flytskjema som viser prosessen ved separasjon av plasma fra en blodprøve. Etter sentrifugering vil plasma være den øverste fasen som pipetteres over i en sammenslått prøve ved hjelp av en pipette. Denne oversikten er kun ment som en generell oversikt, og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Denne oversikten er tegnet ved hjelp av BioRender.

3.2.2 Overflateslim

Overflateslimet ble forsiktig skrapet av laksens laterale side, fra hodet til halefinne ved hjelp av en celleskraper (Figur 22) og deretter overført til Eppendorfrør (1,5 mL). Til sammen ble total 21 laks inkludert i prøvetakingen. Overflateslimprøvene ble oppsamlet i et sentrifugerør (15 mL) som ble oppbevart på is. Etter at prøvene ble homogenisert ved hjelp av ristemaskin i 20 sekunder, sentrifugert ved 1 100 g, 4 °C i 10 minutter, ble overflateslimet fordelt (1 mL) til Eppendorfrør (1,5 mL) og oppbevart i ultrafryser ved – 80 °C inntil videre analyse (Figur 23, Vedlegg 5). Derivatisering av kortison og kortisol i overflateslim er beskrevet i Vedlegg 8.



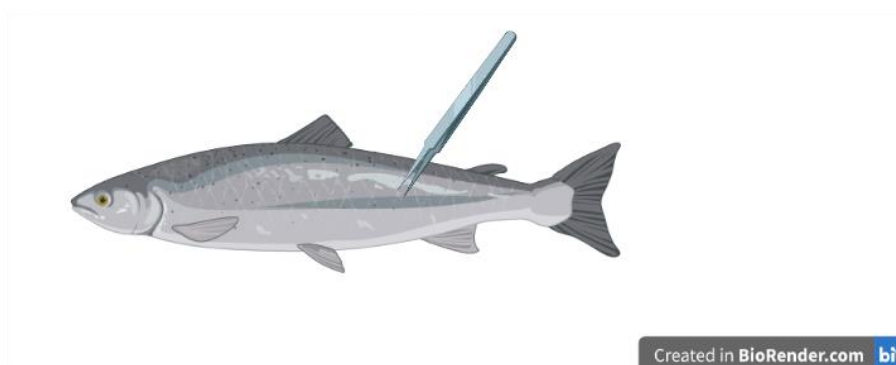
Figur 22: Overflateslimet fra laksens hud ble oppsamlet ved hjelp av en celleskraper fra laksens hode hodet ned til halefinnen. Denne figuren er kun ment som en generell illustrasjon, og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Figuren er tegnet ved hjelp av BioRender.



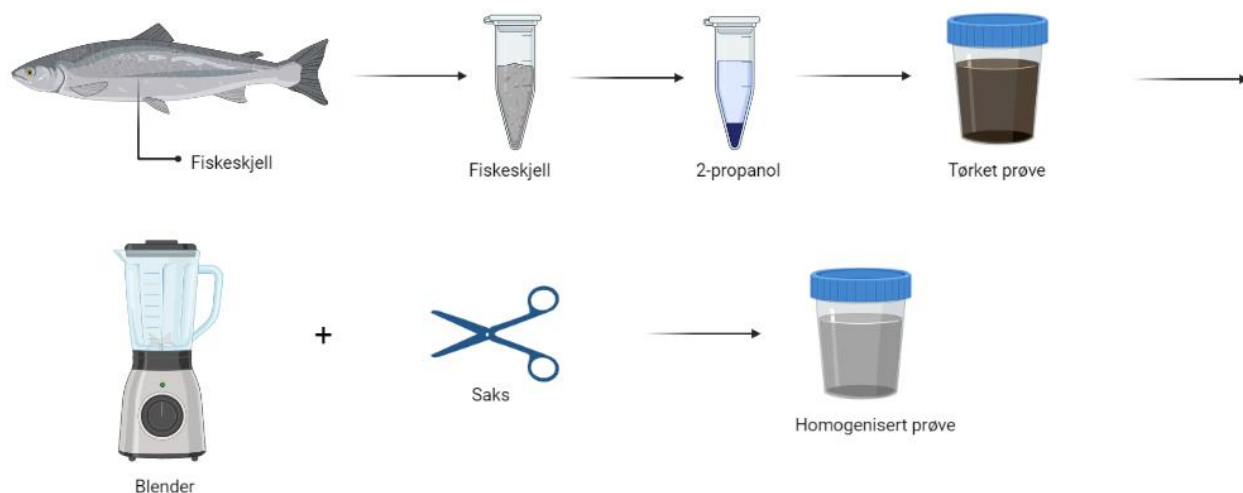
Figur 23: Enkelt flytskjema som viser hvordan slimprøver slås sammen til en prøve etter prøveinnhenting ved hjelp av en celleskraper, før slimprøvene alikvoteres over i Eppendorfrør og oppbevares i fryser. Denne oversikten er kun ment som en generell oversikt og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Denne oversikten er tegnet ved hjelp av BioRender.

3.2.3 Fiskeskjell

Fiskeskjell ble plukket fra hele laksens overflate fra gjeller til halefinne ved hjelp av en pinsett (Figur 24). Fiskeskjellene ble samlet og jevnt fordelt mellom 5 mL til Eppendorfrør (5 mL). Til hvert rør ble det tilsatt 2,5 mL 2-propanol (Fisher Scientific, Loughborough, England) og prøvene ble satt på ristmaskin i 30 sekunder. Etter at renseprosedyren ble gjentatt tre ganger ble fiskeskjellene overført til lofritt papir og tørket i 24 timer ved romtemperatur i avtrekkskap. Etter tørking ble fiskeskjellene klippet i mindre biter og homogenisert ved hjelp av en blender (Figur 25, Vedlegg 9). Fiskeskjellprøvene ble oppbevart i ultrafryser ved -80 °C inntil videre analyse.



Figur 24: Prøvetaking av fiskeskjell fra laksens gjeller ned til halefinnen. Fiskeskjellene ble plukket ved hjelp av en pinsett. Denne figuren er kun ment som en generell illustrasjon, og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Figuren er tegnet ved hjelp av BioRender.



Created in **BioRender.com** **bio**

Figur 25: Enkelt flytskjema som viser rensing av fiskeskjellene ved hjelp av 2-propanol (2,5 mL), og homogenisering ved hjelp av blender og saks etter tørking. Denne oversikten er kun ment som en generell oversikt og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Dette flytskjemaet er tegnet ved hjelp av BioRender.

3.3 Analyse med LC-HRMS

Kvantitative analyser av kortison og kortisol ble gjennomført ved hjelp av Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Masse Spektrometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) med UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, USA) og elektropray ionisering (ESI) i positivt ionemodus. Fullskann (m/z 250-800) ble benyttet for ulike analytter som vist i Tabell 7.

Tabell 7: Oversikt over kjemisk formel for kortison og kortisol med tilhørende ISTD, og beregnet teoretisk m/z - verdi i positivt ionemodus.

Analytt	Kjemisk formel	Teoretisk m/z - verdi
Kortisol	$C_{21}H_{31}O_5$	363.2172
Kortisol-D4	$C_{21}H_{27}D_4O_5$	367.2423
Kortison	$C_{21}H_{29}O_5$	361.2015
Kortison-C13	$^{13}C_3C_{18}H_{29}O_5$	364.2116

Programvaren (Thermo Scientific, Waltham, USA) ble brukt for både dataopptak og prosessering. Tabell 8 beskriver de kromatografiske innstillingene og mobilfasegradient som ble benyttet under masteroppgangen.

Tabell 8: Oversikt over kromatografiske forhold og mobilfasegradient som ble benyttet under masteroppgaven for kvantitative analyser av kortison og kortisol med LC-HRMS med ESI.

Komponent	Spesifikasjon		
UHPLC kolonne	Kinetex 2,6u, C18 100A 75x2,10 mm UHPLC-kolonne (Phenomenex, Torrance, USA)		
Kolonne temperatur	30°C		
Strømningshastighet	0,300 mL/min		
Mobilfase A	Vann med maursyre (0,1 %, v/v)		
Mobilfase B	MeOH med maursyre (0,1 %, v/v)		
Gradient	Tid (min)	Flow (mL/min)	B (%)
	0,0	0,3	35
	8,0	0,3	80
	8,2	0,3	100
	10,2	0,3	100
	10,3	0,3	35
	12,0	0,3	35
Injeksjonsvolum	3,0 µL		
Autosampler temperatur	15 °C		
Vask av kolonne	70 % MeOH (v/v)		

Tabell 9 beskriver innstillinger for ionekilden ESI som ble benyttet under masteroppgaven.

Tabell 9: Oversikt over innstillinger for ionekilden ESI som ble benyttet under masteroppgaven. Forstøvergass og hjelpegass som ble benyttet var N₂ (g) med 99 % renhet. «p.d.u» (vilkårlig enhet, «arbitrary unit») er en relativ enhet som benyttes uten å gi indikasjoner på størrelse eller dimensjon (Hansen 2019).

Komponent	Spesifikasjon
Spenning på spray, positivt ionemodus	3 200 V
Kapillærtemperatur	280 °C
Aux gassvarmer temperatur	300 °C
Gasshastighet	35E+10 (p.d.u)

3.4 Instrumentell metodeutvikling

Massespektrometrisk deteksjon

En standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL) løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) ble analysert ved 1 injeksjon for å påvise adduksjoner som ble dannet ved ESI. Tilsvarende ble gjennomført med standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL) løst i matris.

Mobilfasesammensetning og mobilfasegradient

Det ble testet tre forskjellige mobilfasesammensetninger: Vann (A) + MeOH (B), begge med maursyre (0,1 %, v/v), vann (A) + MeOH (B), begge med maursyre (0,2 %, v/v) og Vann (A) + MeOH (B), begge med NH₄HCO₂ (5 mM, w/v). En standard med kortisol og kortison (100 ng/mL) ble benyttet for dette formålet og analysert ved 3 injeksjoner med hver av mobilfasesammensetningene innenfor en dag. Det ble brukt ultrarent vann i mobilfasene.

Det ble testet to ulike mobilfasegradienter med en standard (100 ng/mL). Den første mobilfasegradienten som ble testet bestod av ultrarent vann med maursyre (0,1 %, v/v) som mobilfase A, og MeOH med maursyre (0,1 %, v/v) som mobilfase B med en strømningshastighet på 0,300 mL/min. Gradienten (% mobilfase B) var som følger: Start-45 %, 13 min-80 %, 15 min-90 %, 18 min-45 % i totalt 20 min. Den andre mobilfasegradienten bestod av ultrarent vann med maursyre (0,1 %, v/v) som mobilfase A, og MeOH med maursyre (0,1 %, v/v) som mobilfase B med en strømningshastighet på

0,300 mL/min. Gradienten (% mobilfase B) var som følger: Start-35 %, 8,0 min-80 %, 8,2 min-100 %, 10,3 min 35 % i totalt 12 min.

Ekstraksjonsmiddel

Det ble testet to ulike ekstraksjonsmidler for kortison og kortisol: Metyl tert-butyleter (MTBE) og etylacetat (EtOAc) i plasmaprøver tilsatt 5 µL arbeidsløsning (150 ng/mL) inklusive ISTD (240 ng/mL). Analysene ble gjennomført ved 2 injeksjoner fordelt på to forskjellige dager.

3.5 Metodevalidering

Metoden ble validert i henhold til NMKL- prosedyre Nr. 5 (2019). Parameterne som ble inkludert i metodevalideringen var linearitet, deteksjonsgrense, kvantifiseringsgrense, matrikseffekter, riktighet, presisjon og måleusikkerhet. Validering av metode ble utført på plasma, slim og delvis på fiskeskjell.

Linearitet

Lineær regresjon ble brukt for å dokumentere metodens linearitet. Dette ble oppnådd ved å analysere minimum fem konsentrasjonsnivåer i et område som kan bli aktuelt ut fra tidligere publiserte data. Regresjonskoeffisienten (R^2) på en $\frac{1}{x}$ -vektet kalibreringskurve ble brukt som en mal på linearitet. Se Vedlegg 4, Vedlegg 7 og Vedlegg 11.

LOD og LOQ

Metodens deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) ble evaluert ved å analysere standardkurver som ble laget med og uten matriks på tre forskjellige dager (se Vedlegg 4, Vedlegg 7 og Vedlegg 11). Det ble tatt i betraktning at «støy»- metoden ikke kan brukes i forhold til HRMS- data, men en annen tilnærming som baseres på standardavviket (SD) av signalet (y-aksen) og stigningstall for kalibreringskurven (2.6 Metodevalidering).

Matrikseffekter

Eventuelle matrikseffekter i plasma, overflateslim og fiskeskjell ble evaluert ved å benytte stigningstallet fra $\frac{1}{x}$ -vektede kalibreringskurver som ble laget med og uten matriks (90 % MeOH/vann 9:1, v/v) (2.6 Metodevalidering). Analysene ble gjennomført på tre forskjellige dager (Vedlegg 4, Vedlegg 7 og Vedlegg 11).

Riktighet

Metodens riktighet ble bestemt ut fra gjenvinningsforsøk hvor en kjent mengde analytt ble tilsatt prøven før prøveopparbeidelse. Gjenvinningsforsøkene ble gjennomført på tre forskjellige dager med tre tekniske replikater per dag. Overensstemmelse mellom gjennomsnittlig analysert verdi og en sann verdi ble brukt for å estimere metodens bias. Nærmere beskrivelse er gitt i Vedlegg 3, Vedlegg 6 og Vedlegg 10.

Presisjon

Metodens presisjon, analysemetodens evne til å kunne gi de samme resultatene ved gjentatte målinger ble bestemt ut fra metodens repeterbarhet og reproduserbarhet. Dette ble oppnådd med å analysere duplikatprøver på 6 forskjellige dager. Beregninger ble gjennomført som beskrevet i punkt 2.6 Metodevalidering.

Måleusikkerhet

Metodens utvidede usikkerhet ble basert på metodens presisjon innen laboratoriet ($\% u_{RW}$) og usikkerhet knyttet til bias ($\% u_{Bias}$). Under beregningen av u_{Bias} var det flere komponenter som ble inkludert; usikkerhet i riktighet ($\% MS_{Bias}$), usikkerhet i volum ($\% u_{Spiked}$) og nominal verdi til innkjøpt referansemateriale ($u_{C, ref}$) som ble tatt i betraktning. Ved bestemmelse av MS_{Bias} ble dette gjennomført ved gjenfinningsforsøk ved seks duplikater på forskjellige dager. Ved bestemmelse av $u_{C, ref}$ ble verdi hentet ut av sertifikatene som fulgte med stamløsningene av kortison ($\mu\text{g/mL}$) og kortisol (1 mg/mL). Ved bestemmelse av $\% u_{Spiked}$ ble 5 μL ionebyttet vann (25 °C) veid på en vekt med 4 desimaler ved 7 paralleller.

3.6 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA)

For kvantitative analyser ble det brukt et standardisert Kortisol ELISA Kit (Cortisol Competitive ELISA Kit, ADI-900-071 Enzo, Farmingdale, USA). Analysen ble gjennomført ifølge produktmanualen (Cortisol ELISA kit, Catalog #: ADI- 900-071, 96 Well Kit Enzo, Farmingdale, USA) og absorpsjonsmålingene ble gjennomført ved hjelp av absorpsjons avleser (SpectraMax[®] i3x Molecular Devices, San Jose, USA) ved 405 nm. SpectraMax (SoftMax Pro 6.5.1 Molecular Devices, San Jose, USA) ble benyttet som software.

4 Resultater og diskusjon

Instrumentell metodeutvikling inkluderer flere steg beskrevet i disse avsnittene. Resultatene for hvert avsnitt i denne instrumentelle metodeutviklingen ble lagt til grunn for videre metodevalidering av kvantitative analyser av kortison og kortisol i plasma, overflateslim og fiskeskjell fra Atlantisk laks (*Salmo salar*) på LC-HRMS.

4.1 Instrumentell metodeutvikling

Valg av kolonne

Riktig valg av kolonne var en viktig del av metodeutviklingen for å oppnå blant annet tilstrekkelig separasjon av analytter, symmetriske topper og effektiv retensjonstid. For å oppnå dette ble valg av kolonne basert hovedsakelig på analyttens lipofile egenskaper. Kortison og kortisol er relativt små molekyler sammenliknet med andre biomolekyler og har en lipofil natur. Derfor ble det benyttet en oktadekylsilan- kolonne («C18-kolonne») som var pakket med silikapartikler som var funksjonalisert med C18-hydrokarbonkjeder, noe som gjør stasjonærfasen upolar. Partikkelstørrelsen var 2,6 µm, og denne ble valgt fordi liten partikkelstørrelse er ideelt for å øke effektivitet til separasjonen. Andre faktorer som kunne ha blitt vurdert var indre diameter, temperatur på kolonnen samt strømningshastighet. Disse parameterne ble ikke testet i tillegg til ulike kolonner (Izquierdo-Hornillos, Gonzalo-Lumbreras et al. 2005, Miller 2005).

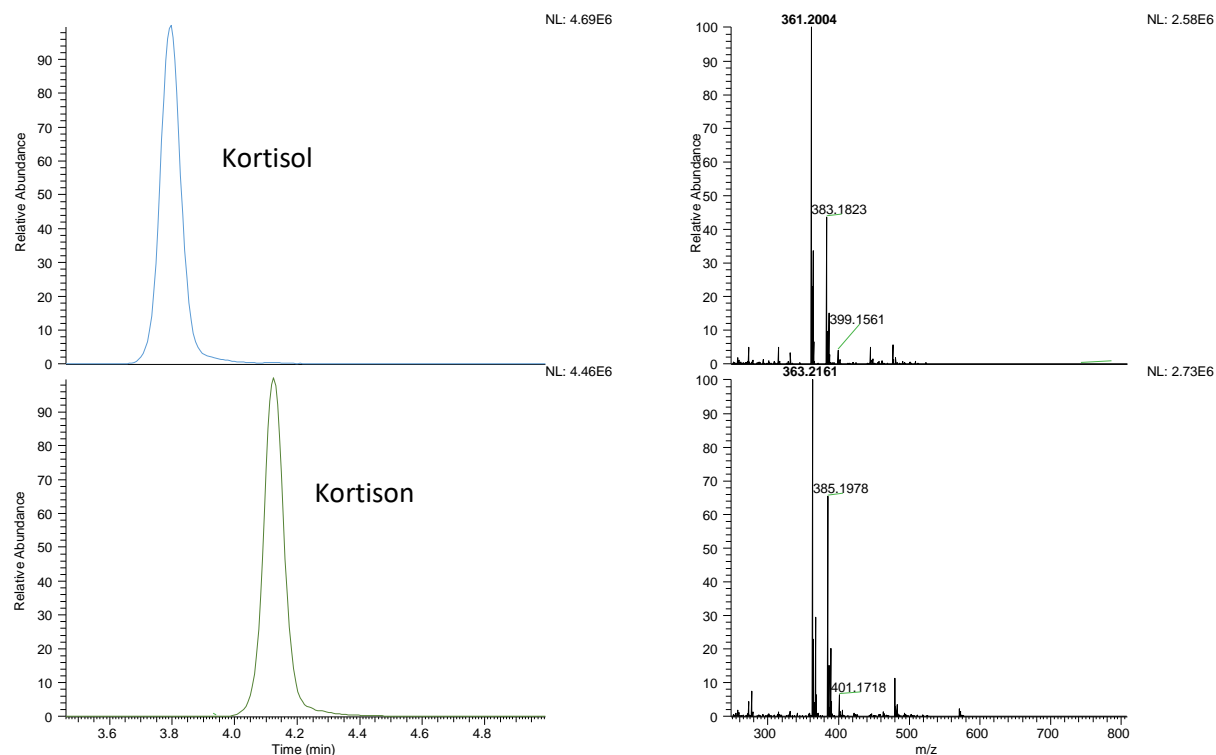
Massespektrometrisk deteksjon

Det ble påvist adduksjoner av H⁺, Na⁺ og K⁺ for begge analytter ved analyse av en standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL) (Tabell 10). Tilsvarende adduksjoner ble observert for matriksassisterte kalibreringsstandarder for plasma, overflateslim og fiskeskjell (Kruve and Kaupmees 2017).

Tabell 10: Oversikt over påviste adduksjoner av kortison og kortisol i form av H⁺-addukt, Na⁺-addukt og K⁺-addukt, med nøyaktig m/z- verdi. Disse adduktene ble påvist i en kalibreringsstandard (100 ng/mL) i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v).

	Nøyaktig m/z av analytt + addukt		
	H ⁺	Na ⁺	K ⁺
Kortison	361.2015	383.1835	399.1574
Kortisol	363.2172	385.1991	401.1730

Protonerte molekylioner, [M+H]⁺ dominerte massespektrene fra alle typer standarder og prøver. Det er med andre ord det ionet som det ble dannet mest av. Kromatogram og massespekter for dannede adduksjoner er gitt i Figur 26. Det ble ikke observert NH₄⁺- adduksjoner. Adduksjonene kan stamme fra stoffer i mobilfasen, mobilfasemolekyler, løses ut fra glassutstyr som ble benyttet under prøveopparbeidelsen eller urenheter (Kruve and Kaupmees 2017).



Figur 26: Øverst til venstre vises toppen for kortison (i blått) i kromatogrammet, og øverst til høyre vises tilhørende massespekter for kortison med påviste adduksjoner. Dette massespekteret viser «basepeak» (i fet skrift) ved $m/z = 361,2004$, og dette er $[M+H]^+$ - adduksjonen. $[M+Na]^+$ - adduksjonen ble observert ved $m/z = 383,1823$ og $[M+K]^+$ - adduksjonen ble observert ved $m/z = 399,1561$. Nederst til venstre vises toppen for kortison (i grønt) i kromatogrammet, og nederst til høyre vises tilhørende massespekter for kortisol med påviste adduksjoner. Dette massespekteret viser «basepeak» (i fet skrift) ved $m/z = 363,2161$, og dette er $[M+H]^+$ - adduksjonen. $[M+Na]^+$ - adduksjonen ble observert ved $m/z = 385,1978$ og $[M+K]^+$ - adduksjonen ble observert ved $m/z = 401,1718$. Disse adduktene ble påvist i en kalibreringsstandard (100 ng/mL) i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v).

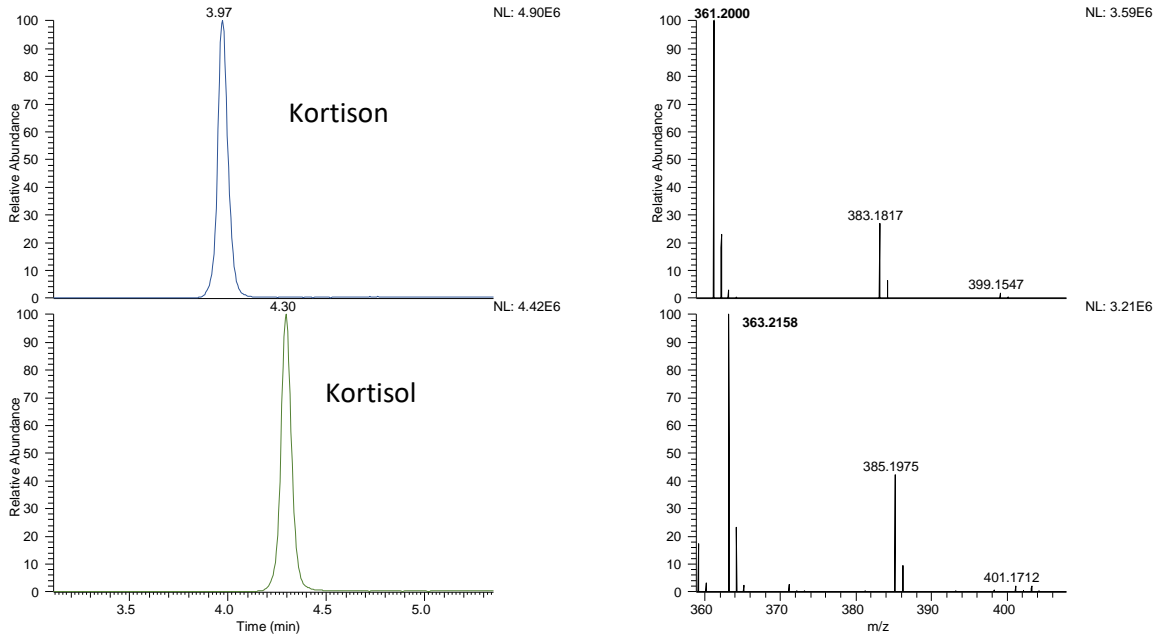
Mobilfasesammensetning og mobilfasegradient

Ulike mobilfasesammensetninger ble testet som en del av metodeutviklingen (Tabell 11). Målet med dette var å finne de optimale betingelsene for mobilfasen som ga best signalintensitet i massespektrometeret og resulterte i best separasjon.

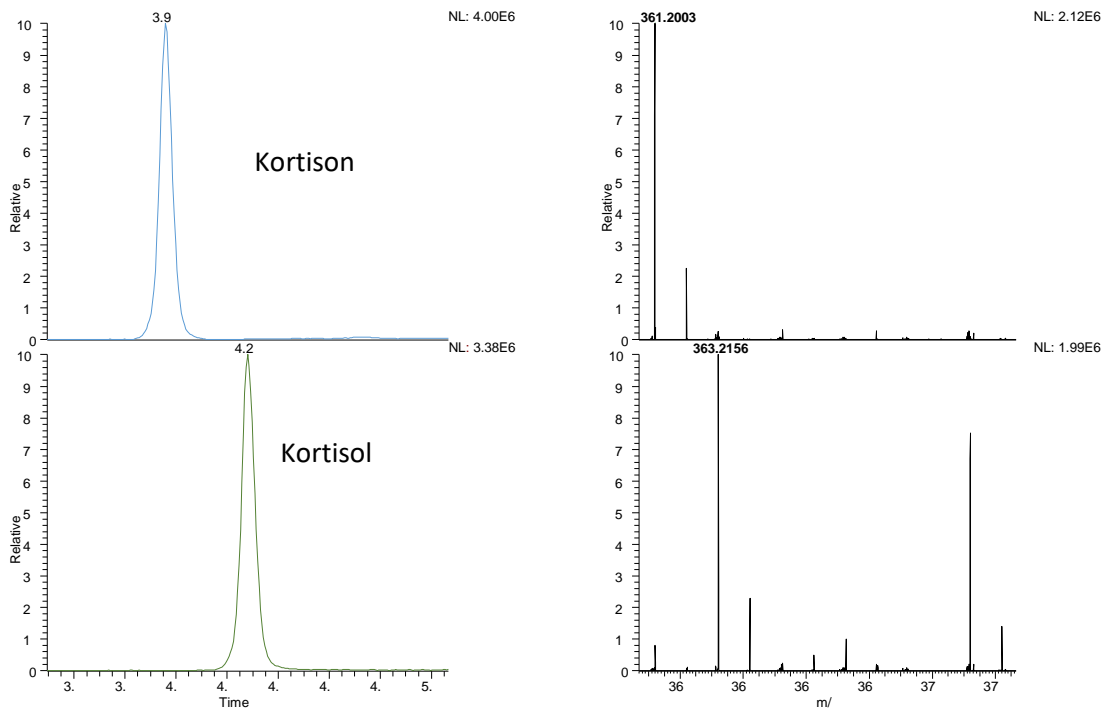
Tabell 11: Gjennomsnitt med tilhørende SD av toppareal og retensjonstid for kortison og kortisol. Disse tallene er hentet fra ionekromatogrammet basert på $[M+H]^+$ - ionet ved de ulike mobilfasesammensetningene når en arbeidsløsning (100 ng/mL) ble analysert ved $N=3$ injeksjoner per mobilfasesammensetning.

Analytt	Vann (A) + MeOH (B), begge med maursyre (0.1 %, v/v)		Vann (A) + MeOH (B), begge med maursyre (0.2 %, v/v)		Vann (A) + MeOH (B), begge med NH_4HCO_2 (5 mM, w/v)	
	Toppareal	RT (min)	Toppareal	RT (min)	Toppareal	RT (min)
Kortison	$1,52E+07 \pm 1,68E+06$	$4,4 \pm 0,53$	$1,95E+07 \pm 5,28E+06$	$3,9 \pm 0,06$	$3,37E+07 \pm 2,61E+05$	$4,2 \pm 0,01$
Kortisol	$1,61E+07 \pm 5,04E+05$	$4,4 \pm 0,13$	$1,82E+07 \pm 6,11E+06$	$3,9 \pm 0,60$	$1,68E+07 \pm 2,61E+05$	$4,53 \pm 0,00$

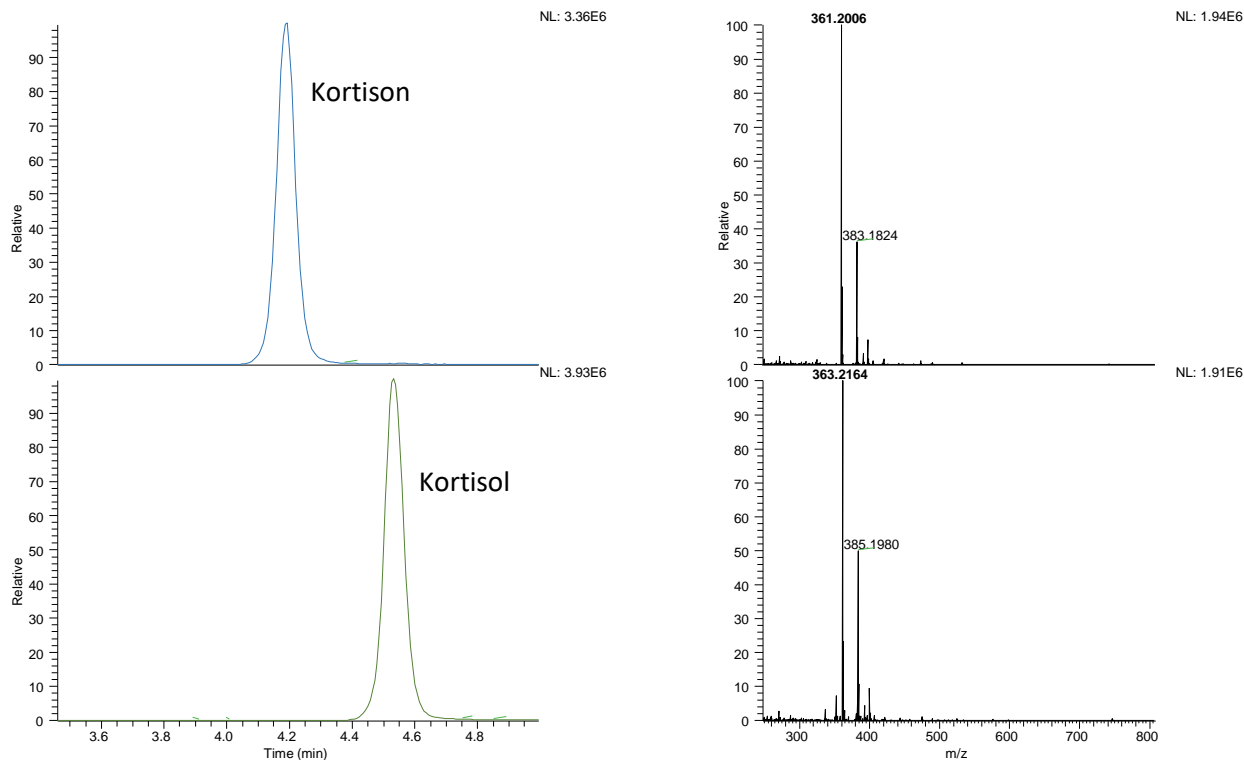
Figur 27, Figur 28 og Figur 29 viser topp av kortison og kortisol i kromatogrammet, samt tilhørende massespekter ved de ulike mobilfasesammensetningene.



Figur 27: Til venstre vises kromatogram med topp av kortison (øverst i blått) og kortisol (nederst i grønt). Øverst til høyre vises massespekter av kortison, og nederst til høyre vises massespekter for kortisol. Massespekteret for kortison viser $[M+H]^+$ som «basepeak» ved $m/z = 361,2000$ og er markert i fet skrift. Toppen ved $m/z = 383,1817$ er $[M+Na]^+$ -adduksjonen og toppen ved $m/z = 399,1547$ er $[M+K]^+$ - adduksjonen. Massespekteret for kortisol viser $[M+H]^+$ som «basepeak» ved $m/z = 363,2158$ og er markert i fet skrift. Toppen ved $m/z = 385,1975$ er $[M+Na]^+$ -adduksjonen og toppen ved $m/z = 401,1712$ er $[M+K]^+$ - adduksjonen. Dette er resultatet av en kalibreringsstandard (100 ng/mL) løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) analysert med mobilfasesammensetning ultrarent vann og MeOH, begge med maursyre (0,1 %, v/v).



Figur 28: Til venstre vises kromatogram med topp av kortison (øverst i blått) og kortisol (nederst i grønt). Øverst til høyre vises massespekter av kortison, og nederst til høyre vises massespekter for kortisol. Massespekteret for kortison øverst til høyre viser $[M+H]^+$ som «basepeak» ved $m/z=361,2003$ og er også markert i fet skrift. Massespekteret for kortisol nederst til høyre viser $[M+H]^+$ som «basepeak» ved $m/z=363,2156$. Dette er resultatet av en kalibreringsstandard (100 ng/mL) løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) analysert med mobilfasesammensetning ultrarent vann og MeOH, begge med maursyre (0,2 %, v/v).



Figur 29: Til venstre vises kromatogram med topp av kortison (øverst i blått) og kortisol (nederst i grønt). Øverst til høyre vises massespekter av kortison, og nederst til høyre vises massespekter for kortisol. Massespekteret for kortison viser $[M+H]^+$ som «basepeak» ved $m/z = 361,2006$ og er markert i fet skrift. Toppen ved $m/z = 383,1824$ er $[M+Na]^+$ -addukt-ionet. Massespekteret for kortisol viser $[M+H]^+$ som «basepeak» ved $m/z = 363,2164$ og er markert i fet skrift. Toppen ved $m/z = 385,1980$ er $[M+Na]^+$ -addukt-ionet. Dette er resultatet av en kalibreringsstandard (100 ng/mL) løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) analysert med mobilfasesammensetning av ultrarent vann og MeOH med NH_4HCO_2 (5mM, w/v)

Valget av mobilfasesammensetningen ble basert på høyest toppareal, stabiliteten av signalet og om toppene var symmetriske (Figur 27, Figur 28 og Figur 29). For kortison og kortisol var det mobilfasesammensetningen som bestod av ultrarent vann (A) og MeOH (B), begge med maursyre (0,2 %, v/v) som ga det høyeste topparealet (Tabell 11). Toppareal ble for kortison $1,95E+07 \pm 5,28E+06$, og topparealet ble for kortisol $1,82E+07 \pm 6,11E+06$ med denne mobilfasesammensetningen. Mobilfasesammensetningen som bestod av ultrarent vann (A) og MeOH (B), begge med NH_4HCO_2 (5 mM, w/v) ga minst SD. Toppareal for kortison ved denne mobilfasesammensetningen ble for kortison $3,37E+07 \pm 2,61E+05$, og topparealet for kortisol ble $1,68E+07 \pm 2,61E+05$. Selv om disse mobilfasesammensetningene ga størst toppareal og minst SD var utfallet for de tre mobilfasesammensetningene relativt like. Dette ble bekreftet ved en student T-test med tosidig fordeling med to utvalg som antar lik varians. Denne testen ble benyttet fordi det var av interesse å sammenlikne den samme gruppen ved forskjellige mobilfasesammensetninger. Resultatet av Student T-testene konkluderte med at det var vilkårlig hvilken mobilfasesammensetning som ble benyttet (Ken Broeckhoven 2013).

Det ble dermed besluttet å benytte en mobilfasesammensetning som bestod av ultrarent vann (A) og MeOH (B), begge med maursyre (0,1 %, v/v). Denne mobilfasesammensetningen ga et toppareal for kortison på $1,52E+07 \pm 1,68E+06$ og $1,61E+07 \pm 5,04E+05$ for kortisol. Denne mobilfasesammensetninger viste stabile signaler, symmetriske topper i kromatogrammet og har blitt brukt i andre studier som inkluderte analyser av kortison og kortisol. Den er også relativt rimelig sammenliknet med eksempelvis acetonnitril, samt enkel å lage.

Maursyre (0,1 %, v/v) ble tilsatt mobilfaseløsningene fordi maursyre er en god protonkilde som kan forbedre ioniseringen. Ioniseringen til analyttmolekylene kan påvirkes av mobilfasens pK_a . Det er også mulig å benytte andre parametere for å vurdere hvilken mobilfasesammensetning som fungerer best, eksempelvis signalhøyde. Signal til støy-forhold (S/N) ble ikke benyttet fordi støy kan være vanskelig å definere for et høyttoppløsende instrument, som ble benyttet i denne masteroppgaven. Dette ble gjort fordi støy er avhengig av hvilke massenøyaktighet som brukes til å plote kromatogrammene. Ved en satt massenøyaktighet på for eksempel 10 ppm vil mer støy inkluderes sammenliknet med en satt massenøyaktighet på 5 ppm, men i dette tilfellet var ikke støy konstant. Selv om eksempelvis 5 ppm ble konstant benyttet ved alle analysene, kan det skje at det ikke oppstår noe støy i det hele tatt og at grunnlinjen observeres kun som en rett linje i kromatogrammet i tillegg til en topp. Da vil i prinsippet toppen defineres som uendelig stor selv om den i virkeligheten er liten. Det er i tillegg ønskelig å slippe inn så lite støy som mulig og derfor er det ønskelig at massenøyaktigheten er så lav som mulig (Liu, Zhang et al. 2019, Fariha, Jabrah et al. 2022).

Valget av mobilfasegradient ble basert på retensjonstid, separasjon av analytt og symmetriske topper. Ut fra disse betingelsene ble mobilfasegradienten gitt i Tabell 8 med en analysetid på 12 minutter valgt fordi denne gradienten resulterte i kortest analysetid. Begge mobilfasegradientene viste symmetriske topper og akseptabel separasjon av analytt. Det var viktig å undersøke hvilken mobilfasegradient som eluerte analyttmolekylene tilstrekkelig raskt, men samtidig ikke for raskt slik at de ikke ko-eluerer med et stort antall andre molekyler som vaskes ut av kolonnen ved oppstart av analyse.

Intern standard (ISTD)

Kortison-2,3,4- $^{13}C_3$ og Kortisol-D₄ (9,11,12,12-D₄) ble valgt fordi nevnte ISTD korrigerer eventuelle matrikseffekter som kan oppstå. Isotopmerkede ISTD er foretrukket over strukturanaloge ISTD fordi isotopmerkede ISTD ko-eluerer med analyttene og har praktisk identiske kjemiske og fysiske egenskaper som de native forbindelsene.

Bruken av ISTD bidrar til økt nøyaktighet ved kvantitative analyser. Det ble også lagt vekt på at konsentrasjonen på ISTD ble bestemt til å ligge godt innenfor arbeidsområde på den eksterne standardkurven som er fra 1 ng/mL til og med 500 ng/mL (El-Farhan, Rees et al. 2017).

Ekstraksjonsmiddel

Prøveopparbeidelsen inkluderte væske-væske-ekstraksjon for å ekstrahere analytt fra matriks med MTBE og EtOAc. Tabell 12 viser en oversikt over gjennomsnittlig toppareal med SD av kortison og kortisol, og den beregnede andel av ekstraherte analytter uttrykt i (%) gjenfinning.

Tabell 12: Gjennomsnittlig toppareal av kortison og kortisol etter ekstraksjon med MTBE og EtOAc fra plasmaprøver. Tabellen viser andel ekstraherte analytter uttrykt i % gjenfinning. Tallene er basert på analyser fra LC-HRMS ved N = 2 injeksjoner.

Analytt	Toppareal MTBE	MTBE CV (%)	MTBE (%)	Toppareal EtOAc	EtOAc CV (%)	EtOAc (%)
Kortison	$4,44E+06 \pm$ $2,01E+05$	5	39	$6,92E+06 \pm$ $7,32E+05$	11	61
Kortisol	$4,63E+06 \pm$ $4,32E+05$	9	46	$5,38E+06 \pm$ $6,81E+05$	13	54

Det var etylacetat (EtOAc) som ekstraherte mest analytt fra plasmaprøvene ut fra observert toppareal (Tabell 12). EtOAc ekstraherte 61 % kortison og 54 % kortisol uttrykt i % gjenfinning. Valget falt på MTBE fordi det ble oppnådd visuelt bedre og raskere fase-separasjon sammenliknet med etylacetat, og dette er viktig med tanke på ekstraksjon av små prøvevolum (30 µL). Det ble ekstrahert 39 % kortison og 46 % kortisol uttrykt i % gjenfinning med MTBE. Begge er også rimelige og utgjør ingen stor HMS-risiko. Hadde ekstraksjonen blitt testet med eksempelvis kloroform, som utgjør en større HMS-risiko ved bruk og håndtering kunne det blitt vurdert om et annet ekstraksjonsmiddel kunne vært benyttet i stedet. Andre ekstraksjonsmidler som potensielt sett kunne blitt testet sammen med MTBE og etylacetat var dietyleter, diklormetan (DCM) eller heksan, men her hadde også HMS blitt vektlagt. Det er også viktig å påpeke at halogenerte ekstraksjonsmidler har høyere tetthet sammenliknet med analytt og vil dermed havne nederst i en væske/væske-ekstraksjon som hadde komplisert prøveopparbeidingen (Geffroy 2018, Yuan, Le et al. 2020, Ney, Felmingham et al. 2021).

Derivatisering med Girards reagens T (GRT) og 2-hydrazinopyridin (2-HP)

Derivatisering av analytt ble utført på en standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL) med GRT løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) (Tabell 13). Resultat av derivatisering ble vurdert ut fra toppareal (%) og kromatografiske egenskaper.

Tabell 13: Toppareal (%) av kortison og kortisol, og dannet mono-adduksjoner. Topparealet (%) er toppareal av produkt i forhold til areal av utgangsstoff uttrykt i % fra ekstraherte ionekromatogrammer ved N= 1 injeksjoner. Derivatiseringen ble gjennomført med GRT løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) av standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL). Den øverste prøven representerer blank uten tilsatt derivatiseringsreagens. Reaksjonen ble stoppet hver 30. minutt.

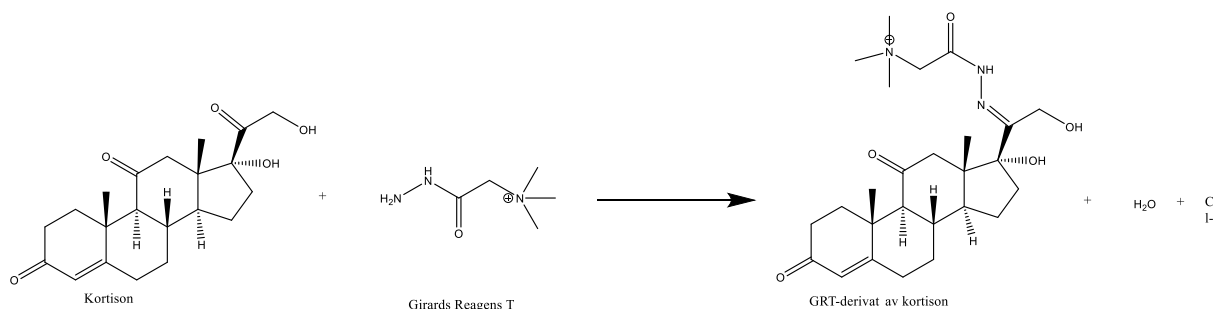
Tid (min)	Toppareal (%)			
	Kortison	Kortisol	Kortison mono addukt	Kortisol mono-addukt
0	100	100	0	0
0	83	83	4.3	2.6
30	83	84	13	10
60	82	83	36	32
90	73	72	30	26
120	73	72	55	50
150	68	68	68	65

Toppareal (%) økte med tiden men reaksjonshastigheten var forholdsvis sakte. Det ble ikke oppnådd et toppunkt etter 150 minutter, der toppareal av mono-addukt for kortison og kortisol ble henholdsvis på 68 og 65 %. Det ble derfor besluttet å teste GRT løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) tilsatt maursyre (0,1 %; v/v) fordi syrer forventes å katalysere reaksjonen og dermed øke reaksjonshastigheten (Tabell 14).

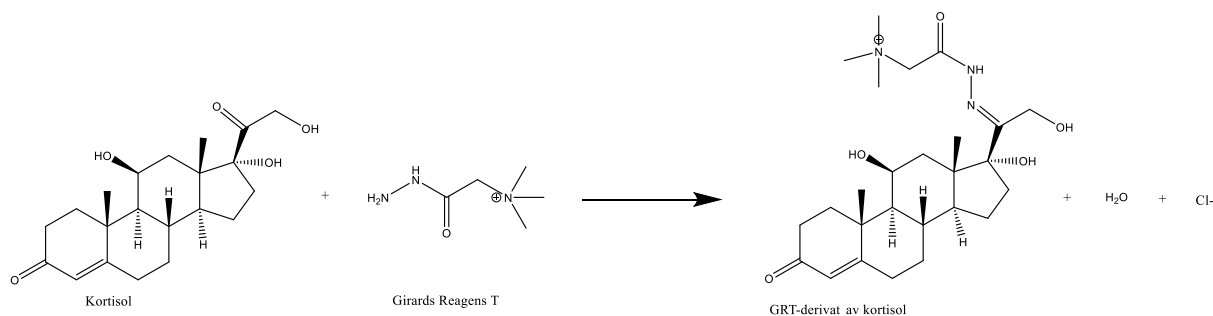
Tabell 14: Toppareal (%) av kortison og kortisol, og dannet mono-adduksjoner. Topparealet (%) er toppareal av produkt i forhold til areal av utgangsstoff uttrykt i % fra ekstraherte ionekromatogrammer ved N= 1 injeksjoner. Derivatiseringen ble gjennomført med GRT løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) med maursyre (0,1 %, v/v) av standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL). Den øverste prøven representerer blank uten tilsatt derivatiseringsreagens. Reaksjonen ble stoppet hver 30. minutt.

Tid (min)	Toppareal (%)			
	Kortison	Kortisol	Kortison mono-addukt	Kortisol mono-addukt
0	100	100	0	0
0	2.2	1.8	174	161
30	0.21	0.20	189	167
60	0.065	0.071	203	181
90	0.00	0.091	187	164
120	0.00	0.087	167	147
150	0.00	0.070	160	144

Ved derivatisering med GRT tilsatt maursyre (0,1 %; v/v) fant reaksjonen sted med en gang derivatiseringsreagenset ble tilsatt prøven, (Tabell 14). Topparealet (%) av kortison og kortisol ble redusert ved 0 minutter da derivatiseringsreagenset ble tilsatt prøven. Topparealet (%) ble for kortison redusert fra 100 % til 2,2 %. Toppareal (%) for kortisol ble redusert fra 100 % til 1,8 %. Det tyder på at reaksjonen fant sted noen sekunder etter at derivatiseringsreagenset ble tilsatt prøven. Topparealet (%) av begge mono-adduktene økte raskere. Toppareal (%) for kortison mono-adduktet økte fra 0 % til 174 %. Toppareal (%) for kortisol mono-adduktet økte fra 0 % til 161 %. Det ble oppnådd maksimal dannelse av GRT-mono-addukt etter 60 minutter for begge analytter. Toppareal (%) for kortison mono-addukt ble 203 %, og for kortisol mono-addukt 181 % ved dette tidspunktet. For GRT ble det kun observert dannelse av mono-addukt av kortison og kortisol som vist i Vedlegg 13. Figur 30 viser reaksjonen der GRT reagerer med kortison i dannelse av et mono-derivat av kortison, med tilsvarende reaksjon i Figur 31 for kortisol (Whittingham 1995, Nadarajah, Skadberg et al. 2017).



Figur 30: Derivatisering av kortison med GRT til et mono-derivat. Reaksjonen er tegnet ved hjelp av ChemDraw Prime.



Figur 31: Derivatisering av kortisol med GRT til et mono-derivat. Reaksjonen er tegnet ved hjelp av ChemDraw Prime.

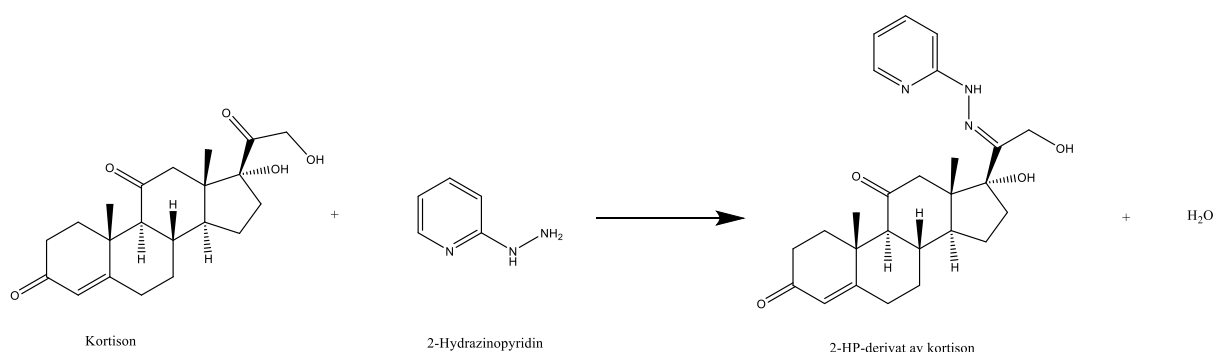
Fra kromatogram vist i Vedlegg 13 ble det også observert at toppen er splittet. Dette kan tyde på at det ble dannet flere produkter i form av isomerer/diastereomere av mono-adduktet. Det ble ikke undersøkt hvilken ketogruppe GRT hadde reagert med i denne oppgaven eller hvilken isomer som ble dannet. Det er mulig å identifisere hvilken isomer/diastereomer som ble dannet ved eksempelvis ^{13}C NMR og ^1H NMR. Derivatisering av analytt ble testet på en standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL) med 2-HP (Tabell 15).

Tabell 15: Toppareal (%) av kortison og kortisol, og dannet mono- adduksjoner. Topparealet (%) er toppareal av produkt i forhold til areal av utgangsstoff uttrykt i % fra ekstraherte ionekromatogrammer ved N= 1 injeksjoner. Derivatiseringen ble gjennomført med 2-HP løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) med maursyre (0,1 %, v/v) av standard (100 ng/mL) inklusive ISTD (40 ng/mL). Den øverste prøven representerer blank uten tilsatt derivatiseringsreagens. Reaksjonen ble stoppet hver 30. minutt.

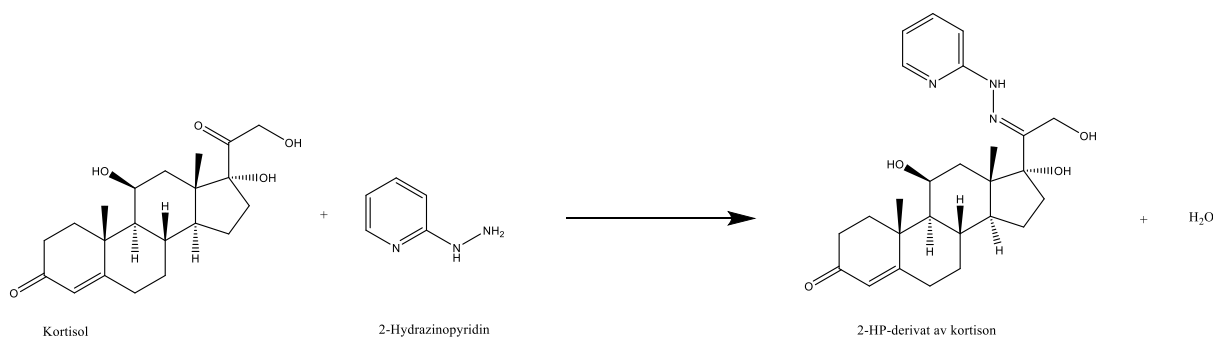
Tid (min)	Toppareal (%)					
	Kortison	Kortisol	Kortison Mono-addukt	Kortisol Mono-addukt	Kortison Di-addukt	Kortisol Di-addukt
0	100	100	0	0	0	0
0	0.048	0.20	100	100	9.4	5.7
30	0.044	0.22	213	225	10	6.4
60	0.020	0.21	121	184	13	8.9
90	0.064	0.20	90	141	16	11
120	0.035	0.22	69	117	18	14
150	0.039	0.23	47	88	21	17

Reaksjonen fant sted med en gang 2-HP- reagenset ble tilsatt prøven. Topparealet (%) av kortison og kortisol ble redusert allerede ved 0 minutter. Toppareal (%) for kortison ble redusert fra 100 % til 0,048 %. Toppareal (%) for kortisol ble redusert fra 100 % til 0,20 %. På samme tid økte topparealet (%) av mono-adduktet for begge analyttene. Toppareal (%) av kortison mono-adduktet økte fra 0 % til 100 % og kortisol mono-adduktet økte fra 0 % til 100 %. Det tydet på at reaksjonen fant sted noen sekunder etter at derivatiseringsreagenset ble tilsatt prøven.

Topparealet (%) av mono-adduktene for begge analytter fikk maksimal dannelse av mono-addukt etter 30 minutter. Toppareal (%) ved dette tidspunktet ble for kortison mono-addukt 213 % og kortisol mono-addukt 225 %. Etter det ble topparealet (%) gradvis redusert. Kromatogram og massespekter er vist i Vedlegg 14. Reduksjonen i toppareal (%) kan skyldes videre omdanning til di-adduktene for begge analyttene (Vedlegg 15). Noen sekunder etter derivatiseringsreagenset ble tilsatt prøven økte topparealet (%) av kortison di-addukt fra 0 % til 9,4 %. Toppareal (%) for kortisol di-addukt økte fra 0 % til 5,7 %. Topparealet (%) av di-adduktene økte med tiden til et toppunkt ved 150 minutter. På dette tidspunktet var topparealet (%) for kortison di-addukt 21 % og kortisol di-addukt 17 %. Fra Vedlegg 14 og Vedlegg 15 ble det observert kun en topp i kromatogrammet, og ikke flere sammenliknet med GRT. Det kan indikere at kun ett produkt ble dannet. Figur 32 og Figur 33 viser reaksjonslikningen for dannelse av 2-HP mono-adduksjoner av begge analyttene.



Figur 32: Derivatisering av kortison med 2-HP ved dannelse av et 2-HP mono-derivat. Reaksjonen er tegnet ved hjelp av ChemDraw Prime.



Figur 33: Derivatisering av kortisol med 2-HP ved dannelse av et 2-HP mono-derivat. Reaksjonen er tegnet ved hjelp av ChemDraw Prime.

Det var også av interesse å undersøke hvor mye signalet potensielt kunne økes på massespektrometret. Dette er vist i Tabell 16, der topparealene for derivatiserte analytter og ikke-derivatiserte analytter ble benyttet for å beregne eventuell økning i toppareal i overflateslim. Derivatiseringen av analytter i overflateslim ble kun gjennomført med 2-HP.

Tabell 16: Toppareal av derivatiserte analytter i form av dannet mono-adduksjoner og ikke-derivatiserte analytter. Disse topparealene ble benyttet for beregning av økning i toppareal av kortison og kortisol. Derivatiseringen ble gjennomført med 2-HP i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) og maursyre (0,1 %; v/v) ved N=1 injeksjoner og 5 paralleller. Beregnet gjennomsnitt ble $1,4 \pm 0,084$ ganger økning i toppareal for kortison, og $1,8 \pm 0,13$ ganger økning for kortisol.

Toppareal						
ID	Kortison	Kortison, Mono-addukt	Kortisol	Kortisol Mono-addukt	Økning Kortison	Økning Kortisol
Blank	24234	0	35967	0	0.0	0.0
1	1.70E+06	2.20E+06	1.87E+06	3.31E+06	1.3	1.8
2	1.59E+06	2.23E+06	1.70E+06	3.34E+06	1.4	2.0
3	1.64E+06	2.24E+06	1.77E+06	3.26E+06	1.4	1.8
4	1.73E+06	2.36E+06	1.89E+06	3.44E+06	1.4	1.8
5	1.68E+06	2.34E+06	1.81E+06	3.38E+06	1.4	1.9
6	1.64E+06	1.92E+06	1.85E+06	2.89E+06	1.2	1.6

Det ble det nær ingen økning i toppareal for kortison- eller kortisol-derivater (Tabell 16). Gjennomsnittlig økning i toppareal for kortison ble $1,4 \pm 0,084$, og for kortisol $1,8 \pm 0,13$. Det tyder på at derivatiseringen ikke oppnådde samme resultater som i litteraturen der derivatisering med 2-HP ga størst økning i signal (Nadarajah, Skadberg et al. 2017). Dette ble også bekreftet ut fra en Student T-test med tosidig fordeling med to utvalg som antar ulik varians. Konklusjonen ut fra dette viser ingen signifikant forskjell i toppareal mellom derivatisert og ikke-derivatisert analytt. Dermed ble det ikke lenger hensiktsmessig å benytte 2-HP for derivatisering av slimprøver. En mulig hypotese på hvorfor økning i toppareal ikke ble oppnådd kan være fordi det var lave konsentrasjoner av analytt i overflateslim. I litteraturen ble 2-HP benyttet ved minimum 20 ng/mL analytt i løsning, men i denne oppgaven var nok konsentrasjonen av analytt i løsning lavere. Mobilfasen inneholdt også mer maursyre (0,2 %), sammenliknet med dette forsøket som inneholdt en lavere konsentrasjon av maursyre (0,1 %). Viktige spektrometriske data er vist i Tabell 17 og Tabell 18 som viser beregnet massefeil (ppm), kjemisk formel for kortison og kortisol mono- addukter og beregnet DBE (dobbelbindingsekvivalenter) for derivatisering gjennomført med GRT og 2-HP i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) med maursyre (0,1 %; v/v).

Tabell 17: Teoretisk m/z-verdi, målt m/z- verdi, beregnet massefeil (ppm), kjemisk formel i positivt ionemodus og beregnet DBE i nøytral tilstand. Derivatiseringen ble gjennomført med GRT i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) med maursyre (0,1 %; v/v).

Analytt	Teoretisk m/z- verdi	Målt m/z- verdi	Massefeil (ppm)	Kjemisk formel	Beregnet DBE
Kortison Mono- addukt	474.2962	474.2968	-1,3	$C_{26}H_{40}N_3O_5^+$	9
Kortisol Mono- addukt	476.3119	476.3120	-0,21	$C_{26}H_{42}N_3O_5^+$	8

Tabell 18: Teoretisk m/z-verdi, målt m/z- verdi, beregnet massefeil (ppm), kjemisk formel i positivt ionemodus og beregnet DBE i nøytral tilstand. Derivatiseringen ble gjennomført med 2-HP i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) med maursyre (0,1 %; v/v).

Analytt	Teoretisk m/z- verdi	Målt m/z- verdi	Massefeil (ppm)	Kjemisk formel	Beregnet DBE
Kortison Mono-addukt	452.2549	452.2547	0,44	$C_{26}H_{33}N_3O_4$	12
Kortisol Mono- addukt	454.2706	454.2703	0,66	$C_{26}H_{35}N_3O_4$	11

Oppsummering av metodeutviklingen

Ut fra den instrumentelle metodeutviklingen ble det påvist [M+H]⁺-adduksjoner for identifisering og kvantifisering av kortison og kortisol, egnet mobilfasesammensetning, mobilfasegradient og ekstraksjonsmiddel. Det ble valgt å ikke benytte derivatisering under prøveopparbeidelsen fordi økningen i signal ved bruk av GRT eller 2-HP ikke ble vurdert som tilstrekkelig.

Derivatiseringsprosessen ikke ble optimalisert, kun testet for å undersøke potensiell økning i toppareal.

4.2 Metodevalidering

Kvantifiseringen av kortisol og kortison i plasma og overflateslim ble validert ut fra valgte parametere, og kvantifiseringen i fiskeskjell ble kun delvis gjennomført. Valideringen ble gjennomført i fra intern standard kvantifisering ved hjelp av isotopmerkede standarder (kortison-2,3,4-¹³C₃ og kortisol-9,11,12,12, D₄; 40 ng/mL) og eksterne standarder.

4.2.1 Metodevalidering for plasma

Linearitet

Den instrumentelle metodens linearitet for kvantifiseringen av kortisol og kortison i plasma ble vurdert etter beregnet R²-verdi basert på matriksassisterte standardkurver som vist Tabell 19. Et konkret eksempel på matriksassistert kalibreringskurve løst i ekstrahert plasma er vist i Figur 46 i Vedlegg 12.

Tabell 19: Beregnet R²- verdi som ble basert på standarder løst i plasmaekstrakt og beregnet etter intern standard metode med $\frac{1}{x}$ -vektning.

Analytt	R ² -verdi
Kortison	0,991
	0,997
	0,999
Kortisol	0,999
	0,999
	0,999

Lineariteten ble testet for å bekrefte om det var en lineær sammenheng mellom konsentrasjon av analytt og signal. R²- verdier $\geq 0,97$ ble regnet som akseptable. Samtlige R²- verdier ble $\geq 0,99$ hvilket tilsvarer svært god linearitet for kvantitative analyser i plasma. Det ble vektlagt at standardkurven skulle dekke hele arbeidsområdet for analyttene for å kunne kvantifisere kortison og kortisol. Det ble benyttet lineær regresjon med minste kvadraters metode, og her ble i utgangspunktet alle punktene i kurven vektlagt i like stor grad gjennom hele kurven. Dette resulterte i større usikkerhet i den lavere delen av kalibreringskurven. Det ble kompensert for ved kurvevektning, der punkverdiene ble vektet invers av konsentrasjonen ved $\frac{1}{x}$ -vektning. Dette førte til at kvaliteten på analyseresultatene økes (Dolan 2009, Lee, Lim et al. 2014, Szeitz, Manji et al. 2014).

LOD og LOQ

LOD og LOQ ble beregnet fra SD av respons i form av toppareal og stigningstall fra en matriksassistert kalibreringskurve ved hjelp av regresjon (Shrivastava 2011). Beregnet LOD og LOQ (ng/mL) er vist i Tabell 20.

Tabell 20: Beregnet LOD og LOQ (ng/mL) basert på stigningstall og standardavvik til standardkurvene fra ekstern kalibrering ved hjelp av matriksassisterte standarder.

Analytt	Stigningstall	SD	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Kortison	0.025	0.018	2.1	7.1
Kortisol	0.028	0.022	2.3	7.7

LOD og LOQ undersøkes for å kunne gjennomføre pålitelige kvantitative målinger av analytt. Beregnet resultat av LOD av kortison og kortisol i plasma ble henholdsvis beregnet til 2,1 ng/mL og 2,3 ng/mL. Beregnet LOQ for kortison og kortisol i plasma ble i henholdsvis beregnet til 7,1 ng/mL og 7,7 ng/mL. Ved sammenlikning med tilsvarende studier utført på humant plasma (Lee, Lim et al. 2014) ble LOD for henholdsvis kortisol og kortison beregnet til 0,2 ng/mL og 1,0 ng/mL. LOQ ble for henholdsvis kortisol og kortison beregnet til 1,0 ng/mL og 2,5 ng/mL.

Det ble oppnådd lavere LOD og LOQ-verdier i studien fra Lee et al. sammenliknet med resultater som ble oppnådd med denne metoden. Lee et al. benyttet en HPLC (Agilent 1200, Palo Alto, CA, USA) koplet til et trippelkvadrupol- massespektrometer (API 4000, Applied Biosystems/MDS SCIEX, CA, USA) via en Turbolon ESI, og detekterte analyttmolekylene i MRM- modus («multiple-reaction-monitoring»). Prøveopparbeidelsen i studien involverte væske-væske-ekstraksjon i likhet med denne metoden. LOD og LOQ ble beregnet med en noe annen tilnærming, der LOD ble definert ut fra laveste konsentrasjon der analytt-toppene var tilstede ved forventet retensjonstidene og signal- til- støy- forholdet (S/N) var henholdsvis > 3 og > 10. Studier utført på humant plasma ble benyttet grunnet mangelfulle valideringsstudier utført på plasma fra fisk (Shrivastava 2011, Lee, Lim et al. 2014).

En sannsynlig hypotese på hvorfor LOD og LOQ i dette arbeidet var relativt høye kan være fordi topparealet til eksterne og interne standarder varierte noe over tid, men også innenfor en analyseserie. Variasjonen kan delvis stamme fra utilstrekkelig utført manuell pipettering av standardløsninger og ISTD. Beregningen kunne også blitt basert på et større antall replikaer for å prøve å korrigere for variasjonen i areal. Variasjonen kan også stamme fra variasjoner i omgivelsene i forhold til instrumentet. Det var dessuten slik at plasmaprøven i utgangspunktet ikke var «blank» til å begynne med fordi blod fra Atlantisk laks vil ha et naturlig innhold av steroidhormoner, deriblant kortison og kortisol. Plasmaprøvene ble innhentet fra laks som ble anskaffet fra Senter for Bærekraftig Akvakultur ved NMBU. Fiskene ble fanget med håv, hvilket også kunne bidratt til stress og dermed en viss økning i kortisol og kortisonnivåene før avlivning. Det kunne vært en mulighet å lage en matriksblank internt på laben ved hjelp av «stripping» med aktivert kull, men dette ble ikke gjennomført. Videre er det et annet faktum at et moderne trippel- kvadrupol instrument gjerne oppnår lavere LOD enn et HRMS instrument (Lee, Lim et al. 2014, Mezzullo, Fanelli et al. 2016, Nouri, Kroll et al. 2020).

Matrikseffekter

Matrikseffekter (%) i plasma ble beregnet fra stigningstallene til kalibreringskurvene basert på standarder løst i plasmaekstrakt og kalibreringskurvene fra standarder løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v). Til dette ble det benyttet ekstern kalibrering, og kurvene ble $\frac{1}{x}$ vektet. Tabell 21 oppsummerer beregnet R²- verdi og stigningstall for matriksassistert kalibreringskurve i plasma og 90 % MeOH/vann (9:1, v/v).

Tabell 21: Beregnet R^2 - verdi og stigningstall for ekstern kalibrering ved hjelp av standarder løst i matrikseksakt, og 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) for kortison og kortisol. R^2 -verdi og stigningstall ble beregnet ut fra $\frac{1}{x}$ – vektet eksterne kalibreringskurver ved hjelp av programvaren Xcalibur.

Kortison				Kortisol			
R^2 Plasma	Stigningstall Plasma	R^2 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	Stigningstall 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	R^2 Plasma	Stigningstall Plasma	R^2 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	Stigningstall 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)
$R^2 = 0.980$	2.33E+05	$R^2 = 0.999$	2.19E+05	$R^2 = 0,998$	2.12E+05	$R^2 = 0,999$	2.13E+05
$R^2 = 0,999$	2.21E+05	$R^2 = 0.999$	2.23E+05	$R^2 = 0,998$	2.13E+05	$R^2 = 0,999$	2.17E+05
$R^2 = 0,999$	2.32E+05	$R^2 = 0,999$	2.33E+05	$R^2 = 0,999$	2.25E+05	$R^2 = 0,999$	2.24E+05

R^2 - verdien ble benyttet for å vurdere kvaliteten til kalibreringskurvene. Tabell 22 viser beregnet ME (%) for kortison og kortisol i plasma.

Tabell 22: Beregnet ME (%) for kortison og kortisol i plasma.

Analytt	ME (%)
Kortison	102
Kortisol	99

Samtlige R^2 -verdier fra Tabell 21 for plasma ble $\geq 0,97$, og ut fra dette kan den matriksassisterte kalibreringskurven regnes som lineær. Matrikseffekter er viktig å undersøke for å fastslå påliteligheten av analyseresultatene som kan påvirkes av potensiell hemming eller økning i signalrespons. Beregnet ME (%) for kortison og kortisol ble henholdsvis 102 % 99 %. Fordi begge verdiene ble tilnærmet 100 % ble det konkludert med at ingen matrikseffekt var tilstede. Plasma er en kompleks matriks som endogent kan inneholde proteiner, ioner og andre komponenter som potensielt sett kunne ha ført til påvirkning av signal (Yuan, Le et al. 2020, Li, Yan et al. 2021).

Utvidet måleusikkerhet

Metodens utvidede usikkerhet i plasma ble beregnet basert på metodens reproduserbarhet (u^2_{RW}) og metodens usikkerhetskomponenter for bias (u^2_{Bias}) som ga metodens kombinerte måleusikkerhet (u^2_c) vist i Tabell 23.

Tabell 23: Metodens utvidede måleusikkerhet (U), metodens reproduserbarhet (u^2_{RW}), usikkerhet for bias (u^2_{Bias}) og metodens kombinerte måleusikkerhet (u_c) i plasma.

Analytt	u^2_{RW} (%)	u^2_{Bias} (%)	u_c (%)	U (%)
Kortison	9	6,0	3,9	8,0
Kortisol	15	3,4	4,3	9,0

Før metodens utvidede usikkerhet kunne beregnes måtte metodens bias for kortison og kortisol beregnes for å vurdere om bias var signifikant. Dette ble beregnet ved hjelp av en tosidig Student T-test og sammenliknet med t-verdi med 9 frihetsgrader og 95 % konfidensintervall. Konklusjonen ble at bias for metoden for kortison og kortisol ikke var signifikant. Det var viktig å vurdere metodens bias i forkant av usikkerhetsberegningen, fordi når usikkerhetsberegningen for metoden ble gjennomført ble metodens bias inkludert i beregningen. Hvis metodens bias derimot ble signifikant kan ikke metodens bias inkluderes i metodeusikkerheten og bias måtte ha blitt korrigert for i hvert av stegene i prøveopparbeidelsen og analysen.

Utvidet måleusikkerhet bestemmes ofte etter krav fra kunde eller internasjonale standarder. u^2_{RW} (%) for kortison ble bestemt til 9 % og u^2_{Bias} ble bestemt til 6,0 %. Dette resulterte i en utvidet usikkerhet på 8,0 %. Det ble vurdert som lav usikkerhet for kortison for kvantitative analyser i plasma. For kortisol ble u^2_{RW} (%) bestemt til 15 %, u^2_{Bias} (%) ble bestemt til 3,4 % og metodens utvidede usikkerhet ble bestemt til 9 %. Den utvidede måleusikkerheten ble vurdert som lav.

4.2.2 Metodevalidering for overflateslim

Linearitet

Den instrumentelle metodens linearitet for kvantifiseringen av kortisol og kortison i overflateslim ble vurdert etter beregnet R^2 -verdi basert på matriksassisterte kalibreringskurver løst i ekstrahert overflateslim som vist i Tabell 24.

Tabell 24: Beregnet R^2 –verdi som ble basert på standarder løst i overflateslimekstrakt og beregnet etter intern standard metode med $\frac{1}{x}$ -vektning.

Analytt	R^2 -verdi
Kortison	0,999
	0,999
	0,998
Kortisol	0,999
	0,999
	0,998

For overflateslim ble samtlige R^2 - verdier $\geq 0,99$, og dette hvilket tilsvarer svært god linearitet for kvantitative analyser i overflateslim.

LOD og LOQ

LOD og LOQ ble beregnet fra SD av respons i form av areal og stigningstall fra en matriksassistert kalibreringskurve ved hjelp av ved regresjon (Shrivastava 2011). Beregnet LOD og LOQ (ng/mL) er vist i Tabell 25.

Tabell 25: Beregnet LOD og LOQ (ng/mL) basert på stigningstall og standardavvik sandardkurvene fra ekstern kalibrering ved hjelp av matriksassisterte standarder.

Analytt	Stigningstall	SD	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Kortison	0.025	0.024	2.9	9.6
Kortisol	0.028	0.017	1.8	6.0

Beregnet resultat av LOD av kortison og kortisol i overflateslim ble henholdsvis beregnet til 2,9 ng/mL og 1,8 ng/mL. Beregnet LOQ for kortison og kortisol ble henholdsvis beregnet til 9,6 ng/mL og 6,0 ng/mL. Ved sammenlikning med tilsvarende studier utført på humant spytt (Antonelli, Ceccato et al. 2015) ble LOD for henholdsvis kortisol og kortison beregnet til 0,1 ng/mL og 0,5 ng/mL. LOQ for henholdsvis kortisol og kortison ble beregnet til 0,5 ng/mL og 1 ng/mL.

Det ble oppnådd lavere LOD og LOQ i studien fra Antonelli et al. sammenliknet med resultater som ble oppnådd med denne metoden. Antonelli et al. benyttet en HPLC (Agilent 1200, Palo Alto, CA, USA) koblet til et trippel- kvadrupol massespektrometer (Agilent 6430, Palo Alto, CA, USA) via en ESI (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) i positivt ionemodus. Antonelli et al. benyttet solid-fase ekstraksjon (SPE) under prøveopparbeidelsen, i motsetning til væske-væske-ekstraksjon som ble utført i denne metoden. LOD og LOQ ble beregnet med en noe annen tilnærming, der LOD ble definert ut fra laveste konsentrasjon av signal som var henholdsvis 3 og 10 ganger større enn bakgrunnsstøyen.

Studier utført på humant spytt ble benyttet grunnet mangelfulle valideringsstudier utført på overflateslim fra fisk (Antonelli, Ceccato et al. 2015, Bakusic, De Nys et al. 2019).

En sannsynlig hypotese på hvorfor LOD og LOQ i dette arbeidet var relativt høye også i dette tilfellet kan være fordi topparealet til eksterne og interne standarder varierte over tid og innen en analyseserie. Variasjonen kan delvis stamme fra utilstrekkelig utført manuell pipettering av standardløsninger og ISTD. Beregningen kunne også blitt basert på et større antall replikaer for å prøve å korrigere for variasjonen i toppareal.

Variasjonen kan også stamme fra variasjoner i omgivelsene i forhold til instrumentet. Overflateslimet var også i dette tilfellet ikke «blank». Forskning utført på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (De Mercado, Larrán et al. 2018) viser at det tar lengre tid å skille analytt ut i overflateslim sammenliknet med plasma, der analytt kunne påvises i overflateslim 10 minutter etter en stressfaktor. Fisken som ble benyttet i dette forsøket ble anskaffet fra Senter for Bærekraftig Akvakultur ved NMBU, og det kunne være tilfelle at fisken hadde vært utsatt for signifikant stress før og under prøveuttak (De Mercado, Larrán et al. 2018, Bakusic, De Nys et al. 2019).

Matrikseffekter

Matrikseffekter (%) i overflateslim ble beregnet fra stigningstallene til kalibreringskurvene basert på standarder løst i overflateslimekstrakt og kalibreringskurvene fra standarder løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v). Til dette ble det benyttet ekstern kalibrering, og kurvene ble $\frac{1}{x}$ vektet. Tabell 26 oppsummerer beregnet R²- verdi og stigningstall for matriksassistert kalibreringskurve i overflateslim og 90 % MeOH/vann (9:1, v/v).

Tabell 26: Beregnet R²- verdi og stigningstall for ekstern kalibrering ved hjelp av standarder løst i matrikseksktrakt, og 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) for kortison og kortisol. R²-verdi og stigningstall ble beregnet ut fra $\frac{1}{x}$ – vektet eksterne kalibreringskurver ved hjelp av programvaren Xcalibur.

Kortison				Kortisol			
R ² Slim	Stigningstall Slim	R ² 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	Stigningstall 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	R ² Slim	Stigningstall Slim	R ² 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	Stigningstall 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)
R ² = 0,966	2.12E+05	R ² = 0.999	2.19E+05	R ² = 0.965	2.05E+05	R ² = 0.999	2.13E+05
R ² = 0.965	2.12E+05	R ² = 0.999	2.23E+05	R ² = 0.965	2.05E+05	R ² = 0.999	2.18E+05
R ² = 0.997	2.40E+05	R ² = 0.999	2.33E+05	R ² = 0.998	2.29E+05	R ² = 0.999	2.24E+05

R²- verdien ble benyttet for å vurdere kvaliteten til kalibreringskurvene. Det var kun en analyse som ga R²- verdi ≥ 0,97. Tabell 27 viser beregnet ME (%) for kortison og kortisol i overflateslim.

Tabell 27: Beregnet ME (%) for kortison og kortisol i overflateslim.

Analytt	ME (%)
Kortison	98
Kortisol	98

Her ble oppnådd R²-verdi på to av tre analyser ≤ 0,97 i overflateslim. Dette viste dårligere linearitet ved ekstern kalibrering. Beregnet ME (%) for kortison og kortisol ble 98 %. Denne verdien er tilnærmet 100 % og ut fra dette ble ingen matrikseffekt påvist (Dash, Das et al. 2018, Geffroy 2018, Ivanova, Rangel-Huerta et al. 2021).

Måleusikkerhet

Metodens utvidede usikkerhet i overflateslim ble beregnet basert på metodens reproduserbarhet (u^2_{RW}) og metodens usikkerhetskomponenter for bias (u^2_{Bias}) som ga metodens kombinerte måleusikkerhet (u_c) vist i Tabell 28.

Tabell 28: Metodens utvidede måleusikkerhet (U), metodens reproduserbarhet (u^2_{RW}), usikkerhet for bias (u^2_{Bias}) og metodens kombinerte måleusikkerhet (u_c) i overflateslim.

Analytt	u^2_{RW} (%)	u^2_{Bias} (%)	u_c (%)	U (%)
Kortison	21	3,1	4,9	10
Kortisol	50	3,4	7,3	15

Før metodens utvidede usikkerhet kunne beregnes måtte metodens bias beregnes for å vurdere om bias var signifikant. Dette ble beregnet ved hjelp av en tosidig Student T-test og sammenliknet med t-verdi med 9 frihetsgrader og 90 % konfidensintervall. Konklusjonen fra dette ble at bias for metoden ikke ble signifikant for kortison, men bias ble signifikant for kortisol.

Fordi bias ble signifikant for kortisol bør dette kompenseres for ved korreksjon. Ved en gjennomgang av data som ble inkludert i beregningen av utvidet måleusikkerhet er det gjenfinningen (%) dvs. metodens riktighet som avviker ved en trend der verdier konsekvent ligger under sann verdi. Korreksjon ble ikke gjort i dette tilfellet fordi det er for lite data å konkludere ut fra, samt at analysen ble gjennomført av en person på relativt kort tid. Ideelt bør denne analysen utføres ved flere personer ved lengre tid for å få et mer riktig bilde av trenden. En annen faktor er at det ikke ble benyttet sertifisert referansemateriale for gjenvinningsforsøkene (%) for bestemmelse av metodens riktighet.

u^2_{RW} for kortison og ble bestemt til 21 %. u^2_{Bias} ble bestemt til 3,1 %. Dette resulterte i en utvidet usikkerhet på 10 %. Det ble vurdert til lav usikkerhet for kortison for kvantitative analyser i overflateslim. For kortisol ble u^2_{RW} bestemt til 50 %, u^2_{Bias} ble bestemt til 3,4 % og metodens utvidede usikkerhet ble bestemt til 15 %. Det kan være flere bidrag av feilkilder som kunne ført til økt måleusikkerhet. ISTD vil kompensere for flere mulige feilkilder, blant annet væske-væske-ekstraksjon, fordamping av prøvene, injeksjonsvolum og ionisering for å nevne noen få eksempler. Men det kunne likevel ha oppstått feilkilder som ISTD ikke kan kompensere for, eksempelvis utilstrekkelig homogenisering av prøvene før en aliquot av prøven ble pipettert ut, kontamineringer av prøven, feil i volum ved tilsetning av ISTD til prøven eller uforsiktig pipettering av den øverste fasen under væske-væske-ekstraksjonen som noen få eksempler. For alle prøvematrikser var det kritisk at prøven var representativ og analytt var jamt fordelt i aliquoten som ble tatt ut.

4.2.3 Metodevalidering for fiskeskjell

Linearitet

Metodens linearitet for kvantifiseringen av kortison og kortisol i fiskeskjell ble vurdert etter beregnet R²-verdi basert på matriksassisterte standardkurver løst i ekstrahert fiskeskjell som vist Tabell 29.

Tabell 29: Beregnet R²-verdi som ble basert på standarder løst i fiskeskjellekstrakt og beregnet etter intern standard metode med $\frac{1}{x}$ -vektning.

Analytt	R ² -verdi
Kortison	0,999
	0,999
	0,999
Kortisol	0,999
	0,999
	0,999

For fiskeskjell ble samtlige R²- verdier $\geq 0,99$, hvilket som tilsvarer svært god linearitet for kvantitative analyser i fiskeskjell.

LOD og LOQ

LOD og LOQ ble beregnet fra SD av responsen i form av areal og stigningstall fra en matriksassistert kalibreringskurve ved hjelp av regresjon. Beregnet LOD og LOQ vist i Tabell 30.

Tabell 30: Beregnet LOD og LOQ (ng/g) basert på stigningstall og standardavvik til standardkurvene fra ekstern kalibrering ved hjelp av matriksassisterende standarder.

Analytt	Stigningstall	SD	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Kortison	2.83E+05	6.16E+05	0,18	0,62
Kortisol	2.20E+05	2.79E+05	0,11	0,36

Beregnet resultat av LOD av kortison og kortisol ble henholdsvis beregnet til 0,18 ng/g og til 0,11 ng/g. Beregnet LOQ for kortison og kortisol ble henholdsvis beregnet til 0,62 ng/g og til 0,36 ng/g.

Ved sammenlikning med tilsvarende studier utført på humant hår (Binz, Gaehler et al. 2018) ble LOD for både kortison og kortisol beregnet til 0,5 ng/g, og LOQ ble beregnet til 1,0 ng/g. Studien fra Binz et al. ga tilnærmet lik LOD og LOQ for begge analyttene sammenliknet med LOD og LOQ oppnådd med denne metoden. Binz et al. benyttet en UFLC (ultra rask- væske-kromatografi), Shimadzu, Kyoto, Japan) koplet til et trippel- kvadrupol massespektrometer (QTRAP 6500, Sciex™, Darmstadt, Germany) via ESI (Sciex™, Darmstadt, Germany). Analyttmolekylene ble detektert i MRM-modus. LOD og LOQ ble definert ut fra et S/N- forhold på 3:1 og 10:1. Studier utført på humant hår ble benyttet grunnet mangelfulle valideringsstudier utført på fiskeskjell. Humant hår vil i likhet med fiskeskjell akkumulere analytt over tid, og potensielt kunne gi en indikasjon på kronisk stress (Binz, Gaehler et al. 2018).

Matrikseffekter

Matrikseffekter (%) i fiskeskjell ble beregnet fra stigningstallene til kalibreringskurvene basert på standarder løst i fiskeskjellekstrakt og kalibreringskurvene fra standarder løst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v). Til dette ble det benyttet ekstern kalibrering, og kurvene ble $\frac{1}{x}$ - vektet. Tabell 31 oppsummerer beregnet R² – verdi og stigningstall for matriksassistert kalibreringskurve i fiskeskjell og 90 % MeOH/vann (9:1, v/v).

Tabell 31: Beregnet R²-verdi og stigningstall for matriksassisterte kalibreringskurver i fiskeskjell og 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) for kortison og kortisol R²-verdi og stigningstall ble beregnet ut fra $\frac{1}{x}$ – vektete eksterne kalibreringskurver ved hjelp av programvaren Xcalibur.

Kortison				Kortisol			
R ² Skjell	Stigningstall Skjell	R ² 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	Stigningstall 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	R ² Skjell	Stigningstall Skjell	R ² 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)	Stigningstall 90 % MeOH/vann (9:1, v/v)
R ² = 0,999	2.46E+05	R ² = 0,998	2.25E+05	R ² = 0,998	2.14E+05	R ² = 0,998	2.44E+05
R ² = 0,996	2.69E+05	R ² = 0,998	2.17E+05	R ² = 0,995	1.99E+05	R ² = 0,999	2.25E+05
R ² = 0,999	3.45E+05	R ² = 0,998	2.77E+05	R ² = 0,999	2.62E+05	R ² = 0,999	2.87E+05

R²- verdien ble benyttet for å vurdere kvaliteten til kalibreringskurvene. Tabell 32 viser beregnet ME (%) for kortison og kortisol i fiskeskjell.

Tabell 32: Beregnet ME (%) for kortison og kortisol i fiskeskjell.

Analytt	ME (%)
Kortison	120
Kortisol	89

Beregnet ME (%) for kortison og kortisol ble henholdsvis ble 120 % og 89 %. Basert på disse resultatene ble det konkludert at det oppstod matrikseffekter som en økning i signal for kortison fordi ME (%) > 100, og hemming i signal for kortisol fordi ME (%) < 100. Ved sammenlikning med tilsvarende studier fra humant hår (Binz, Gaehler et al. 2018) ble det konkludert med at matrikseffekter også fant sted i form av hemming i signal for begge analyttene. Dette tyder på at det er en eller flere komponenter som ko-eluerer med analytt av interesse i fiskeskjellene. Matrikseffekten som oppstod vil kompenseres for ved hjelp av ISTD (Binz, Gaehler et al. 2018).

Riktighet

For plasma og overflateslim ble blant annet metodens riktighet inkludert i beregning av metodens utvidede måleusikkerhet. For fiskeskjell ble riktighet utført ved gjenvinningsforsøk (%) som er vist i Tabell 33.

Tabell 33: Beregnet gjenvinning (%) i fiskeskjell.

Nivå: 10 ng/mL	Gjenvinning (%)	
	Kortison	Kortisol
	74- 89	71- 92

Akseptabel verdi for gjenvinning (%) ble bestemt til 70- 120 %. Ut fra Tabell 33 ble gjenvinning (%) beregnet til 74- 89 % for kortison, og 71- 92 % for kortisol. Begge analytter ble innenfor bestemt intervall. Dette indikererte at det er mulig å få pålitelige resultater ved kvantitative analyser av fiskeskjell (Scientific 2016).

4.2.4 Korrelasjon mellom LC-HRMS og ELISA

Som en del av masteroppgaven var det av interesse å undersøke om analyseresultater fra LC-HRMS korrelerte med ELISA. LC-HRMS har gradvis erstattet ELISA ettersom det kan oppstå kryssreaksjoner med kortison og andre steroider i prøven. Korrelasjon mellom ELISA og LC-HRMS, samt konsentrasjon av kortisol fra samme individ ble undersøkt for plasmaprøver og overflateslimprøver.

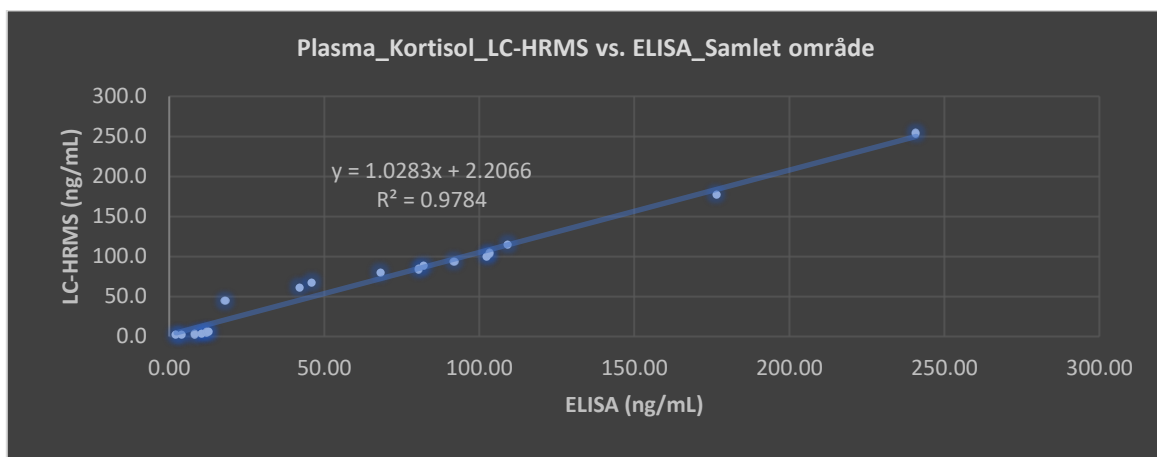
Korrelasjon i plasma

En prøveserie av plasma ble inndelt i lavt, middels og høyt område basert på beregnet konsentrasjon fra en tidligere analyse med ELISA. Dette ble gjennomført for å undersøke korrelasjonen ved lave, middels og høye konsentrasjoner av analytt. Korrelasjonen mellom analyseresultater fra ELISA og LC-HRMS er vist i Tabell 34. ELISA kan kun kvantifisere kortisol og derfor er korrelasjon med hensyn på kun denne analytten beregnet.

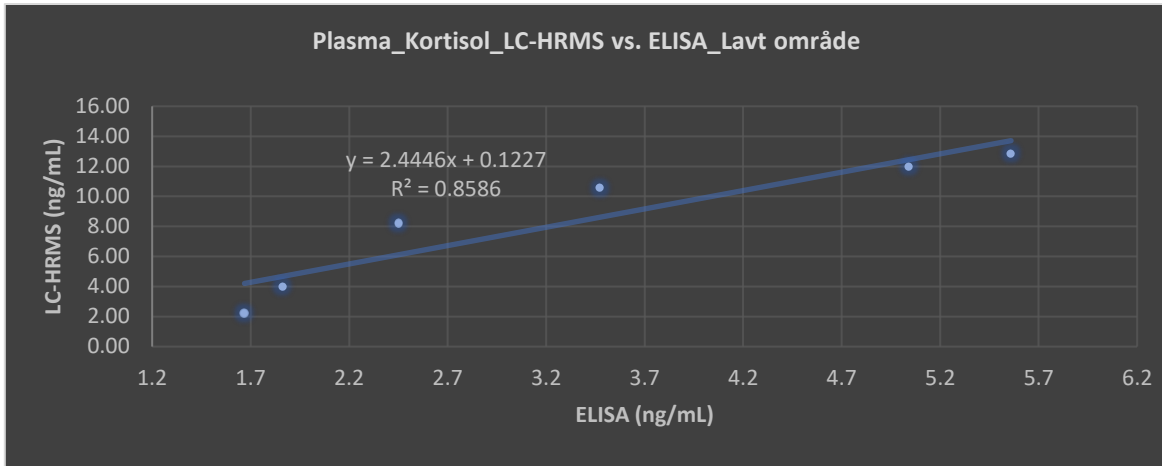
Tabell 34: Beregnet Pearsons korrelasjonsfaktor (r) mellom analyseresultat fra ELISA og LC-HRMS i plasma.

Analytt	Pearsons korrelasjonsfaktor (r)			
	Lavt område	Middels område	Høyt område	Hele området
Kortisol	0,86	1,0	0,98	0,99

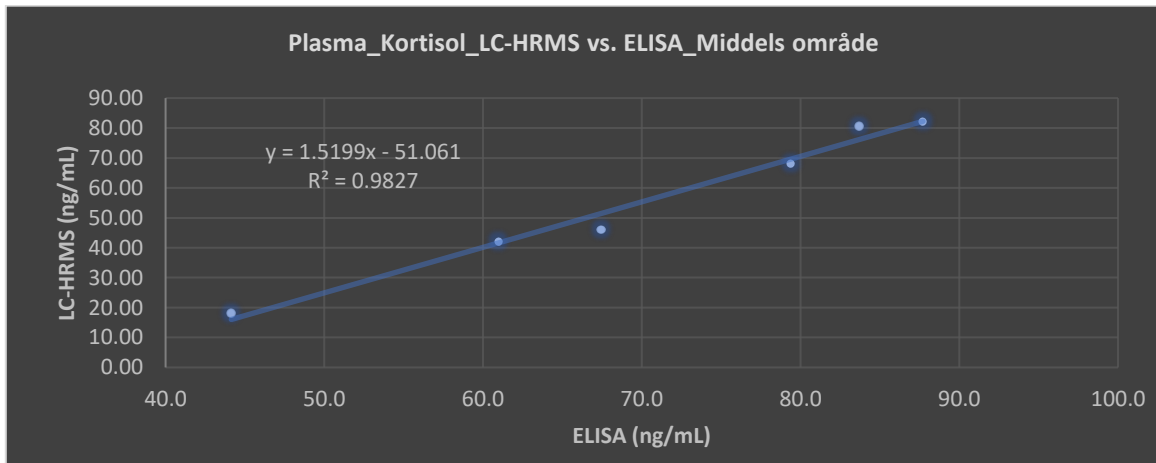
Av Tabell 34 ble beregnet korrelasjonsfaktor r for hele området 0,99. Grad av korrelasjon ble vurdert etter Tabell 1, som tilsier svært høy positiv korrelasjon av prøveresultat fra LC-HR og ELISA (Mukaka 2012). Lineariteten er vist i Figur 34 med bestemmelseskoefisient $R^2 = 0,9784$. Ved inndeling til lav, middels og høyt området ble samtlige r -verdier vurdert som høy til svært høy korrelasjon. Lineariteten er vist i Figur 35, Figur 36 og Figur 37 for lavt, middels og høyt område. Bestemmelseskoefisienten ble henholdsvis $R^2 = 0,8586$, $R^2 = 0,9827$ og $R^2 = 0,9968$.



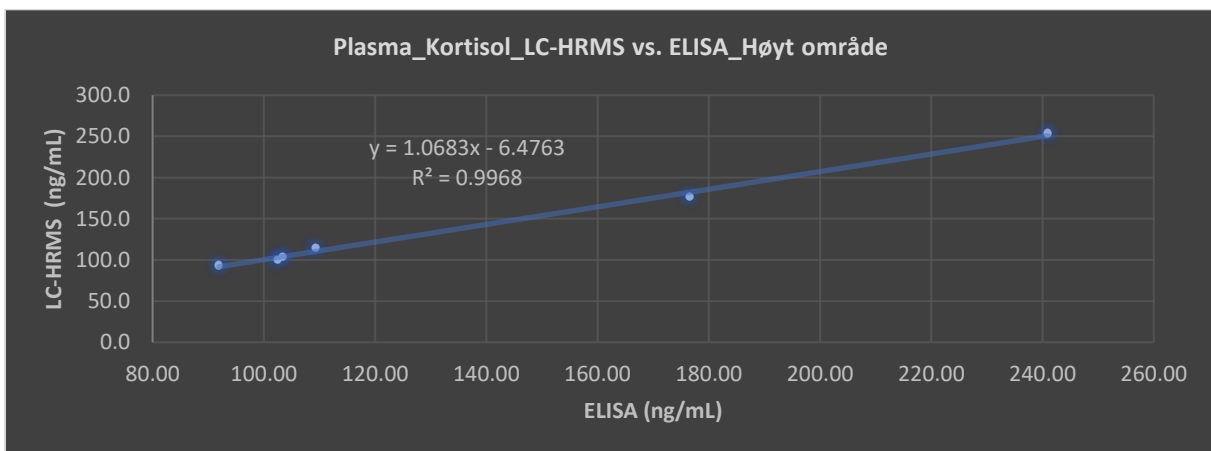
Figur 34: Grafisk oversikt over analyseresultat i plasma fra ELISA (ng/mL) plottet mot analyseresultat fra LC-HRMS (ng/mL) i hele området.



Figur 35: Grafisk oversikt over analyseresultat i plasma oppnådd med ELISA (ng/mL) plottet mot analyseresultat oppnådd med LC-HRMS (ng/mL) i lavt område.



Figur 36: Grafisk oversikt over analyseresultat i plasma fra ELISA (ng/mL) plottet mot analyseresultat fra LC-HRMS (ng/mL) i middels område.



Figur 37: Grafisk oversikt over analyseresultat i plasma fra ELISA (ng/mL) plottet mot analyseresultat fra LC-HRMS (ng/mL) i høyt område.

Det ble også undersøkt om det var signifikant forskjell i resultater oppnådd fra ELISA og LC-HRMS ved hjelp av en Student T-test med tosidig fordeling med to utvalg som antar ulik varians. Resultatet av Student T-testene konkluderte med at det ikke var signifikant forskjell i resultatene. I det lave området ble analyseresultat < LOQ inkludert for å få tilstrekkelig data i det aktuelle området. Analyseresultat < LOQ skal ideelt ikke rapporteres.

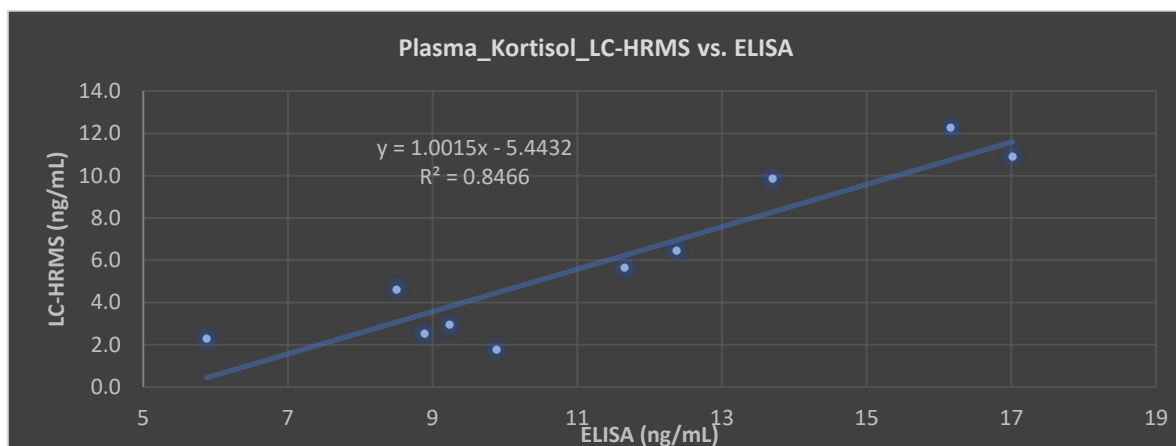
Korrelasjon i overflateslim og plasma fra smitteforsøk

Korrelasjonen mellom analyseresultater fra ELISA og LC-HRMS for plasma og overflateslim er vist i Tabell 35. Prøvetaking ble utført på overlevende laks smittet med bakterien *Pasteurella skyensis*.

Tabell 35: Beregnet Pearsons korrelasjonsfaktor (r) mellom analyseresultat fra ELISA og LC-HRMS i plasma og overflateslim av prøver fra overlevende fisk fra ut tidligere utført smitteforsøk. .

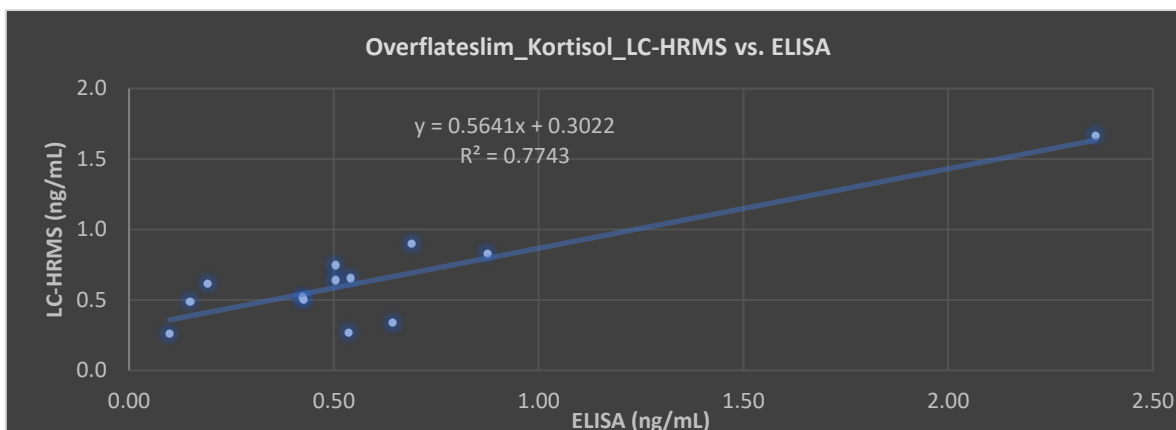
Analytt	Pearsons korrelasjonsfaktor (r)	
	Plasma	Overflateslim
Kortisol	0,92	0,88

Beregnet r-verdi ble 0,92 for plasma, og dette ble vurdert som veldig høy positiv korrelasjon (Tabell 1). Lineariteten er vist i Figur 38 med bestemmelseskoefisient $R^2 = 0,8466$.



Figur 38: Grafisk oversikt over analyseresultat fra ELISA (ng/mL) plottet mot analyseresultat fra LC-HRMS (ng/mL) for plasma.

Beregnet r-verdi ble 0,88 for overflateslim, og dette ble vurdert som høy positiv korrelasjon (Tabell 1). Lineariteten er vist i Figur 39 med bestemmelseskoefisient $R^2 = 0,7743$.



Figur 39: Grafisk oversikt over analyseresultat fra ELISA (ng/mL) plottet mot analyseresultat fra LC-HRMS (ng/mL) for overflateslim.

Det ble undersøkt om det var signifikant forskjell i resultater oppnådd fra ELISA og LC-HRMS ved hjelp av en Student T-test med tosidig fordeling med to utvalg som antar ulik varians. Resultatet av Student T-testen konkluderte med at det ikke var signifikant forskjell i resultatene mellom ELISA og LC-HRMS (Tabell 1). Det ble dermed konkludert med god korrelasjon for plasma og overflateslim ved analyser utført med ELISA og LC-HRMS. Resultater < LOQ ble inkludert for å få nok prøvedata.

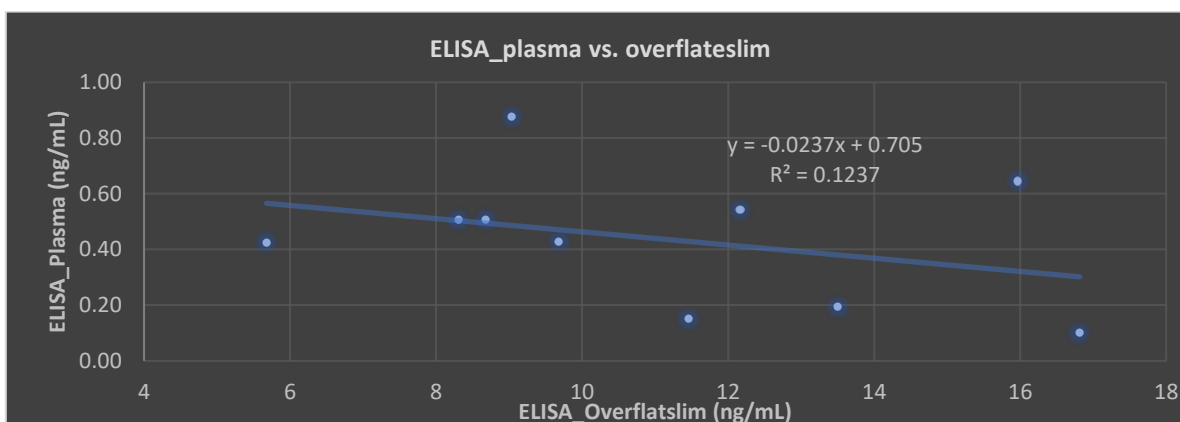
Korrelasjon mellom samme individ med ELISA og LC-HRMS

Det var også av interesse å undersøke om det var korrelasjon mellom plasma og overflateslim fra samme individ ved ELISA og LC-HRMS (Tabell 36).

Tabell 36: Beregnet Pearsons korrelasjonsfaktor (r) for ELISA og LC-HRMS når analyseresultater fra matriksene plasma plottes mot overflateslim.

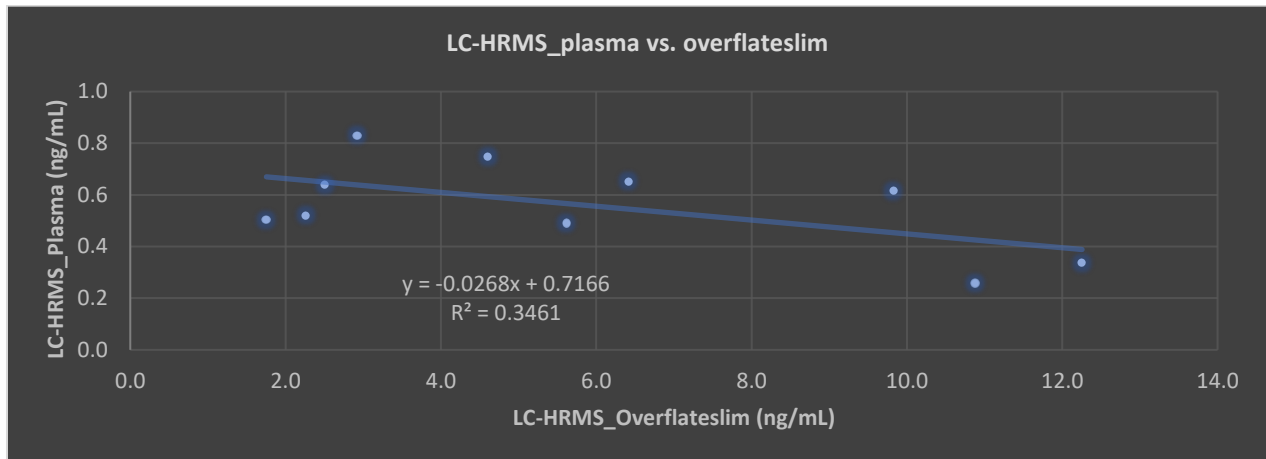
Pearsons korrelasjonsfaktor (r)		
Analytt	ELISA	LC-HRMS
Kortisol	-0,35	-0,59

Beregnet r-verdi ble – 0,35 for plasma, og dette ble vurdert som lav negativ korrelasjon (Tabell 1). Lineariteten er vist i Figur 40 med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,1237$.



Figur 40: Grafisk oversikt over analyseresultater fra analysert overflateslim plottet mot analyseresultater fra analysert plasma ved hjelp av ELISA (ng/mL) for å undersøke korrelasjonen mellom to ulike matrikser, fra samme individer analysert med samme metode.

Beregnet r-verdi ble – 0,59 for overflateslim, og dette ble vurdert som moderat negativ korrelasjon (Tabell 1). Lineariteten er vist i Figur 41 med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,3461$.



Figur 41: Grafisk oversikt over analyseresultater fra analysert overflateslim plottet mot analyseresultater fra analysert plasma ved hjelp av LC-HRMS (ng/mL) for å undersøke korrelasjonen mellom to ulike matrikser, fra samme individer analysert med samme metode.

Tilsvarende studier har bekreftet god korrelasjon av kortisol mellom plasma og overflateslim, i tillegg til andre matrikser som fordøyelsesorganer, muskelvev og finner (Bertotto, Poltronieri et al. 2010). I denne oppgaven ble undersøkelse av korrelasjon basert på få prøver og lav prøvemengde som kunne ført til at korrelasjonsdataene ikke oppnådde samme konklusjon som denne studien.

4.3 Videre arbeid

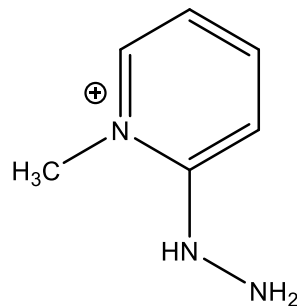
Ved den instrumentelle metodeutviklingen ble flere komponenter testet, blant annet mobilfasegradient, mobilfasesammensetning, ekstraksjonsmiddel og derivatisering. Som en naturlig del av den instrumentelle metodeutviklingen hadde det vært av interesse utvide testingen med blant annet sammenlikning av flere mobilfasesammensetninger, eksempelvis vann og acetonitril tilsatt en flyktig buffer eller syre som ble benyttet under en studie som involverte analyse av kortison og kortisol (Fariha, Jabrah et al. 2022). Fariha et al. 2020 konkluderte med at vann og acetonitril ga et høyere signal sammenliknet med vann (A) og MeOH (B), begge med maursyre (0,1 %, v/v), men kortison og kortisol har bedre løselighet i MeOH sammenliknet med acetonitril (Bakusic, De Nys et al. 2019, Liu, Zhang et al. 2019, Fariha, Jabrah et al. 2022).

Ved testing av flere mobilfasegradienter kunne også analysetiden potensielt blitt kortere sammenliknet med hva som ble oppnådd med denne metoden (Alvi and Hammami 2019).

Det hadde også vært interessant teste flere løsemidler for å prøve å ekstrahere mer analytt fra matriks, eksempelvis med n-butanol, diklormetan, heksan, eter eller en egnet blanding av to forskjellige løsemidler, eksempelvis n-butanol (10 %) i MTBE. Flere typer homogeniseringsteknikker av fiskeskjell kunne også vært nyttig å teste. Her ble det utprøvd homogenisering ved hjelp av flytende nitrogen etterfulgt av knusing med morter. Studier har eksempelvis benyttet kulemølle for effektiv knusing av fiskeskjell til pulver (Geffroy 2018), eller en mekanisk stav-homogenisator (Laberge, Yin-Liao et al. 2019). I dette tilfellet ble blender kombinert med klipping av saks det beste alternativet ut fra tilgjengelig utstyr, og for bedre homogenisering. Andre prøveopparbeidingsteknikker som inkluderer SPE eller SPME (solid fase mikroekstraksjon) hadde også vært av interesse å undersøke.

For raskere og bedre separasjon ved væske- væske ekstraksjon kunne garvesyre (10 mg/mL) blitt benyttet ved ekstraksjonen. Bedre LOD og LOQ kunne også blitt oppnådd ved bedre rutine ved den praktiske utførelsen (Clench and Tetler 2000, Dziurkowska and Wesolowski 2009, Beretov, Wasinger et al. 2014, Nadarajah, Skadberg et al. 2017)

Det hadde også vært hensiktsmessig og utforske derivatisering i større grad fordi det ikke ble oppnådd tilstrekkelig økning i signal ved bruk av GRT og 2-HP ved denne metoden. Det eksisterer flere derivasjonsreagenser som kunne vært nyttig å teste, blant annet 2-hydrazino-1-metylpyridin (HMP). Dette reagenset ligner strukturelt 2-HP men har en metylgruppe på N-atomet som vist i Figur 42. Den funksjonelle gruppen som innføres på analytt ved reaksjon på ketogruppen er et metylpyridin. I en studie utført på humant spytt (Magda, Dobi et al. 2017) ved HMP-derivasjon ble metodens sensitivitet økt 1000 ganger for kortison og kortisol. Studien fra Magda et al. 2017 benyttet et LC-system (Perkin Elmer Serie 200 mikro LC, Massachusetts, USA) koplet til et trippel-kvadrupol massespektrometer (QTRAP 6500, AB Sciex, CA, USA) via en Turbo V ESI.



Figur 42: 2-Hydrazino-1-metylpyridin (HMP) (Magda, Dobi et al. 2017). Skissen er tegnet ved hjelp av ChemDraw Prime.

Ved validering hadde det vært en fordel å inkludere flere valideringsverktøy som matriksblank, referansematerialer (inkludert SRM hvis dette er tilgjengelig) og delta i SLP. Flere parametere kunne også ha blitt inkludert i valideringen, eksempelvis selektivitet og robusthet. Ved bestemmelse av metodens selektivitet bestemmes sannsynlige interferenser med analytt som har liknende egenskaper som analytt i matriks. I kromatografiske analyser vil det bekreftes at toppen i kromatogrammet ikke består av andre komponenter og kun analytt av interesse. Metodens robusthet er metodens evne til å ikke bli påvirket av små endringer som utføres i metoden. Dette vil gi en indikasjon på metodens pålitelighet under bruk (Akkreditering 2021).

Det hadde også vært nyttig å inkludere flere matrikser for å undersøke korrelasjon mellom disse. Her kunne både invasive og ikke-invasive matrikser blitt inkludert. For invasive metoder kunne hele fisker, egg eller finner blitt utviklet. Bruk av hel fisk hadde fastslått konsentrasjonen av kortison og kortisol på et nøyaktig individuelt nivå som kan inkludere basale og høye nivåer av analytt ved en stressfaktor. Dette er derimot matrikser som krever at fisken avlives og er metoder som er invasive. Finner kunne også blitt benyttet for dette, fordi sammenliknet med bruk av hel fisk eller egg er bruk av finner betegnet som mindre invasive. Det er likevel nødvendig å ta en del av laksen for å innhente finnen. Fokuset i dag er bestemmelse av stress ut fra mindre invasive metoder. Ett eksempel på dette er bruk av avføring eller vann som matriks.

Forskning (Geffroy 2018) viser at konsentrasjon av kortisol i avføring korrelerer med plasma. Det kreves derimot høy prøvemengde, og denne matriksen gir ikke en god indikasjon på akutt stress fordi det tar noe tid før analytt utskilles i denne matriksen. Vann er en matriks som betegnes som den minst invasive prøvetakingsmetoden. Denne matriksen kan derimot inneholde lave konsentrasjoner av analytt, i tillegg til at det er vanskelig å evaluere stress på et individuelt nivå. Kortison og kortisol som er løst i vannet kan også bli tatt opp av fisk som svømmer i vannet (Geffroy 2018).

5 Konklusjon

Hovedmålet med denne masteroppgaven var å utvikle og validere en metode for kvantitative analyser av kortison og kortisol med LC-HRMS for vurdering av stress i Atlanterhavslaks (*Salmo salar*). Oppgaven inkluderer også analyser gjennomført ved hjelp av ELISA for å sammenlikne hvordan analyseresultat oppnådd med LC-HRMS og ELISA korrelerer. Plasma har lenge blitt benyttet for å evaluere stress, men i den senere tid har det blitt større fokus på dyrevelferd hos Atlanterhavslaks ved å benytte mindre invasive metoder for prøvetaking. I denne oppgaven ble det utviklet metoder for kvantitative analyser i plasma, overflateslim og delvis for fiskeskjell.

Ut fra metodeutviklingen ble adduksjonen $[M+H]^+$ benyttet for identifisering og kvantifisering av kortison og kortisol. Egnede mobilfasegradienter ble bestemt til 35 % mobilfase A og 65 % mobilfase B. Mobilfasesammensetningen ble bestemt til vann og MeOH med maursyre (0,1 %; v/v). Egnede ekstraksjonsmidler av analytt ble metyl tert-butyleter (MTBE) ved væske-væske ekstraksjon. Det ble utført forsøk med derivatisering med Girards reagens T (GRT) og 2-hydrazinopyridine (2-HP), men det ble ikke oppnådd tilstrekkelig økning i signal. Derivatisering av analytt ble derfor frafalt.

Validering av metode for plasma konkluderte med god linearitet $R^2 \geq 0,97$ for begge analytter. LOD ble bestemt til 2,1 ng/mL og 2,3 ng/mL for henholdsvis kortison og kortisol. LOQ ble bestemt til 7,1 ng/mL og 7,7 ng/mL for henholdsvis kortison og kortisol. Det ble ikke påvist matrikseffekter i plasma. Utvidet måleusikkerhet ble beregnet til 8,0 % for kortison og 9,0 % for kortisol. Validering av metode for overflateslim konkluderte med god linearitet på $R^2 \geq 0,97$ for begge analytter. LOD ble bestemt til 2,9 ng/mL og 1,8 ng/mL for henholdsvis kortison og kortisol. LOQ ble bestemt til 9,6 ng/mL og 6,0 ng/mL for henholdsvis kortison og kortisol. Det ble ikke påvist matrikseffekter i overflateslim. Utvidet måleusikkerhet ble beregnet til 10 % for kortison og 15 % for kortisol. Validering av metode for fiskeskjell konkluderte med god linearitet på $R^2 \geq 0,97$ for begge analytter av interesse. LOD ble bestemt til 0,18 ng/g og 0,11 ng/g for henholdsvis kortison og kortisol. LOQ ble bestemt til 0,62 ng/g og 0,36 ng/g for henholdsvis kortison og kortisol. Det ble påvist matrikseffekter i form av økning av signal for kortison og hemming i signal for kortisol. Gjenfinning (%) ble bestemt til 74- 89 % for kortison og 71- 92 % for kortisol.

Det ble konkludert med høy, positiv korrelasjon mellom LC-HRMS og ELISA i matriksene plasma og overflateslim. Det ble oppnådd lav, negativ korrelasjon mellom samme individ analysert med ELISA, og moderat, negativ korrelasjon mellom samme individ analysert med LC-HRMS.

6 Litteraturliste

- (NMKL), N. C. o. F. A. (2019). Estimation and expression of measurement uncertainty in chemical analysis, No. 5 NMKL.
- Akkreditering, K. S. f. N. (2021). Validering av laboratoriemetoder i henhold til NS ISO/IEC 17025:2017, ISO 15189:2012, Webinar- Kurs.
- Akkreditering, N. from <https://www.akkreditert.no/kundeside/laboratorier22/>.
- Alsop, D. and N. Aluru (2011). THE PITUITARY | Development of the Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis. Encyclopedia of Fish Physiology. A. P. Farrell. San Diego, Academic Press: 1450-1456.
- Alvi, S. N. and M. M. Hammami (2019). "A Simple Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Measurement of Cortisol Level in Human Saliva." International journal of analytical chemistry **2019**: 4909352-4909352.
- Anitescu, M., H. T. Benzon and R. Variakojis (2014). 44 - Pharmacology for the Interventional Pain Physician. Practical Management of Pain (Fifth Edition). H. T. Benzon, J. P. Rathmell, C. L. Wu et al. Philadelphia, Mosby: 596-614.e594.
- Antonelli, G., F. Ceccato, C. Artusi, M. Marinova and M. Plebani (2015). "Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome." Clinica Chimica Acta **451**: 247-251.
- Bakusic, J., S. De Nys, M. Creta, L. Godderis and R. C. Duca (2019). "Study of temporal variability of salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS using a new atmospheric pressure ionization source." Scientific Reports **9**(1): 19313.
- Barton, B. A. (2002). "Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids1." Integrative and Comparative Biology **42**(3): 517-525.
- Barton, B. A. and G. K. Iwama (1991). "Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids." Annual Review of Fish Diseases **1**: 3-26.
- Beck, O., A. Rylski and N. N. Stephanson (2019). Chapter 23 - Application of Liquid Chromatography Combined With High Resolution Mass Spectrometry for Urine Drug Testing. Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing (Second Edition). A. Dasgupta, Academic Press: 321-332.
- Beretov, J., V. C. Wasinger, P. H. Graham, E. K. Millar, J. H. Kearsley and Y. Li (2014). Chapter Four - Proteomics for Breast Cancer Urine Biomarkers. Advances in Clinical Chemistry. G. S. Makowski, Elsevier. **63**: 123-167.
- Bernier, N. J., G. Flik and P. H. Klaren (2009). "Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and thyrotropic axes to the stress response in fishes." Fish physiology **28**: 235-311.
- Bertotto, D., C. Poltronieri, E. Negrato, D. Majolini, G. Radaelli and C. Simontacchi (2010). "Alternative matrices for cortisol measurement in fish." Aquaculture Research **41**(8): 1261-1267.
- Binz, T. M., F. Gaehler, C. D. Voegel, M. Hofmann, M. R. Baumgartner and T. Kraemer (2018). "Systematic investigations of endogenous cortisol and cortisone in nails by LC-MS/MS and correlation to hair." Analytical and Bioanalytical Chemistry **410**(20): 4895-4903.
- Brown, L. A. (1988). "Anesthesia in Fish." Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **18**(2): 317-330.
- Carbajal, A., F. E. Reyes-López, O. Tallo-Parra, M. Lopez-Bejar and L. Tort (2019). "Comparative assessment of cortisol in plasma, skin mucus and scales as a measure of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis activity in fish." Aquaculture **506**: 410-416.
- Clench, M. R. and L. W. Tetler (2000). CHROMATOGRAPHY: GAS | Detectors: Mass Spectrometry. Encyclopedia of Separation Science. I. D. Wilson. Oxford, Academic Press: 448-455.
- Conde-Sieira, M., M. Chivite, J. M. Míguez and J. L. Soengas (2018). "Stress Effects on the Mechanisms Regulating Appetite in Teleost Fish." Frontiers in Endocrinology **9**(631).
- Dash, S., S. K. Das, J. Samal and H. N. Thatoi (2018). "Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review." Iranian journal of veterinary research **19**(2): 72-81.

De Mercado, E., A. M. Larrán, J. Pinedo and C. Tomás-Almenar (2018). "Skin mucous: A new approach to assess stress in rainbow trout." *Aquaculture* **484**: 90-97.

Develosil. (2021). "What Is C18? A Guide on the Basics of HPLC Columns." Retrieved 21/02/2022, 2022, from <https://develosil.us/what-is-c18-a-guide-on-the-basics-of-hplc-columns/>.

Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach, 3rd Edition*. West Sussex, United Kingdom, John Wiley & Sons Ltd.

Dolan, J. (2009). "Calibration Curves, Part V: Curve Weighting." *LCGC North America* **27**(7): 534–540.

Dong, M. W. and K. Zhang (2014). "Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **63**: 21-30.

Dr. Jens Atzrodt, D. V. D., Prof. Dr. William J. Kerr, Dr. Marc Reid (2017). "Deuterium- and Tritium-Labelled Compounds: Applications in the Life Sciences."

Duxbury, K., L. Owen, S. Gillingwater and B. Keevil (2008). "Naturally occurring isotopes of an analyte can interfere with doubly deuterated internal standard measurement." *Ann Clin Biochem* **45**(Pt 2): 210-212.

Dziurkowska, E. and M. Wesolowski (2009). "Evaluation of Two Techniques for Extraction of Cortisol from Human Saliva." *Chromatographia* **70**: 769-774.

Edmond de Hoffmann, V. S. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition*. West Sussex, England, John Wiley & Sons Ltd,.

Einarsdóttir, I. E. and K. J. Nilssen (1996). "Stress responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) elicited by water level reduction in rearing tanks." *Fish Physiology and Biochemistry* **15**(5): 395-400.

El-Farhan, N., D. A. Rees and C. Evans (2017). "Measuring cortisol in serum, urine and saliva – are our assays good enough?" *Annals of Clinical Biochemistry* **54**(3): 308-322.

Fariha, R., M. Jabrah, C. Hill, A. Spooner, P. Deshpande and A. Tripathi (2022). "Simultaneous detection of salivary cortisol and cortisone using an automated high-throughput sample preparation method for LC-MS/MS." *SLAS Technology*.

Fast, M. D., S. Hosoya, S. C. Johnson and L. O. B. Afonso (2008). "Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress." *Fish & Shellfish Immunology* **24**(2): 194-204.

Flik, G., P. H. Klaren, E. H. Van den Burg, J. R. Metz and M. O. Huising (2006). "CRF and stress in fish." *Gen Comp Endocrinol* **146**(1): 36-44.

Forthofer, R. N., E. S. Lee and M. Hernandez (2007). 13 - Linear Regression. *Biostatistics (Second Edition)*. R. N. Forthofer, E. S. Lee and M. Hernandez. San Diego, Academic Press: 349-386.

Geffroy, B. S. B. (2018). "Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes." *Journal of fish biology*.

Gharbi, K., L. Matthews, J. Bron, R. Roberts, A. Tinch and M. Stear (2015). "The control of sea lice in Atlantic salmon by selective breeding." *Journal of the Royal Society Interface* **12**(110): 20150574.

Glish, G. L. and D. J. Burinsky (2008). "Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**(2): 161-172.

Hansen, Y. B. L. (2019). "Recommendations on Measurement Units - Why and How." *EJIFCC* **30**(3): 250-275.

Havforskningsinstituttet. (2019). "Laks i oppdrett." Retrieved 04/03/2022, 2022, from <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks/laks-i-oppdrett>.

Havforskningsinstituttet. (2022). "Tema: Fiskevelferd." from <https://www.hi.no/hi/temasider/akvakultur/fiskevelferd>.

He, Y. (2012). 3.41 - Liquid-Based Microextraction Techniques for Environmental Analysis. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. J. Pawliszyn. Oxford, Academic Press: 835-862.

Ho, C. S., C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suen and H. L. Tai (2003). "Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications." *The Clinical biochemist. Reviews* **24**(1): 3-12.

Ivanova, L., O. D. Rangel-Huerta, H. Tartor, M. C. Gjessing, M. K. Dahle and S. Uhlig (2021). "Fish Skin and Gill Mucus: A Source of Metabolites for Non-Invasive Health Monitoring and Research." *Metabolites* **12**(1): 28.

Iversen, A., F. Asche, Ø. Hermansen and R. Nystøyl (2020). "Production cost and competitiveness in major salmon farming countries 2003–2018." *Aquaculture* **522**: 735089.

Iversen, M. and R. A. Eliassen (2009). "The Effect of AQUI-S® Sedation on Primary, Secondary, and Tertiary Stress Responses during Salmon Smolt, *Salmo salar* L., Transport and Transfer to Sea." *Journal of the World Aquaculture Society* **40**(2): 216-225.

Izquierdo-Hornillos, R., R. Gonzalo-Lumbreras and A. Santos-Montes (2005). "Method development for cortisol and cortisone by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate: application to urine samples of rugby players." *J Chromatogr Sci* **43**(5): 235-240.

Jerez-Cepa, I., M. Gorissen, J. M. Mancera and I. Ruiz-Jarabo (2019). "What can we learn from glucocorticoid administration in fish? Effects of cortisol and dexamethasone on intermediary metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **231**: 1-10.

Johansen, I. B., I. G. Lunde, H. Røsjø, G. Christensen, G. E. Nilsson, M. Bakken and Ø. Øverli (2011). "Cortisol response to stress is associated with myocardial remodeling in salmonid fishes." *Journal of Experimental Biology* **214**(8): 1313-1321.

Kacem, A., J.-L. Baglinière and F. Meunier (2013). "Resorption of scales in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during its anadromous migration: A quantitative study." *Cybium: international journal of ichthyology* **37**: 199-206.

Kalamarz-Kubiak, H. (2017). "Cortisol in Correlation to Other Indicators of Fish Welfare."

Ken Broeckhoven, C. G., Dwight R. Stoll (2013). "Understanding Gradient HPLC." *LCGC North America* **31**(7): 578.

Knauer. (2021). "What is the difference between UHPLC and HPLC columns?" Retrieved 06/10/2021, 2021, from <https://www.knauer.net/en/what-is-the-difference-between-uhplc-and-hplc-columns/f19650>.

Kruve, A. and K. Kaupmees (2017). "Adduct Formation in ESI/MS by Mobile Phase Additives." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **28**(5): 887-894.

Kyle, P. B. (2017). Chapter 7 - Toxicology: GCMS. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. H. Nair and W. Clarke. San Diego, Academic Press: 131-163.

Laberge, F., I. Yin-Liao and N. J. Bernier (2019). "Temporal profiles of cortisol accumulation and clearance support scale cortisol content as an indicator of chronic stress in fish." *Conservation physiology* **7**(1): coz052-coz052.

Lankford, S. E., T. E. Adams, R. A. Miller and J. J. Cech, Jr. (2005). "The cost of chronic stress: impacts of a nonhabituating stress response on metabolic variables and swimming performance in sturgeon." *Physiol Biochem Zool* **78**(4): 599-609.

Lee, S., H.-S. Lim, H.-J. Shin, S.-A. Kim, J. Park, H.-C. Kim, H. Kim, H. J. Kim, Y.-T. Kim, K.-R. Lee and Y.-J. Kim (2014). "Simultaneous Determination of Cortisol and Cortisone from Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2014**: 787483.

Li, Y., Z. Yan, X. Li, X. Yin and K. Li (2021). "UPLC-TOF-MS Method for Simultaneous Quantification of Steroid Hormones in Tissue Homogenates of Zebrafish with Solid-Phase Extraction." *Molecules* **26**(20).

Liu, T., C. Zhang, F. Zhang, B. Nie, F. Yuan, H. Huang and H. Li (2019). "Sensitive Determination of Four Polypeptide Antibiotic Residues in Milk Powder by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry." *Chromatographia* **82**(10): 1479-1487.

Lockridge, K. A. (1997). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. New York, USA, Cambridge University Press.

Magda, B., Z. Dobi, K. Mészáros, É. Szabó, Z. Márta, T. Imre and P. T. Szabó (2017). "Charged derivatization and on-line solid phase extraction to measure extremely low cortisol and cortisone levels in human saliva with liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J Pharm Biomed Anal* **140**: 223-231.

Mandy Alhaji, A. F. (2021). "Enzyme Linked Immunosorbent Assay."

Mennitti, C., M. Brancaccio, L. Gentile, A. Ranieri, D. Terracciano, M. Cennamo, E. La Civita, A. Liotti, G. D'Alicandro, C. Mazzaccara, G. Frisso, P. Raffaella, B. Lombardo and O. Scudiero (2020). "Athlete's Passport: Prevention of Infections, Inflammations, Injuries and Cardiovascular Diseases." Journal of Clinical Medicine **9**: 2540.

Mezzullo, M., F. Fanelli, A. Fazzini, A. Gambineri, V. Vicennati, G. Di Dalmazi, C. Pelusi, R. Mazza, U. Pagotto and R. Pasquali (2016). "Validation of an LC-MS/MS salivary assay for glucocorticoid status assessment: Evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol and cortisone and of their association within and between serum and saliva." J Steroid Biochem Mol Biol **163**: 103-112.

Miller, J. M. (2005). CHROMATOGRAPHY, Concepts and Contrasts, Second edition. New Jersey, USA, John Wiley & Sons, Inc.

Mommsen, T., M. Vijayan and T. Moon (1999). "Cortisol in teleost Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation." Reviews in Fish Biology and Fisheries **9**: 211-268.

Mommsen, T. P., M. M. Vijayan and T. W. Moon (1999). "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation." Reviews in Fish Biology and Fisheries **9**(3): 211-268.

Mortier, K. A., G.-F. Zhang, C. H. Van Peteghem and W. E. Lambert (2004). "Adduct formation in quantitative bioanalysis: effect of ionization conditions on paclitaxel." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **15**(4): 585-592.

Mukaka, M. M. (2012). "Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research." Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi **24**(3): 69-71.

Nadarajah, N., Ø. Skadberg, J. Adaway and C. Brede (2017). "Multiplexed analysis of steroid hormones in saliva by LC-MS/MS with 2-hydrazinopyridine derivatization." Clinical Mass Spectrometry **4-5**.

Ney, L. J., K. L. Felmingham, R. Bruno, A. Matthews and D. S. Nichols (2021). "Chloroform-based liquid-liquid extraction and LC-MS/MS quantification of endocannabinoids, cortisol and progesterone in human hair." J Pharm Biomed Anal **201**: 114103.

Norge, S. (2017). "Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriernes kompetanse (ISO/IEC 17025:2017): 44.

Nouri, M.-Z., K. J. Kroll, M. Webb and N. D. Denslow (2020). "Quantification of steroid hormones in low volume plasma and tissue homogenates of fish using LC-MS/MS." General and Comparative Endocrinology **296**: 113543.

Parija, S. C. (2009). Textbook of Microbiology & Immunology. New Delhi, India, Elsevier India.

Patiño, R., J. M. Redding and C. B. Schreck (1987). "Interrenal secretion of corticosteroids and plasma cortisol and cortisone concentrations after acute stress and during seawater acclimation in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)." Gen Comp Endocrinol **68**(3): 431-439.

Pickering, A. D. and T. G. Pottinger (1989). "Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol." Fish Physiol Biochem **7**(1-6): 253-258.

Pottinger, T. G. and T. A. Moran (1993). "Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Journal of Fish Biology **43**(1): 121-130.

Pradhan, D. S., T. K. Solomon-Lane and M. S. Grober (2015). "Contextual modulation of social and endocrine correlates of fitness: insights from the life history of a sex changing fish." Frontiers in Neuroscience **9**.

Proteomics, C. (2021). "Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer." Retrieved 11/10/2021, 2021, from <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>.

Qi, B.-L., P. Liu, Q.-Y. Wang, W.-J. Cai, B.-F. Yuan and Y.-Q. Feng (2014). "Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry." TrAC Trends in Analytical Chemistry **59**: 121-132.

Robert M. Silverstein, F. X. W., David J. Kiemle, David L. Bryce (2005). Mass Spectrometry. In Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th edition. New Jersey, USA, Wiley.

Roque d'orbcastel, E., Y. Bettarel, M. Dellinger, B. Sadoul, T. Bouvier, J. M. Amandé, L. Dagorn and B. Geffroy (2021). "Measuring cortisol in fish scales to study stress in wild tropical tuna." Environmental Biology of Fishes **104**(6): 725-732.

Ruotsala, A.-H. (2016). Digital Close-Range Photogrammetry – A Modern Method to Document Forensic Mass Graves.

Sadjadi, S. (2018). "Why is C18 the Most Popular Stationary Phase for Reverse-Phase?" Retrieved 21/02/2022, 2022, from <https://phenomenex.blog/2017/10/05/stationary-phase/>.

Sæle, M. S.-E. o. O. (2021). "Fokuset på lakselus overskygger andre problemer." Retrieved 26/10, 2021, from <https://www.nrk.no/norge/tusenvis-av-fiskehjerter-sprekker-na-vil-forskere-finne-ut-hvorfor.-1.15702942>.

Saligaut, C., B. Linard, B. Breton, I. Anglade, T. Bailhache, O. Kah and P. Jego (1999). "Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release." Aquaculture **177**(1-4): 13-20.

Schreck, C. (2000). "Accumulation and Long-term 7." The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare: 147.

Schreck, C. B., W. Contreras-Sanchez and M. S. Fitzpatrick (2001). "Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny." Aquaculture **197**(1): 3-24.

Schreck, C. B. and L. Tort (2016). 1 - The Concept of Stress in Fish. Fish Physiology. C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell and C. J. Brauner, Academic Press. **35**: 1-34.

Science, H. P. a. E. L. (2019). "Which Controls to Use in ELISA Assays." Retrieved 01/10/2021, 2021, from <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2019/november/which-controls-to-use-in-elisa-assays?/>.

Scientific, T. (2016). "Why and How to Matrix Spike." from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LPD/Product-Information/Why-How-Matrix-Spike-ST-MATSPIKE-EN.pdf>.

Sherman, V. R., N. A. Yaraghi, D. Kisailus and M. A. Meyers (2016). "Microstructural and geometric influences in the protective scales of *Atractosteus spatula*." Journal of the Royal Society, Interface **13**(125): 20160595.

Shimadzu. (2021). "What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ? ." Retrieved 10/10/2021, 2021, from https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html.

Shrivastava, A. (2011). "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods." Chronicles of Young Scientists **2**: 21-25.

Site, T. F. (2013). "Stress - Its Role in Fish Disease." from <https://thefishsite.com/articles/stress-its-role-in-fish-disease>.

Sørli, K. J. "Forskjellen mellom positiv korrelasjon og negativ korrelasjon." Retrieved 11/05/2022, 2022, from https://no.differbetween.com/article/difference_between_positive_correlation_and_negative_correlation.

Svendsen, H. L. (2022). "Gunhild Stordalen langer ut mot laksenæringen: - Det er fullstendig galskap." Retrieved 11/05/2022, 2022, from <https://www.nettavisen.no/okonomi/gunhild-stordalen-langer-ut-mot-laksenaringen-det-er-fullstendig-galskap/s/5-95-466226>.

Szeitz, A., J. Manji, K. W. Riggs, A. Thamboo and A. R. Javer (2014). "Validated assay for the simultaneous determination of cortisol and budesonide in human plasma using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Pharm Biomed Anal **90**: 198-206.

Tahir, D., M. Shariff, F. Syukri and F. M. Yusoff (2018). "Serum cortisol level and survival rate of juvenile *Epinephelus fuscoguttatus* following exposure to different salinities." Vet World **11**(3): 327-331.

Uren Webster, T. M., D. Rodriguez-Barreto, S. A. M. Martin, C. Van Oosterhout, P. Orozco-terWengel, J. Cable, A. Hamilton, C. Garcia De Leaniz and S. Consuegra (2018). "Contrasting effects of acute and chronic stress on the transcriptome, epigenome, and immune response of Atlantic salmon." Epigenetics **13**(12): 1191-1207.

Velasco-Santamaría, Y. and P. Cruz-Casallas (2007). "Methodology for determination of plasma cortisol in fish using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." Revista MVZ Córdoba **12**(1): 869-877.

Veterinærinstituttet (2020). Fiskehelse rapporten 2020. Ås, Norge, Veterinærinstituttet.

Weisbart, M. and L. K. McGowan (1984). "Radioimmunoassay of cortisone in the adult Atlantic salmon, *Salmo salar* L." Gen Comp Endocrinol **55**(3): 429-436.

Wendelaar Bonga, S. E. (1997). "The stress response in fish." Physiol Rev **77**(3): 591-625.

Whittingham, W. G. (1995). 3.08 - Thioaldehydes and Thioketones. Comprehensive Organic Functional Group Transformations. A. R. Katritzky, O. Meth-Cohn and C. W. Rees. Oxford, Elsevier Science: 329-380.

Wish, J., P. Bulloch, L. Oswald, T. Halldorson, J. C. Raine, L. Jamshed, C. Marvin, P. J. Thomas, A. C. Holloway and G. T. Tomy (2022). "Kynurenine to tryptophan ratio as a biomarker of acute stress in fish." Chemosphere **288**: 132522.

Yuan, T.-F., J. Le, S.-T. Wang and Y. Li (2020). "An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples." Journal of lipid research **61**(4): 580-586.

Zhou, W., S. Yang and P. G. Wang (2017). "Matrix effects and application of matrix effect factor." Bioanalysis **9**(23): 1839-1844.

7 Vedlegg

Vedlegg 1

Kjemikalier, standarder, utstyr og analyseinstrumenter

Tabell 37: Kjemikalier benyttet i masteroppgaven som inkluderer produsent, renhet/ kvalitet og CAS-nummer.

Produkt	Produsent	Renhet/kvalitet	CAS-nr.
Vann, Optima® LC/MS, W6-212	Fisher Scientific Loughborough, England	Optima® LC/MS	7732-18-5
Metanol, Optima® LC/MS grade	Fisher Scientific Loughborough, England	Optima® LC/MS grade	67-56-1
Maursyre	Merck Darmstadt, Tyskland	98-100 %	64-18-6
Etylacetat	Rathburn Walkerburn, Skottland	HPLC Grade	141-78-6
MTBE, tert-Butyl metyl eter	Supelco Darmstadt, Tyskland	Emsure® ACS	1634-04-4
Girards reagens T	Sigma Aldrich Darmstadt, Tyskland	98 %	123-46-6
2-Hydrazinopyridin	Sigma Aldrich Darmstadt, Tyskland	97 %	4930-98-7
2-propanol	Fisher Scientific Loughborough, England	>99,90 %	67-63-0

Tabell 38: Standarder benyttet i masteroppgaven som inkluderer produsent, kvalitet og CAS-nummer.

Produkt	Produsent	Renhet/kvalitet	CAS-nummer
Kortison-2,3,4- ¹³ C ₃ Internstandard, 100 ug/mL	Sigma-Aldrich Darmstadt, Tyskland	98 %	C-160
Kortisol-D ₄ (9,11,12,12-D ₄) Internstandard, 100 ug/mL	Cerilliant Darmstadt, Tyskland	100 %	73565-87-4 (M-113)
Standard, kortisol, 1,0 mg/mL	Sigma-Aldrich Darmstadt, Tyskland	Oppgitt som sertifisert referansemateriale	50-23-7
Standard, kortison, 100 ug/mL	Sigma-Aldrich Darmstadt, Tyskland	≥98 %	53-06-5

Tabell 39: Utstyr og materiale benyttet i masteroppgaven med tilhørende produktnavn, produsent og spesifikasjoner.

Produkt	Produktnavn	Produsent	Spesifikasjoner
C18 HPLC-kolonne	C18 HPLC Columns for HPLC analysis	Phenomenex Torrance, USA	00C-4462-AN Kinetex 2,6u, C18 100A 75x2,10 mm 644643-9
Automatpipette, manuell, enkanal med variabelt volum.	Thermo Scientific™ Finnpiette™ F2 Fixed Volume Single-Channel Pipettes	Thermo Scientific Waltham, USA	0,5- 5 µL 2-20 µL 20-200 µL 100-1000 µL
Automatpipette, manuell, multikanal med variabelt volum.	Sartorius™ Biohit™ Proline Multi-Channel Mechanical Pipettes, 8 channels	Fisher Scientific Waltham, USA	5-100 µL 30-300 µL
Automatpipette, elektronisk, multikanal med variabelt volum	Picus® Electronic Pipette, 8 Channels	Satorius Göttingen, Tyskland	50-1200 µL
N ₂ -inndamper	REACTI-THERM I#TS-18822	Thermo Scientific Waltham, USA	
Vortex, risteapparat	Mini Vortex mixers	VWR International Radnor, USA	
HPLC-glass med insert	Verex HPLC vials	Phenomenex Torrance, USA	250 µL
Prøveglass	DWK Life Sciences Wheaton™ Glass Vials in Vial File™	Fisher Scientific Waltham, USA	2 mL
Sentrifugerør	Mikrosentrifugerør, 1,5 ml, 3810X	VWR International Radnor, USA	1,5 mL
PTFE Filtreringsrør	Nano Filter Vials	Thomson Instrument Company Cleveland, USA	0,2 um
Reagent-beholder	Reagens reservoir	VWR International Radnor, USA	100 mL, ikke-sterile
Mikro sentrifugerør	Microtube SafeSeal, PCR Performance tested	Sarstedt AS Nümbrecht, Tyskland	1,5 mL
Ultrafryser	NuAire Blizzard-86 Ultra Low Temperature Freezer	NuAire Fernbrook, England	-80°C
Forseglende film	Axygen® AxySeal Sealing film	Axygen Corston, England	PCR-SP
Celleskraper	Celleskrape med 18 mm dreibart blad	VWR International Radnor, USA	Lengde 400 mm 18 mm dreibart blad
Lofritt papir	Delicate Task Wipes	Fisher Scientific Waltham, USA	100 stk. 25,5x20 cm.
ThermoMixer	ThermoMixer C	VWR International Radnor, USA	

Precellys Evolution homogenisator	Precellys® Evolution tissue homogenizer	Bertin Instruments Montigny-le-Bretonneux, Frankrike	Fart: 6 800 RPM Syklus: 3*20 s s, med 30 s pause Temperatur: 0 °C For harde materialer
Homogenisator- rør for harde materialer	Precellys lysing kits, Hard tissue grinding MK28 – 2 mL	Bertin Instruments Montigny-le-Bretonneux, Frankrike	2 mL med 2,8 mm rustfritt stål
Ristemaskin	Eppendorf MixMate	Eppendorf Hamburg, Tyskland	
Sentrifuge	Thermo Scientific™ Megafuge 8R Cell Culture + Microclick 30 Pack	Thermo Scientific Waltham, USA	
S- Movette sprøyte med heparin	S-Monovette® Lithium heparin, 2.7 ml, cap green, (LxØ): 66 x 11 mm, with paper label	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Tyskland	S-Monovette® Lithium heparin gel+, 2.7 ml, cap green, (LxØ): 75 x 13 mm, with paper label, 16 IU/ml blod

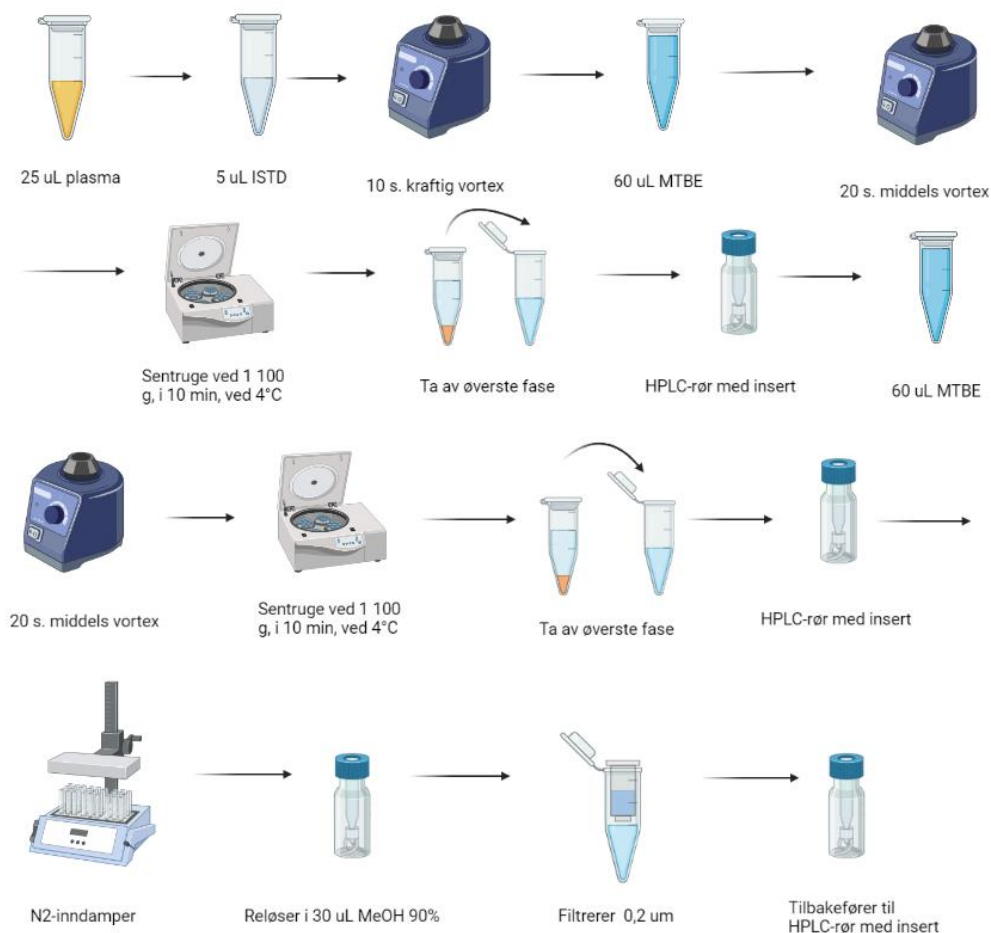
Tabell 40: Analyseinstrumenter og programmer benyttet i masteroppgaven med produktnavn, produsent og spesifikasjoner.

Produkt	Produktnavn	Produsent	Spesifikasjoner
UHPLC	Vanquish Horizon UHPLC System	Thermo Scientific Waltham, USA	
HRMS	Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer	Thermo Scientific Waltham, USA	
XCalibur Sequence	Xcalibur Data system	Thermo Scientific Waltham, USA	
Xcalibur Quan File	Xcalibur Data system	Thermo Scientific Waltham, USA	
Kortisol ELISA Kit	Cortisol Competitive ELISA Kit ADI-900-071	Enzo Farmingdale, USA	96 brønner
Absorpsjons avleser	SpectralMax® i3x	Molecular Devices San Jose, USA	405 nm
Program SpetraMax	SoftMax Pro 6.5.1	Molecular Devices San Jose, USA	

Vedlegg 2

Prosedyre for prøveopparbeidelse av kortison og kortisol ved plasmaprøver

Plasmaprøvene ble tint i romtemperatur og deretter oppbevart på is etter tining. Alikvoter (25 µL) av plasmaprøvene ble overført til Eppendorfrør (1,5 mL) og tilsatt ISTD arbeidsløsning (5 µL, 240 ng/mL). Prøvene ble homogenisert ved maks hastighet (10 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. MTBE (60 µL) ble overført til plasmaprøvene, før prøvene ble blandet på middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt og deretter sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et HPLC-rør med insert (250 µL) ved hjelp av pipette. MTBE (60 µL) ble tilsatt prøvene og deretter blandet på nytt ved middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt før prøvene på nytt ble sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til det samme HPLC-røret med insert (250 µL) og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Plasmaekstraktet ble deretter oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 30 µL) og blandet på maks hastighet (30 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Plasmaprøvene ble overført til PTFE filtreringsrør (PTFE Filtreringsrør, Nano Filter Vials Thomson Instrument Company, Cleveland, USA) før prøvene ble overført til et nytt HPLC-rør med insert (250 µL) og analysert på LC-HRMS. Prøvene ble oppbevart i fryser ved -25 °C. Prøveopparbeidelse av plasma er illustrert som et enkelt flytskjema i Figur 43.



Created in **BioRender.com** **bio**

Figur 43: Enkelt flytskjema som viser prøveopparbeidelsen i form av ekstraksjon med MTBE av kortison og kortisol fra plasma. Denne oversikten er kun ment som en generell oversikt, og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Dette flytskjemaet er tegnet ved hjelp av BioRender.

Vedlegg 3

Prosedyre for prøveopparbeidelse for gjenvinningsforsøk i plasmaprøver

Alikvoter (25 µL) av plasmaprøver ble overført til Eppendorfrør (1,5 mL) og tilsatt arbeidsløsning (5 µL, 150 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL). Plasmaprøvene ble blandet ved maks hastighet (10 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. MTBE (60 µL) ble overført til plasmaprøvene ved hjelp av pipette, før prøvene ble blandet på middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt og deretter sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et HPLC-rør med insert (250 µL) ved hjelp av en pipette. MTBE (60 µL) ble tilsatt prøvene på nytt og deretter blandet på nytt ved middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt før plasmaprøvene på nytt ble sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til det samme HPLC-røret med insert (250 µL) og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Plasmaekstraktet ble deretter oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 30 µL) og blandet ved maks hastighet før prøven overføres til PTFE filtreringsrør. Etter filtrering overføres prøven til et nytt HPLC-rør med insert (250 µL) og ble analysert på LC-HRMS. Prøvene ble oppbevart i fryser ved -25 °C.

Vedlegg 4

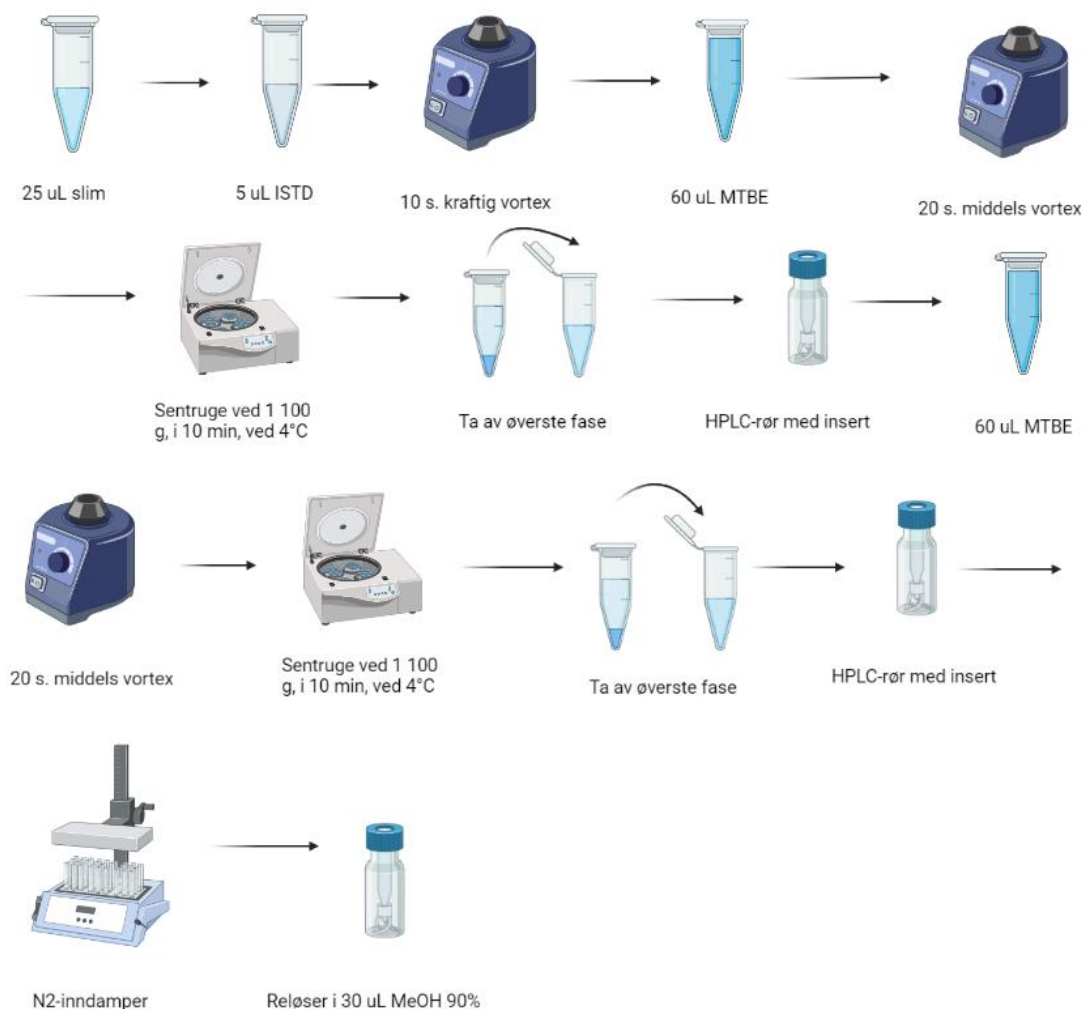
Prosedyre for prøveopparbeidelse for bestemmelse av metodens linearitet, LOD, LOQ og matrikseffekter i plasma

Kalibreringsstandarder ble laget som nevnt tidligere i henhold til Tabell 4. ISTD-arbeidsløsning (20 µL, 400 ng/mL) ble overført til HPLC-rør med insert (250 µL) og dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. ISTD-arbeidsløsning ble oppløst i de ulike kalibreringsstandardene (200 µL) og blandet på maks hastighet ved hjelp av ristemaskin. Alikvoter av plasmaprøver (50 µL) ble overført til Eppendorfrør (1,5 mL) og tilsatt MTBE (100 µL), før prøvene ble blandet på middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt og deretter sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et HPLC-rør med insert (250 µL) ved hjelp av pipette. MTBE (100 µL) ble tilsatt plasmaprøvene på nytt og deretter blandet på ved middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt før plasmaprøvene på nytt ble sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til det samme HPLC-røret med insert (250 µL) og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Plasmaekstraktet ble oppløst i de ulike kalibreringsstandardene (50 µL) inkludert ISTD (400 ng/mL). De matriksassisterte kalibreringskurvene ble blandet på maks hastighet (30 sekunder) ved hjelp av ristemaskin før prøvene ble overført til PTFE filtreringsrør. Etter filtrering overføres prøven til et nytt HPLC-rør med insert (250 µL) og ble analysert på LC-HRMS. Prøvene ble oppbevart i fryser ved -25 °C.

Vedlegg 5

Prosedyre for prøveopparbeidelse av kortison og kortisol ved overflateslimprøver

Slimprøvene ble tint i romtemperatur og deretter oppbevart på is etter tining. Alikvoter (25 µL) av prøvene ble overført til Eppendorfrør (1,5 mL) og tilsatt ISTD arbeidsløsning (5 µL, 240 ng/mL). Prøvene ble homogenisert ved maks hastighet (10 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. MTBE (60 µL) ble overført til plasmaprøven før prøvene ble blandet på middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt og deretter sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et HPLC-rør med insert (250 µL) ved hjelp av pipette. MTBE (60 µL) ble tilsatt prøvene og deretter blandet på nytt ved middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt før prøvene på nytt ble sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til det samme HPLC-røret med insert (250 µL) og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Slimekstraktet ble deretter oppløst i MeOH (30 µL, 90 %). Prøvene ble analysert på LC-HRMS og ble oppbevart i fryser ved -25 °C. Prøveopparbeidelse av overflateslim er illustrert som et enkelt flytskjema i Figur 44.



Created in **BioRender.com** **bio**

Figur 44: Enkelt flytskjema som viser prøveopparbeidelsen i form av ekstraksjon med MTBE av kortison og kortisol fra overflateslim. Denne oversikten er kun ment som en generell oversikt, og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Dette flytskjemaet er tegnet ved hjelp av BioRender.

Vedlegg 6

Prosedyre for prøveopparbeidelse for gjenvinningsforsøk i overflateslimprøver

Alikvoter (25 µL) av overflateslimprøver ble overført til Eppendorfrør (1,5 mL) og tilsatt arbeidsløsning (5 µL, 10 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL). Overflateslimprøvene ble blandet ved maks hastighet (10 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. MTBE (60 µL) ble tilsatt overflateslimprøvene før prøvene ble blandet på middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt og deretter sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et HPLC-rør med insert (250 µL) ved hjelp av pipette. MTBE (60 µL) ble tilsatt overflateprøvene på nytt og deretter blandet på ved middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt før plasmaprøvene på nytt ble sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til det samme HPLC-røret med insert (250 µL) og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Slimekstraktet ble deretter oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 30 µL) før prøven ble analysert på LC-HRMS. Prøvene ble oppbevart i fryser ved -25 °C.

Vedlegg 7

Prosedyre for prøveopparbeidelse for bestemmelse av metodens linearitet, LOD, LOQ og matrikseffekter i overflateslim

Kalibreringsstandarder ble laget som nevnt tidligere i henhold til Tabell 4. ISTD-arbeidsløsning (20 µL, 400 ng/mL) ble overført til HPLC-rør med insert (250 µL) og dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. ISTD-arbeidsløsning ble oppløst i kalibreringsstandardene (200 µL) og blandet på maks hastighet ved hjelp av ristemaskin. Alikvoter av overflateslimprøver (50 µL) ble overført til Eppendorfrør (1,5 mL) og tilsatt MTBE (100 µL) før prøvene ble blandet på middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt og deretter sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et nytt HPLC-rør med insert (250 µL) ved hjelp av pipette. MTBE (100 µL) ble tilsatt prøvene på nytt og deretter blandet på ved middels hastighet (20 sekunder) ved hjelp av ristemaskin. Prøvene fikk stå i 1 minutt før overflateslimprøvene ble sentrifugert ved 1 100 g, i 10 minutter ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til det samme HPLC-røret med insert (250 µL) og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Overflateslimekstraktet ble oppløst i de ulike kalibreringsstandardene (50 µL) inkludert ISTD (400 ng/mL). De matriksassisterte kalibreringskurvene ble blandet på høy hastighet (30 sekunder) ved hjelp av en ristemaskin og deretter analysert på LC-HRMS. Prøvene ble oppbevart i fryser ved -25 °C.

Vedlegg 8

Prosedyre for test av derivatiseringsreagensene GRT og 2-HP

Testen ble utført ved hjelp av 7 paralleller med arbeidsløsning (100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v) med maursyre (0,1 %, v/v). GRT/ 2-HP (8 mg/mL) ble laget ved å veie GRT/ 2-HP (8 mg) direkte i et glassrør (2 mL). GRT/ 2-HP ble oppløst i MeOH (999 µL, 100 %) og maursyre (1 µL). Arbeidsløsningen (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) ble fordelt i Eppendorfrør (1,5 mL) og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av en N₂-inndamper ved 60 °C. GRT/ 2-HP (100 µL, 8 mg/mL, 0,1 % maursyre) ble tilsatt Eppendorfrørene (1,5 mL) og blandet kraftig ved hjelp av en ristemaskin i 40 sekunder. Prøvene ble plassert i en ThermoMixer (VWR International, Radnor, USA, ThermoMixer C) ved 550 RPM og 60 °C. 7 stk. Tabell 41 viser en oversikt over alle parallellene, samt hvor lenge prøvene var plassert i ThermoMixeren.

Tabell 41: Oversikt over 7 paralleller med arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) som ble plassert i riskemaskin ved 550 RPM ved 60 °C. Prøvene ble plassert i riskemaskinen i intervaller på 30 minutter før de ble plassert i fryser ved -24 °C.

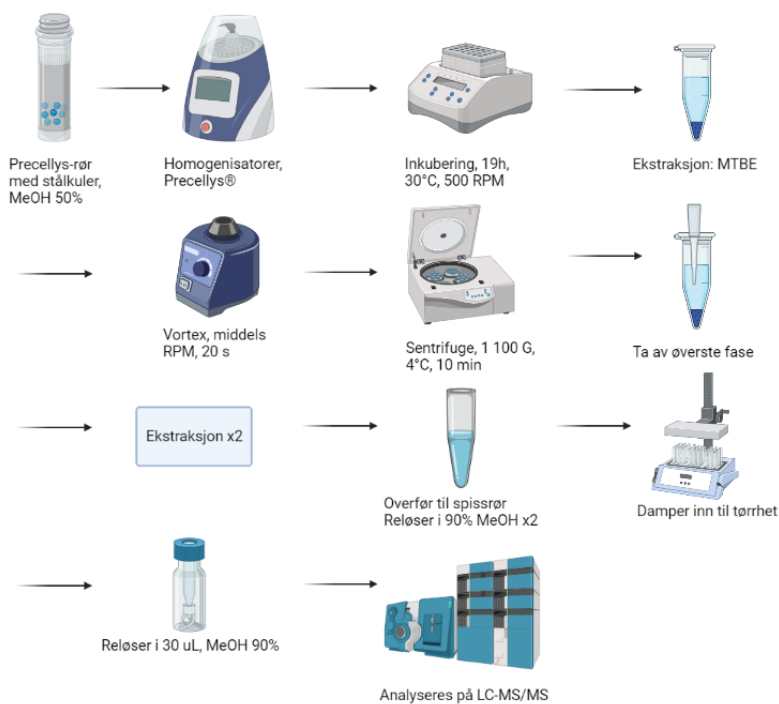
Prøve	Prøver med oppgitt tidsintervall.
TB	Arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL). Plassert direkte i fryser ved -25 °C
T0	Arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) tilsatt GRT/ 2-HP (100 µL, 8 mg/mL, 0,1 % maursyre). Plassert direkte i fryser ved -25 °C
T1	Arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) tilsatt GRT/ 2-HP (100 µL, 8 mg/mL, 0,1 % maursyre). Plassert direkte i fryser etter 30 minutter ved -25 °C
T2	Arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) tilsatt GRT/ 2-HP (100 µL, 8 mg/mL, 0,1 % maursyre). Plassert direkte i fryser etter 60 minutter ved -25 °C
T3	Arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) tilsatt GRT/ 2-HP (100 µL, 8 mg/mL, 0,1 % maursyre). Plassert direkte i fryser etter 90 minutter ved -25 °C
T4	Arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) tilsatt GRT/ 2-HP (100 µL, 8 mg/mL, 0,1 % maursyre). Plassert direkte i fryser etter 120 minutter ved -25 °C
T5	Arbeidsløsning (100 µL, 100 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) tilsatt GRT/ 2-HP (100 µL, 8 mg/mL, 0,1 % maursyre). Plassert direkte i fryser etter 150 minutter ved -25 °C

Etter avkjøling i fryseren (30 minutter, -25 °C) ble prøvene blandet godt ved hjelp av en ristemaskin på høy hastighet i 20 sekunder før de ble overført til HPLC-rør med insert (250 µL) og deretter analysert på LC-HRMS.

Vedlegg 9

Prosedyre for prøveopparbeidelse av kortison og kortisol ved fiskeskjellprøver

Tørkede fiskeskjell (25 mg) ble innveid direkte i homogenisator-rør beregnet for harde materialer (Hard tissue grinding MK28, 2 mL, Precellys lysing kits Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankrike). Fiskeskjellprøvene ble tilsatt 50 % MeOH/vann (1:1, v/v; 500 µL) og ISTD arbeidsløsning (5 µL, 240 ng/mL) før homogenisering ved hjelp av Precellys Evolution homogenisator (Precellys® Evolution tissue homogenizer, Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankrike). Fiskeskjellprøvene ble homogenisert ved program for harde biologiske materialer (6 800 RPM, 0 °C, 3 x 20 sekunder med 30 sekunder pause mellom hver syklus). Etter homogenisering ble vann (240 µL) tilsatt prøvene. Deretter ble MTBE (740 µL) tilsatt prøvene og blandet på middels hastighet ved hjelp av en ristemaskin (20 sekunder). Prøvene fikk stå i 1 minutt før sentrifugering ved 1 100 g i 10 min ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et spissrør i glass med slip (10 mL) ved hjelp av pipette. Fiskeskjellprøvene ble tilsatt MTBE (740 µL) på nytt og blandet ved middels hastighet ved hjelp av ristemaskin (20 sekunder). Prøvene fikk stå i 1 minutt før sentrifugering ved 1 100 g i 10 min ved 4 °C. Den øverste fasen ble deretter overført på nytt til det samme spissrøret i glass med slip (10 mL) ved hjelp av pipette. Fiskeskjellekstraktet ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper 60 °C, før prøvene ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) og deretter blandet kraftig med en ristemaskin i 30 sekunder. Ekstraktet ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av en N₂-inndamper 60 °C. Fiskeskjellekstraktet ble oppløst med 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) på nytt, blandet kraftig med en ristemaskin i 30 sekunder og dampet inn ved hjelp av N₂-inndamper 60 °C. Fiskeskjellekstraktet ble oppløst en siste gang i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) og blandet på maks hastighet med ristemaskin i 30 sekunder. Fiskeskjellekstraktet ble overført til HPLC-rør med insert (250 µL) og dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C, før fiskeskjellekstraktet ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 30 µL). Prøvene ble analysert på LC-HRMS og ble oppbevart i fryser ved -25 °C.



Created in BioRender.com bio

Figur 45: : Enkelt flytskjema som viser prøveopparbeidelsen i form av ekstraksjon med MTBE av kortison og kortisol fra fiskeskjell. Denne oversikten er kun ment som en generell oversikt, og type rør og annet utstyr kan avvike fra utstyr som ble benyttet i prosessen. Dette flytskjemaet er tegnet ved hjelp av BioRender.

Vedlegg 10

Prosedyre for prøveopparbeidelse for gjenvinningsforsøk i fiskeskjellprøver

Tørkede fiskeskjell (25 mg) ble innveid direkte i homogenisator-rør for harde materialer. Fiskeskjellprøvene ble tilsatt 50 % MeOH/vann (1:1, v/v; 500 µL) og arbeidsløsning (5 µL, 10 ng/mL) inkludert ISTD (40 ng/mL) før homogenisering ved hjelp av Precellys Evolution homogenisator. Fiskeskjellprøvene ble homogenisert ved program for harde biologiske materialer (6 800 RPM, 0 °C, 3 x 20 sekunder med 30 sekunder pause mellom hver syklus). Etter homogenisering ble vann (240 µL) tilsatt prøvene. Deretter ble MTBE (740 µL) tilsatt prøvene og blandet på middels hastighet ved hjelp av en ristemaskin (20 sekunder). Prøvene fikk stå i 1 minutt før sentrifugering ved 1 100 g i 10 min ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et spissrør i glass med slip (10 mL) ved hjelp av pipette. Fiskeskjellprøvene ble tilsatt MTBE (740 µL) på nytt og blandet på middels hastighet ved hjelp av en ristemaskin (20 sekunder). Prøvene fikk stå i 1 minutt før sentrifugering ved 1 100 g i 10 min ved 4 °C. Den øverste fasen ble deretter overført til det samme spissrøret i glass med slip (10 mL) ved hjelp av pipette. Fiskeskjellekstraktet ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av en N₂-inndamper ved 60 °C, før prøvene ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) og deretter blandet kraftig med en ristemaskin i 30 sekunder. Ekstraktet ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Fiskeskjellekstraktet ble oppløst med 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) på nytt, blandet kraftig med en ristemaskin i 30 sekunder og dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Fiskeskjellekstraktet ble oppløst en siste gang i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) og blandet på maks hastighet med en ristemaskin i 30 sekunder. Fiskeskjellekstraktet ble overført til et HPLC-rør med insert (250 µL) og dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C, før fiskeskjellekstraktet ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 30 µL). Prøvene ble analysert på LC-HRMS og ble oppbevart i fryser ved -25 °C.

Vedlegg 11

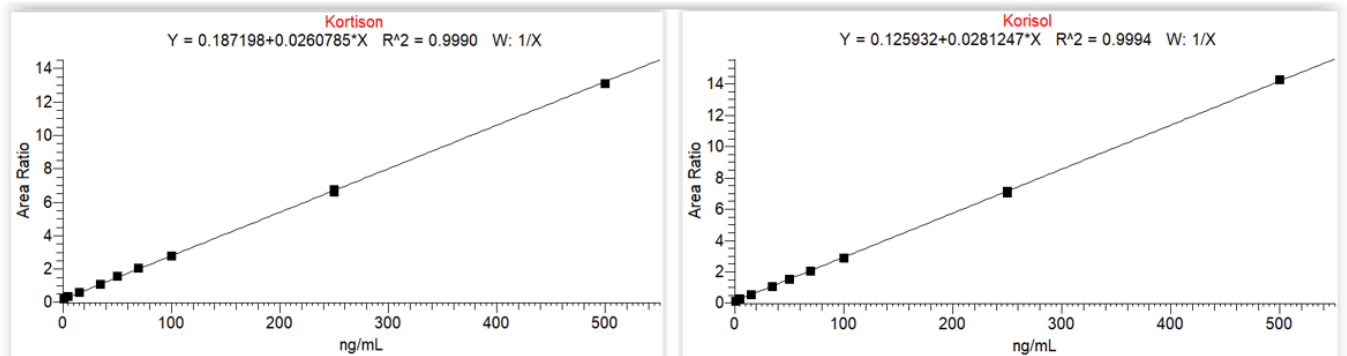
Prosedyre for prøveopparbeidelse for bestemmelse av metodens linearitet, LOD, LOQ og matrikseffekter i fiskeskjell

Kalibreringsstandarder ble laget som nevnt tidligere i henhold til Tabell 4. ISTD-arbeidsløsning (20 µL, 400 ng/mL) ble overført til HPLC-rør med insert (250 µL) og dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. ISTD-arbeidsløsning ble oppløst i kalibreringsstandardene (200 µL) og blandet på maks hastighet ved hjelp av ristemaskin. Tørkede fiskeskjell (25 mg) ble innveid direkte i homogenisator-rør for harde materialer. Fiskeskjellprøvene ble tilsatt 50 % MeOH/vann (1:1, v/v; 500 µL) før homogenisering ved hjelp av Precellys Evolution homogenisator. Fiskeskjellprøvene ble homogenisert ved program for harde biologiske materialer (6 800 RPM, 0 °C, 3 x 20 sekunder med 30 sekunder pause mellom hver syklus). Etter homogenisering ble vann (240 µL) tilsatt prøvene. Deretter ble MTBE (740 µL) tilsatt prøvene og blandet på middels hastighet ved hjelp av en ristemaskin (20 sekunder). Prøvene fikk stå i 1 minutt før sentrifugering ved 1 100 g i 10 min ved 4 °C. Den øverste fasen ble overført til et spissrør i glass med slip (10 mL) ved hjelp av pipette. Fiskeskjellprøvene ble tilsatt MTBE (740 µL) på nytt og blandet på middels hastighet ved hjelp av en ristemaskin (20 sekunder). Prøvene fikk stå i 1 minutt før sentrifugering ved 1 100 g i 10 min ved 4 °C. Den øverste fasen ble deretter overført til det samme spissrøret i glass med slip (10 mL) ved hjelp av pipette. Fiskeskjellekstraktet ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C, før prøvene ble oppløst i 90% MeOH (v/v; 100 µL) og deretter blandet kraftig med ristemaskin (30 sekunder). Ekstraktet ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Fiskeskjellekstraktet ble oppløst med 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) på nytt, blandet kraftig med ristemaskin i 30 sekunder og dampet inn ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C. Fiskeskjellekstraktet ble oppløst en siste gang i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 100 µL) og blandet på maks hastighet med en ristemaskin (30 sekunder). Fiskeskjellekstraktet ble overført til HPLC-rør med insert (250 µL) og dampet inn til tørrhet ved hjelp av N₂-inndamper ved 60 °C, før fiskeskjellekstraktet ble oppløst i 90 % MeOH/vann (9:1, v/v; 30 µL). De matriksassisterte kalibreringskurvene ble blandet på høy hastighet (30 sekunder) ved hjelp av en ristemaskin og deretter analysert på LC-HRMS. Prøvene ble oppbevart i fryser ved -25 °C.

Vedlegg 12

Matriksassistert kalibreringskurve i plasma

Figur 46 viser en matriksassistert kalibreringskurve løst i plasma. Denne kurven viser et eksempel på linearitet i det aktuelle arbeidsområdet for kortison og kortisol i plasma.



Figur 46: Standarder løst i ekstrahert plasma for kortison (til høyre) og kortisol til venstre. Begge kalibreringskurvene ble $\frac{1}{x}$ vektet. Begge kalibreringskurvene er beregnet i Xcalibur Quan Browser og er basert på 1 kjøring, og er hentet direkte fra Xcalibur.

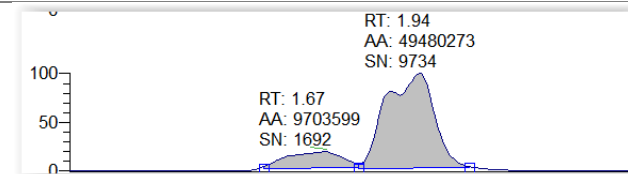
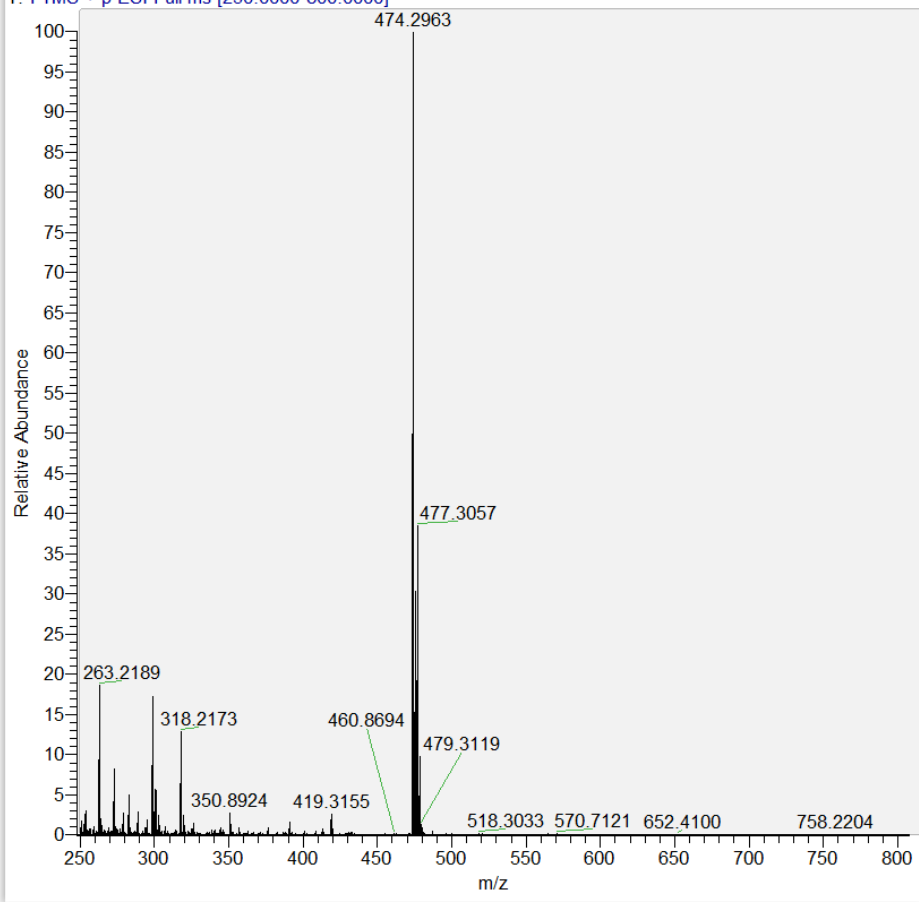
Vedlegg 13

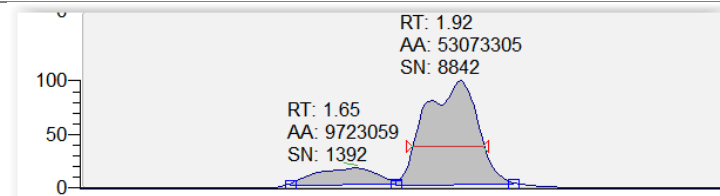
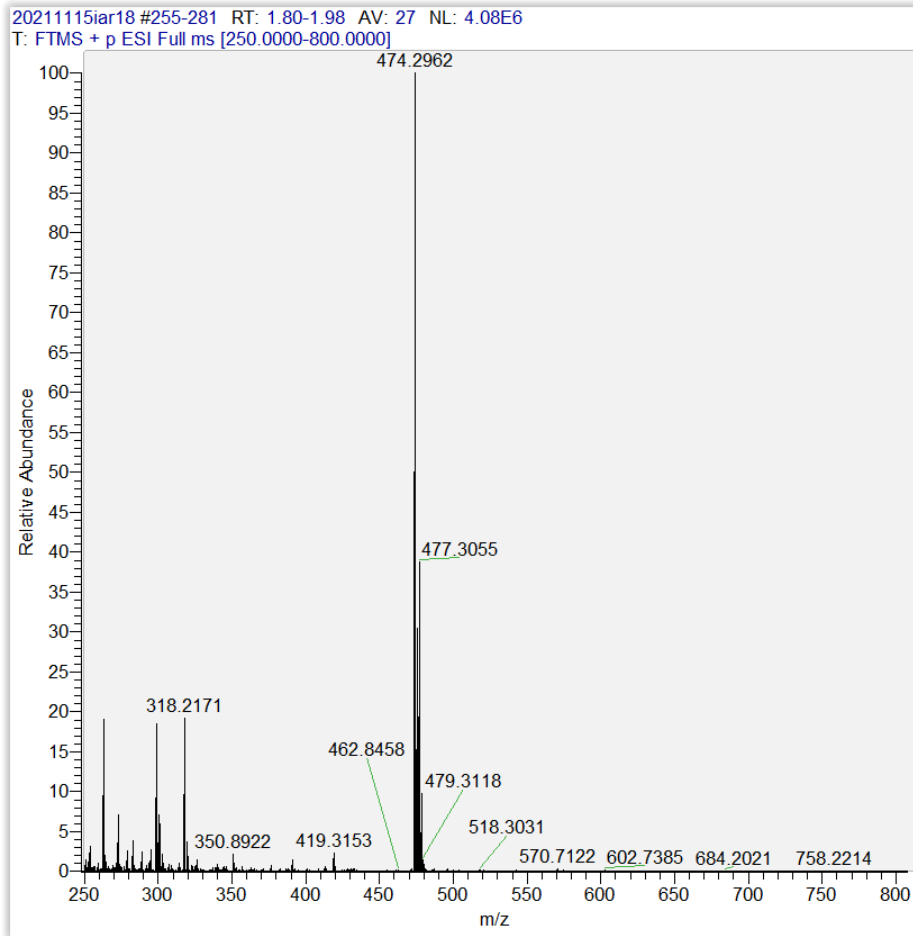
Derivatisering med GRT med maursyre (0,1 %, v/v) for kortison mono-derivat med eksakt $m/z = 474.2962$

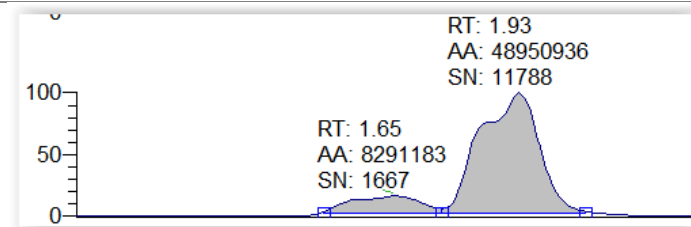
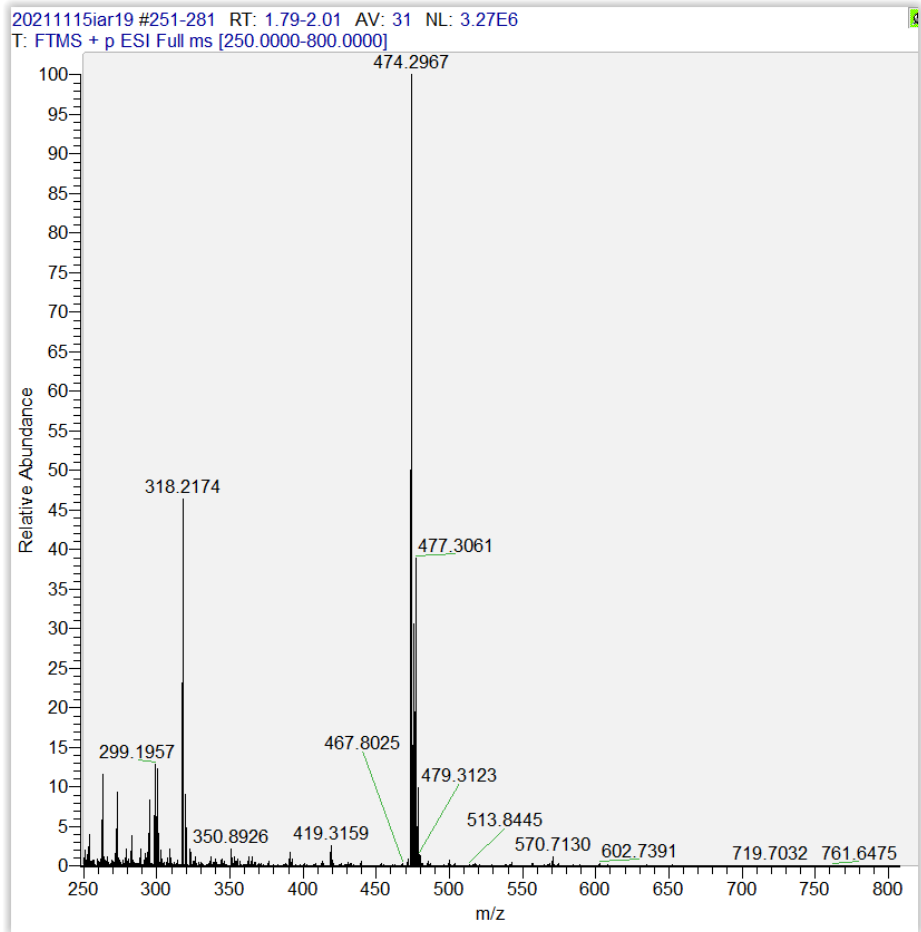
ID	Tid (Min)	MS-spekter	Kromatogram
TB	0	Ikke påvist	Ikke påvist
T0	0	<p>20211115iar16 #250-274 RT: 1.80-1.99 AV: 25 NL: 3.31E6 T: FTMS + p ESI Full ms [250.0000-800.0000]</p>	

T1 30

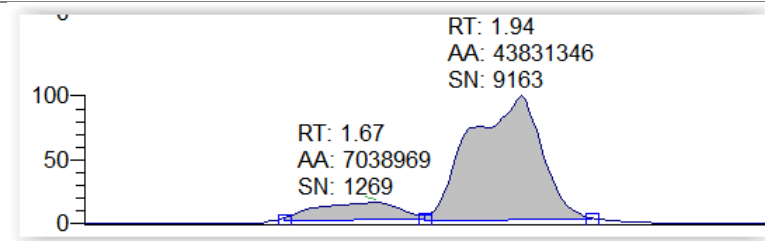
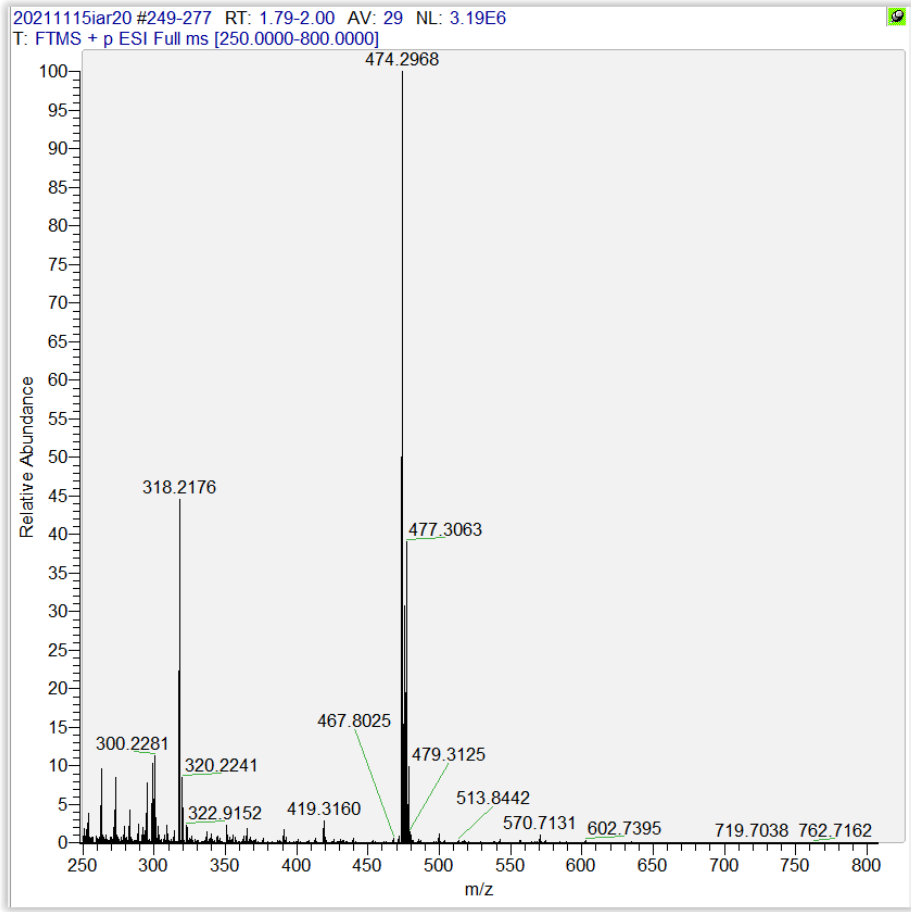
20211115iar17 #254-281 RT: 1.80-2.00 AV: 28 NL: 3.63E6
T: FTMS + p ESI Full ms [250.0000-800.0000]



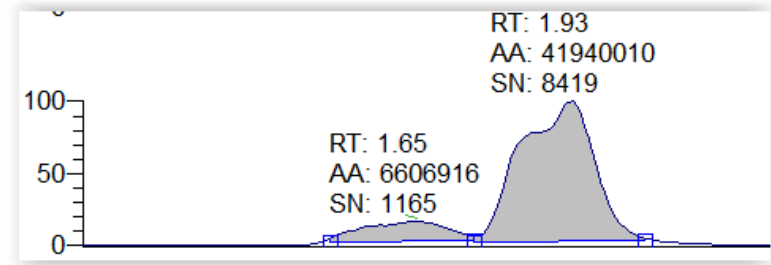
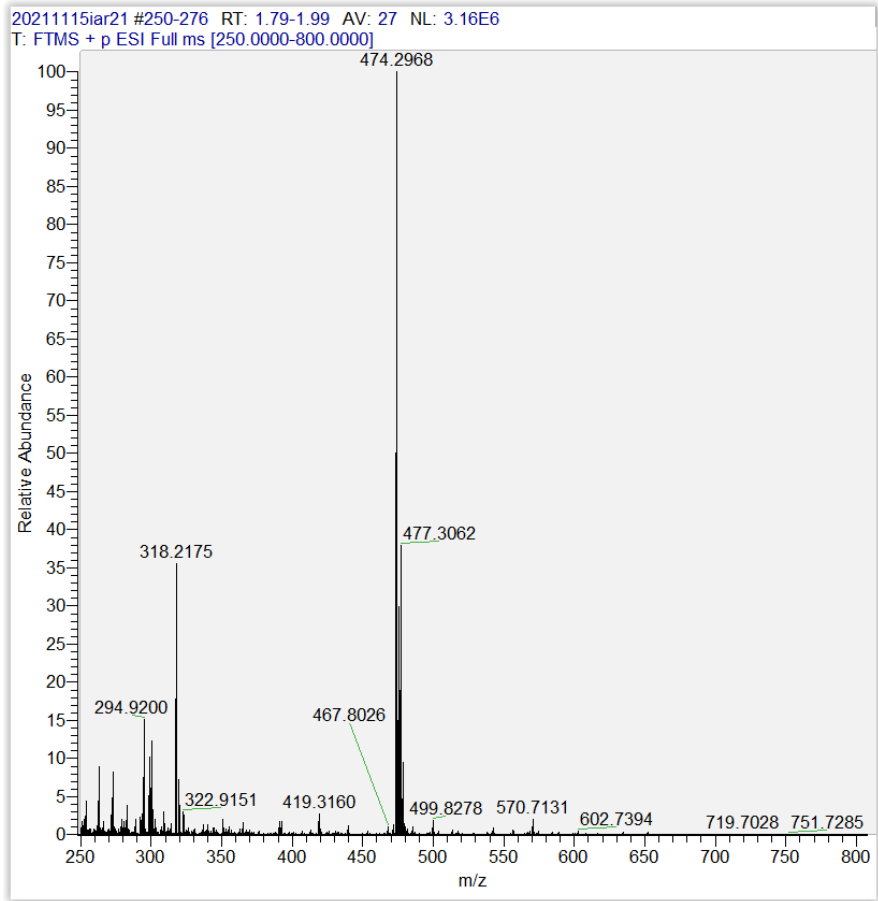




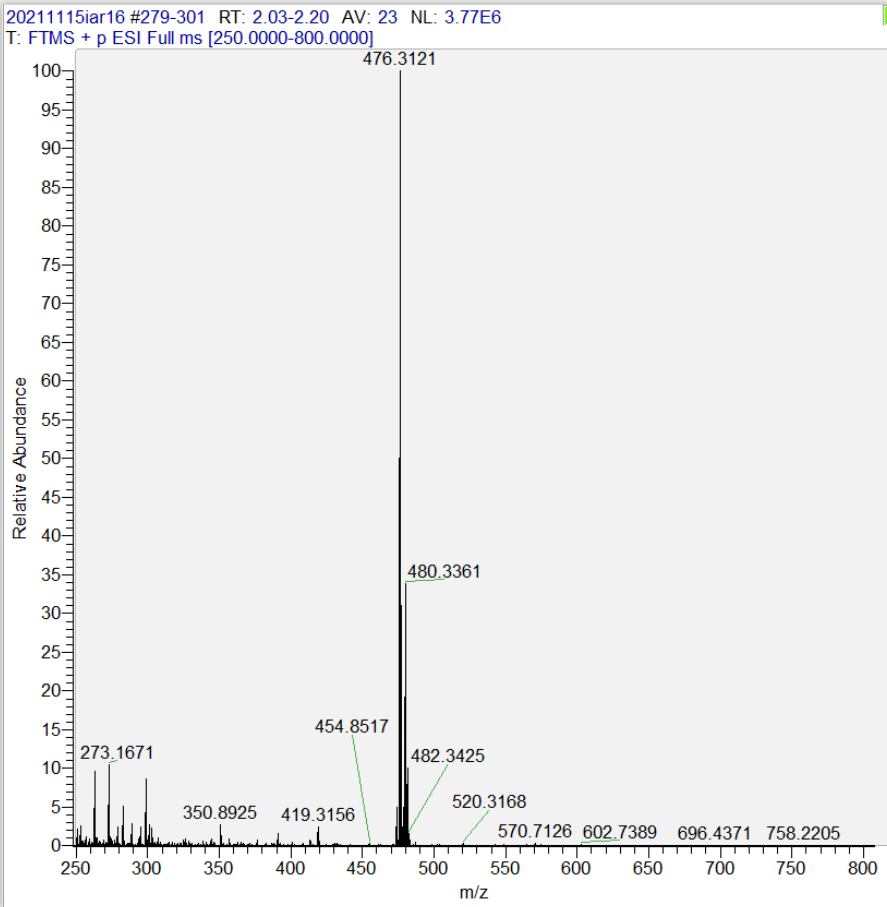
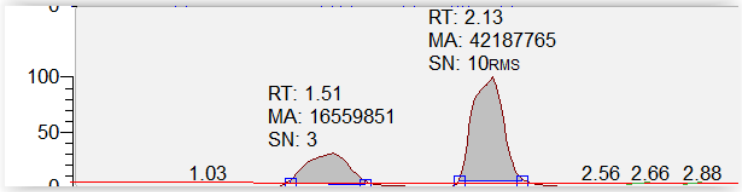
T4 120

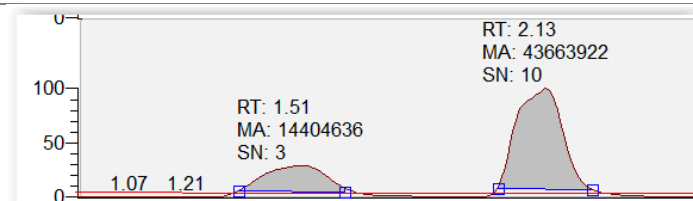
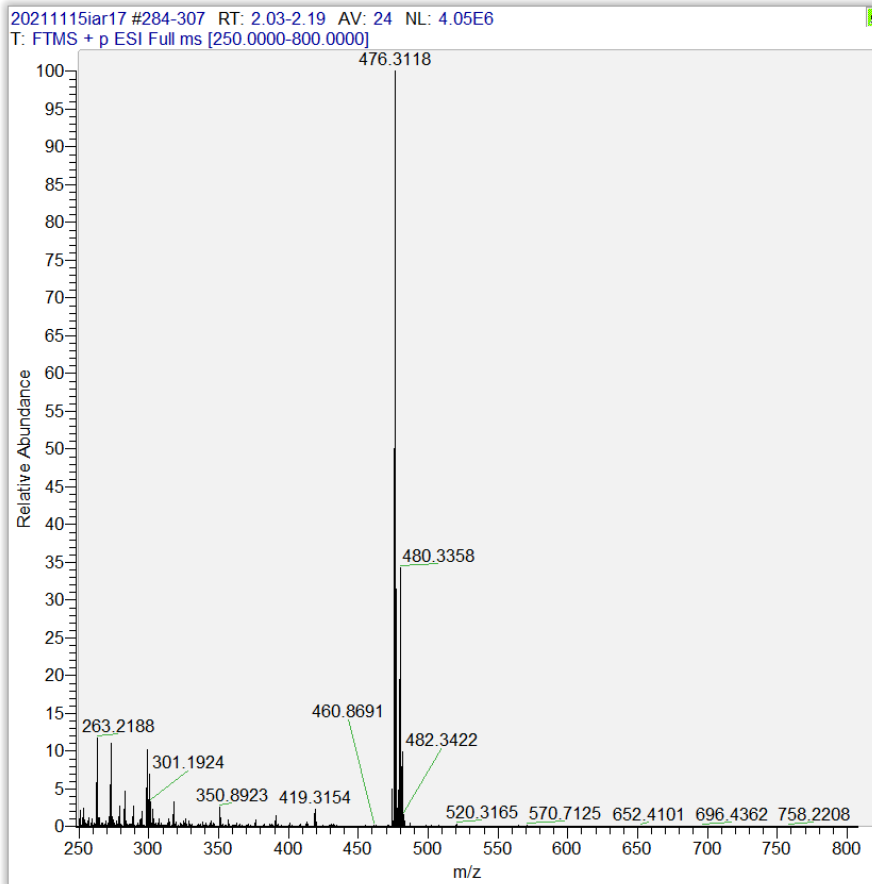


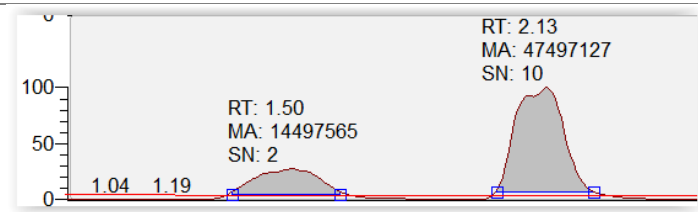
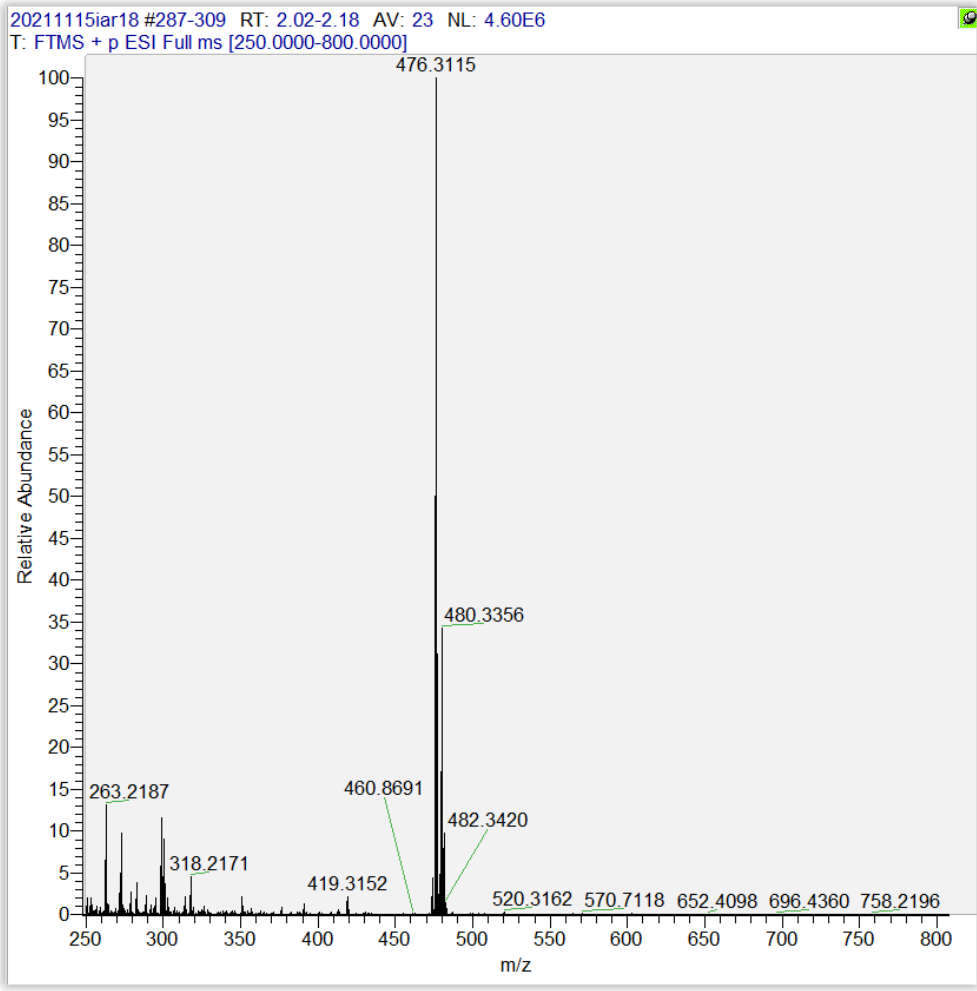
T5 150

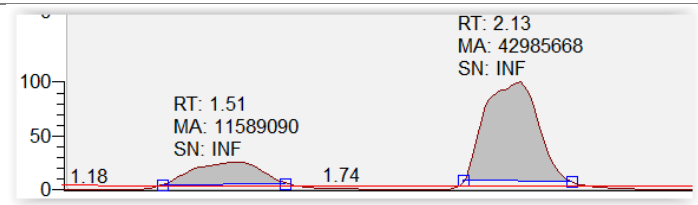
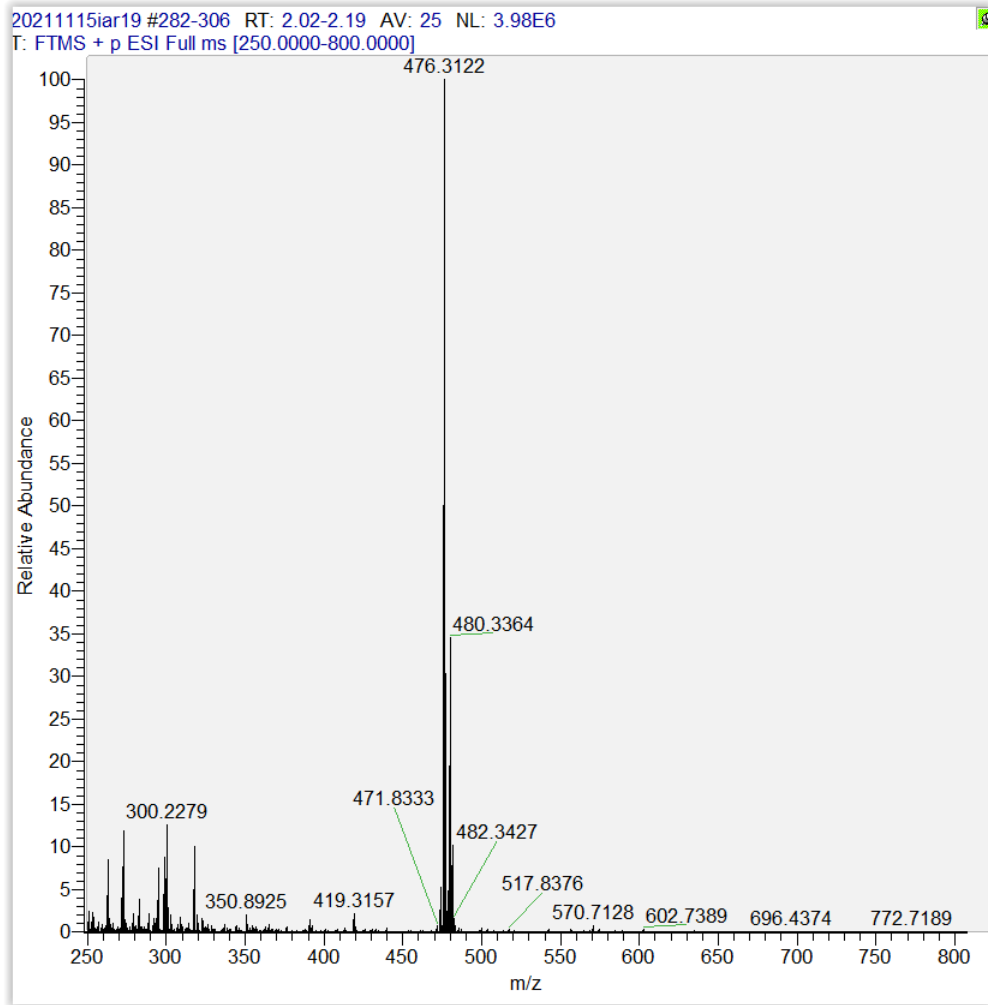


Derivasjon med GRT med maursyre (0,1 %, v/v) for kortisol mono-derivat med eksakt $m/z = 476.3119$

ID	Tid (Min)	MS-spekter	Kromatogram
TB	0	Ikke påvist	Ikke påvist
TO	0	 <p>20211115iar16 #279-301 RT: 2.03-2.20 AV: 23 NL: 3.77E6 T: FTMS + p ESI Full ms [250.0000-800.0000]</p> <p>476.3121</p> <p>480.3361</p> <p>454.8517</p> <p>482.3425</p> <p>520.3168</p> <p>273.1671</p> <p>350.8925</p> <p>419.3156</p> <p>570.7126</p> <p>602.7389</p> <p>696.4371</p> <p>758.2205</p>	 <p>RT: 2.13 MA: 42187765 SN: 10RMS</p> <p>RT: 1.51 MA: 16559851 SN: 3</p> <p>1.03</p> <p>2.56 2.66 2.88</p>

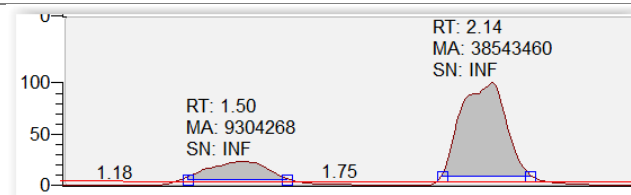
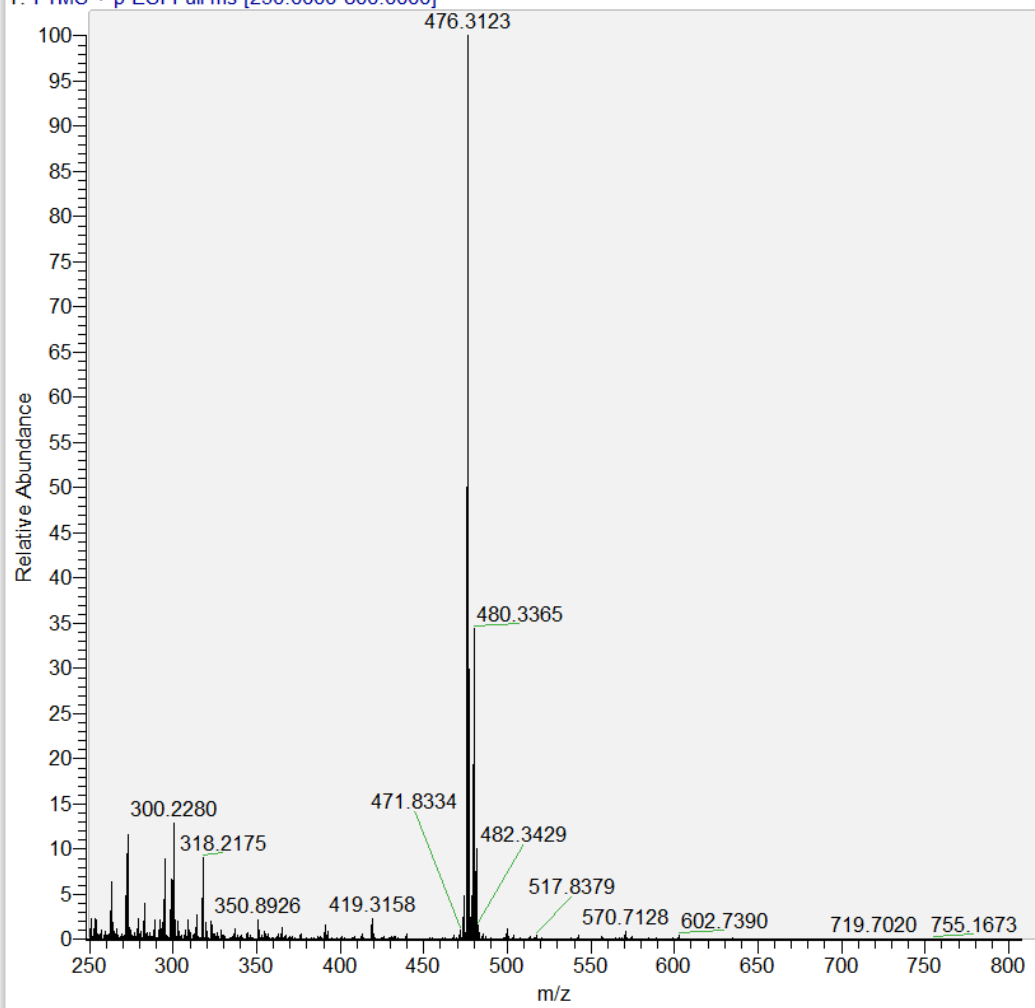






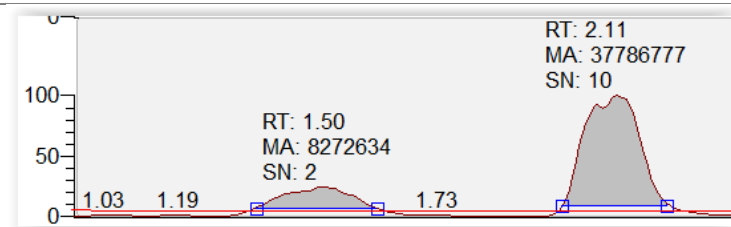
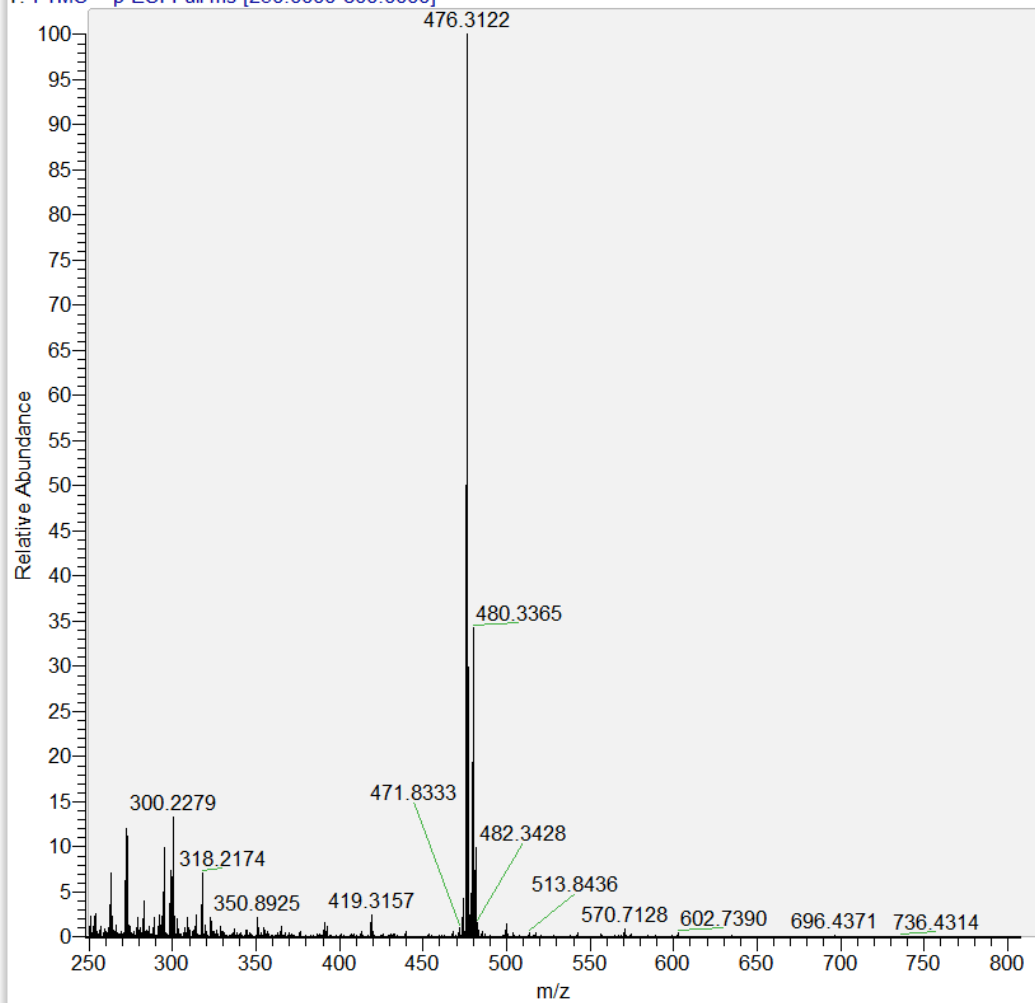
T4 120

20211115iar20 #280-303 RT: 2.02-2.19 AV: 24 NL: 3.75E6
T: FTMS + p ESI Full ms [250.0000-800.0000]



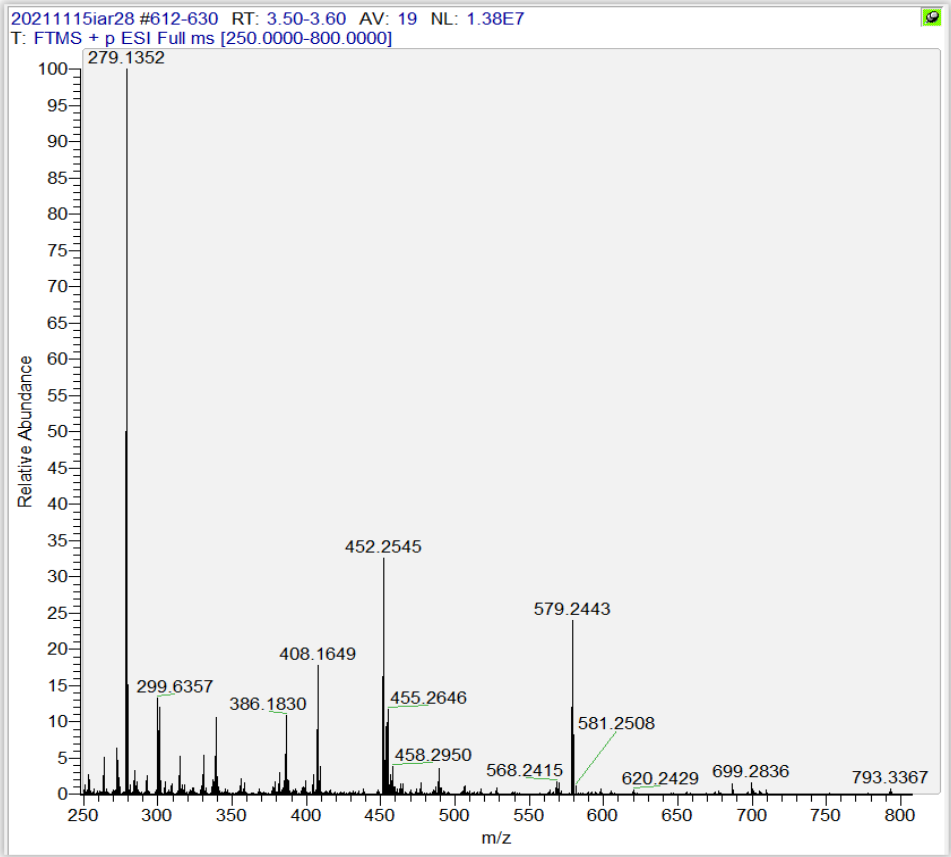
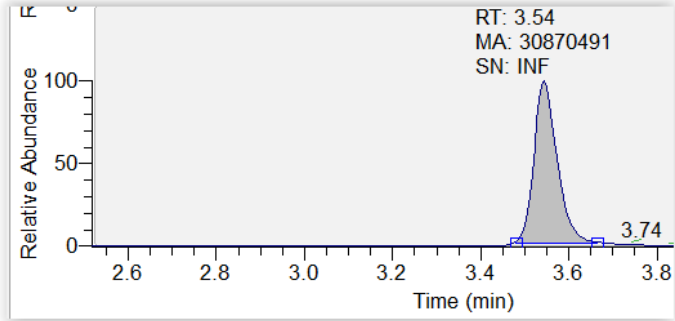
T5 150

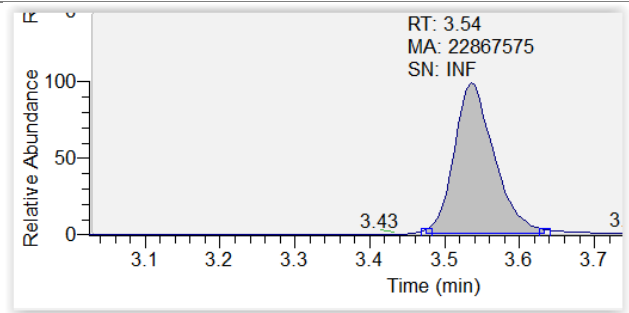
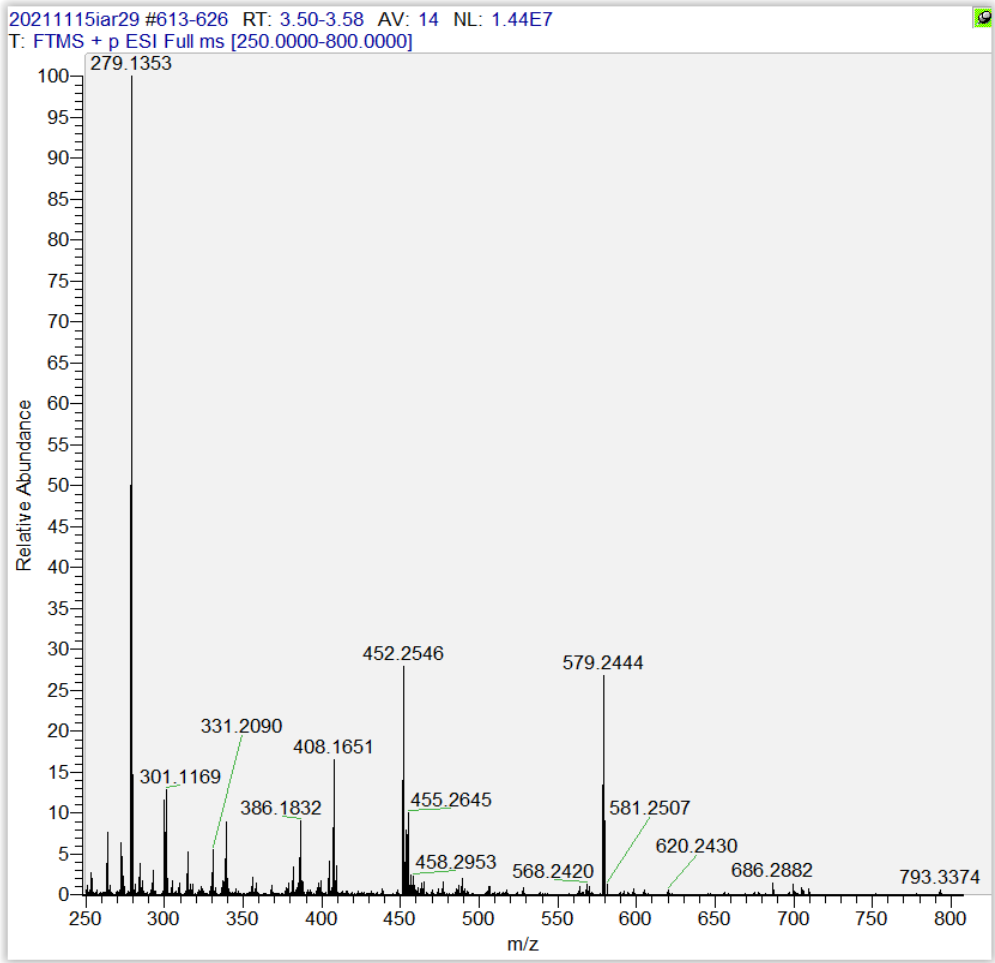
20211115iar21 #281-304 RT: 2.02-2.19 AV: 24 NL: 3.66E6
T: FTMS + p ESI Full ms [250.0000-800.0000]

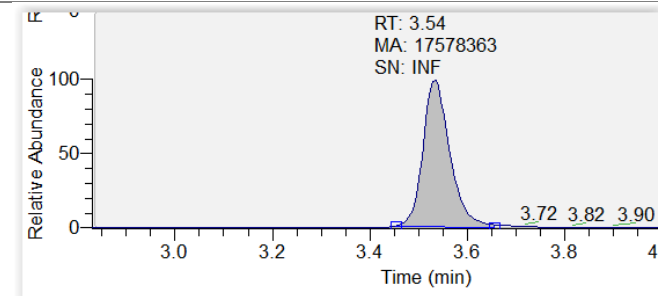
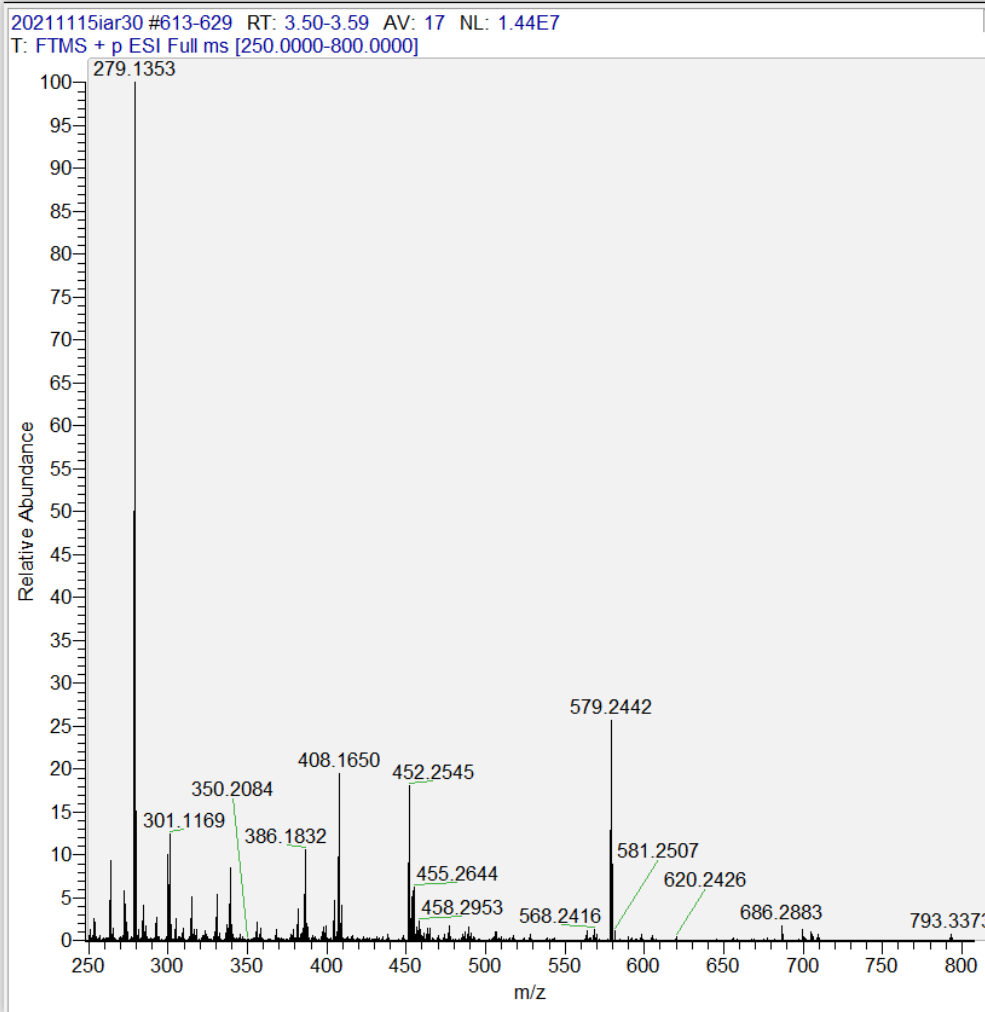


Vedlegg 14

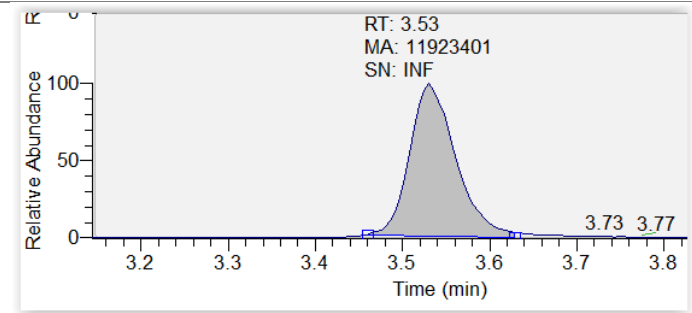
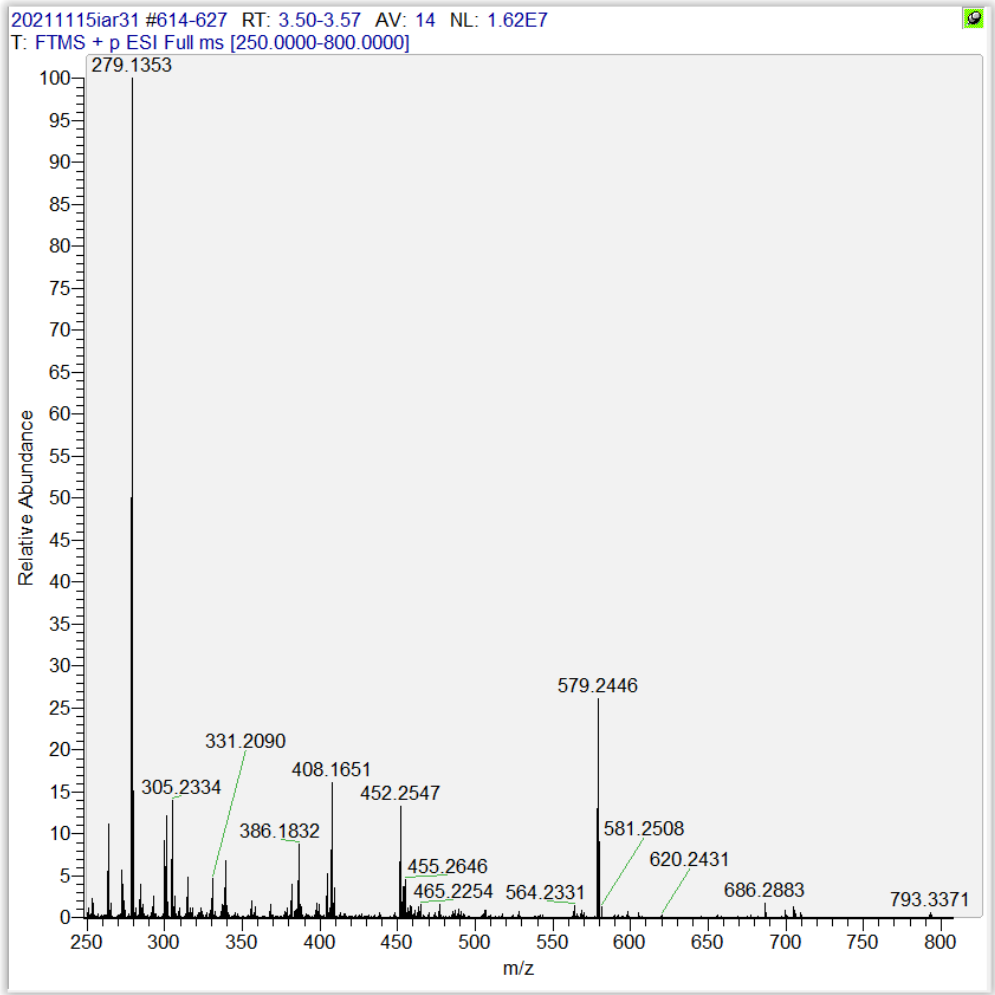
Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortison mono-derivat med eksakt $m/z = 452,2549$

ID	Tid (Min)	MS-Spekter	Kromatogram
TB	0	Ikke påvist	Ikke påvist
T0	0	-	-
T1	30		

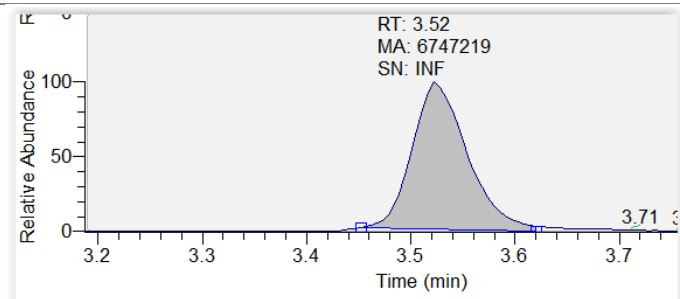
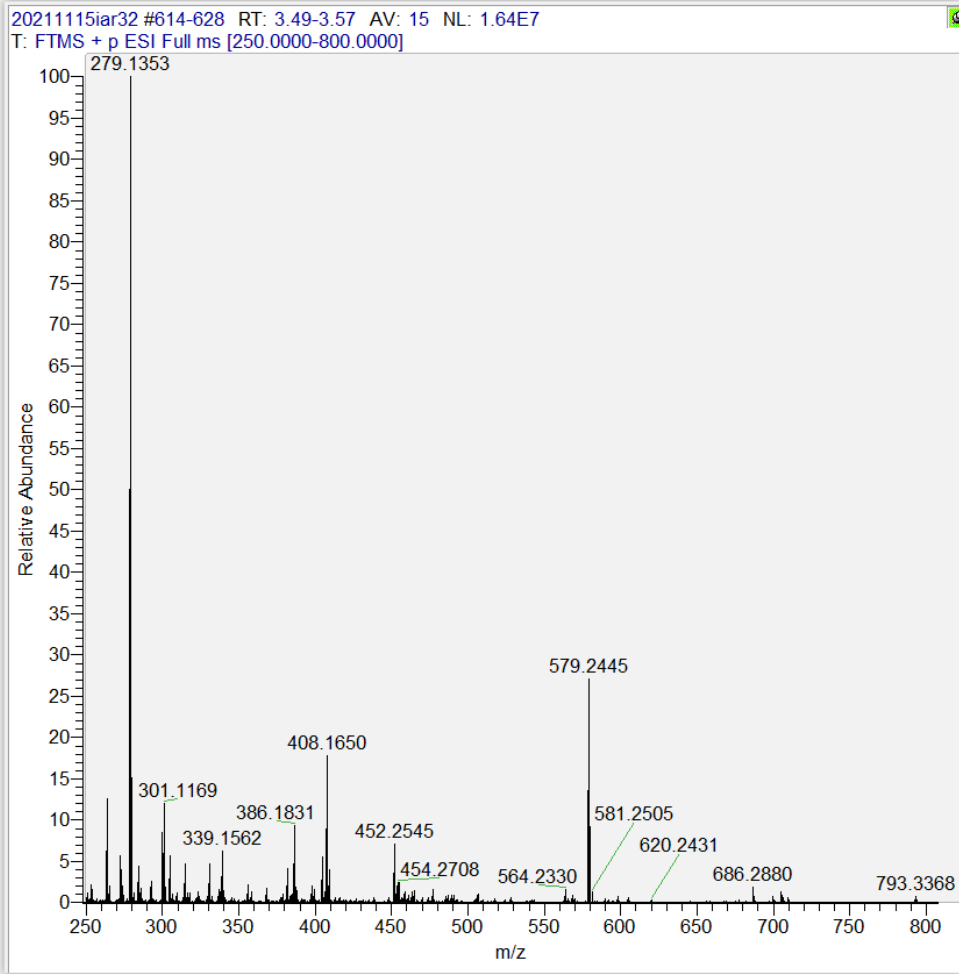




T4 120

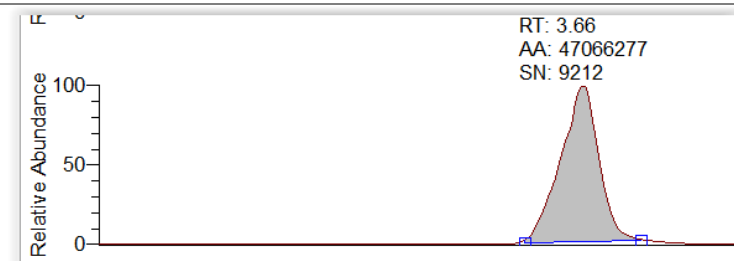
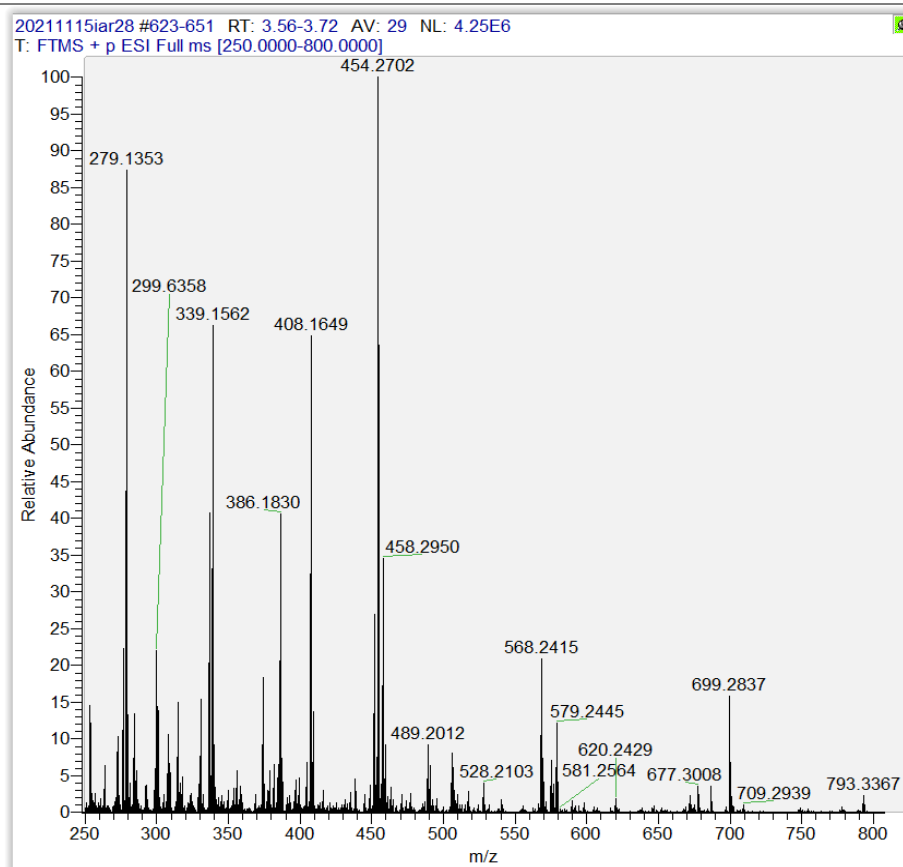


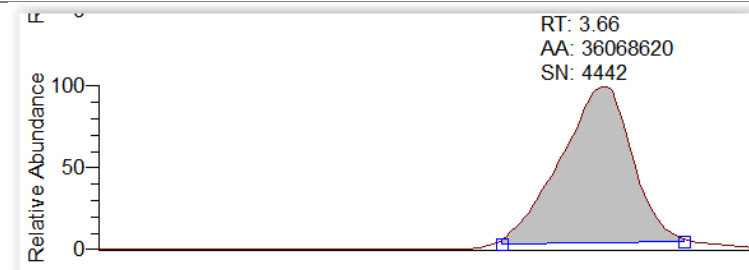
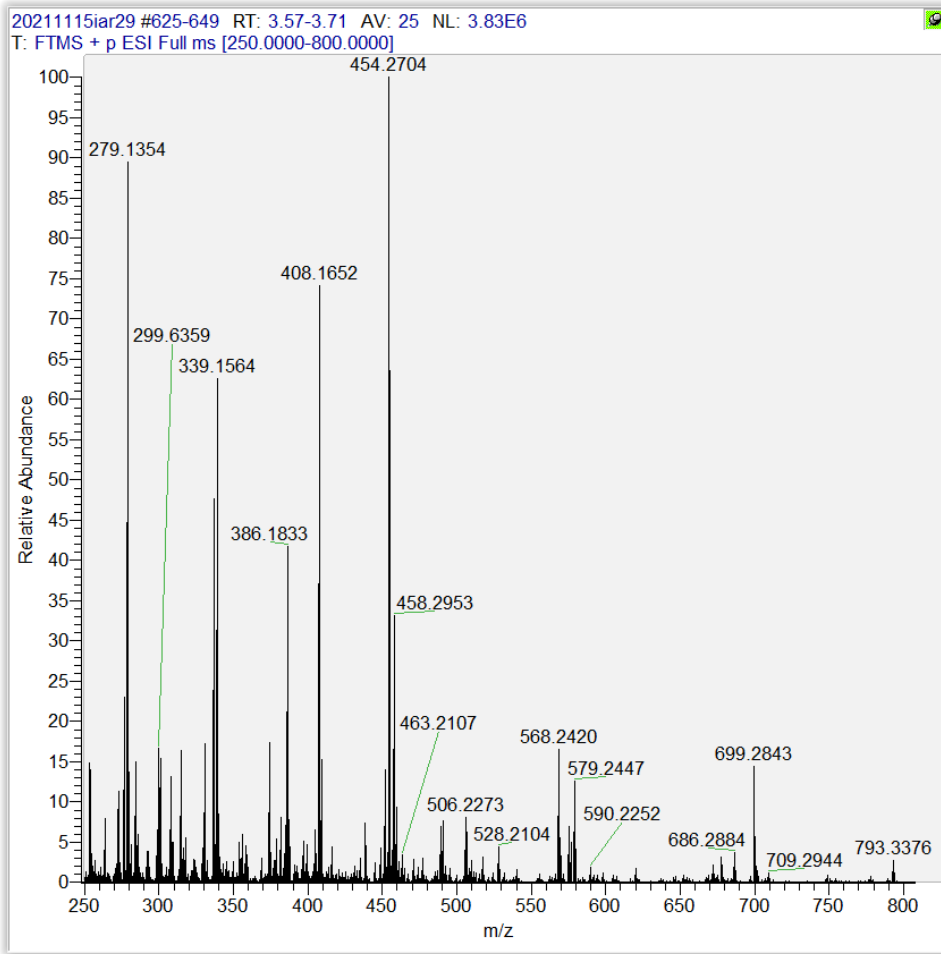
T5 150

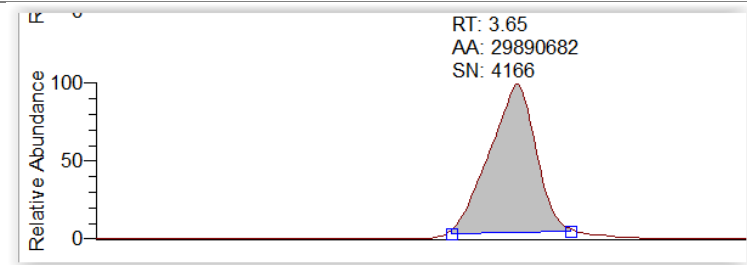
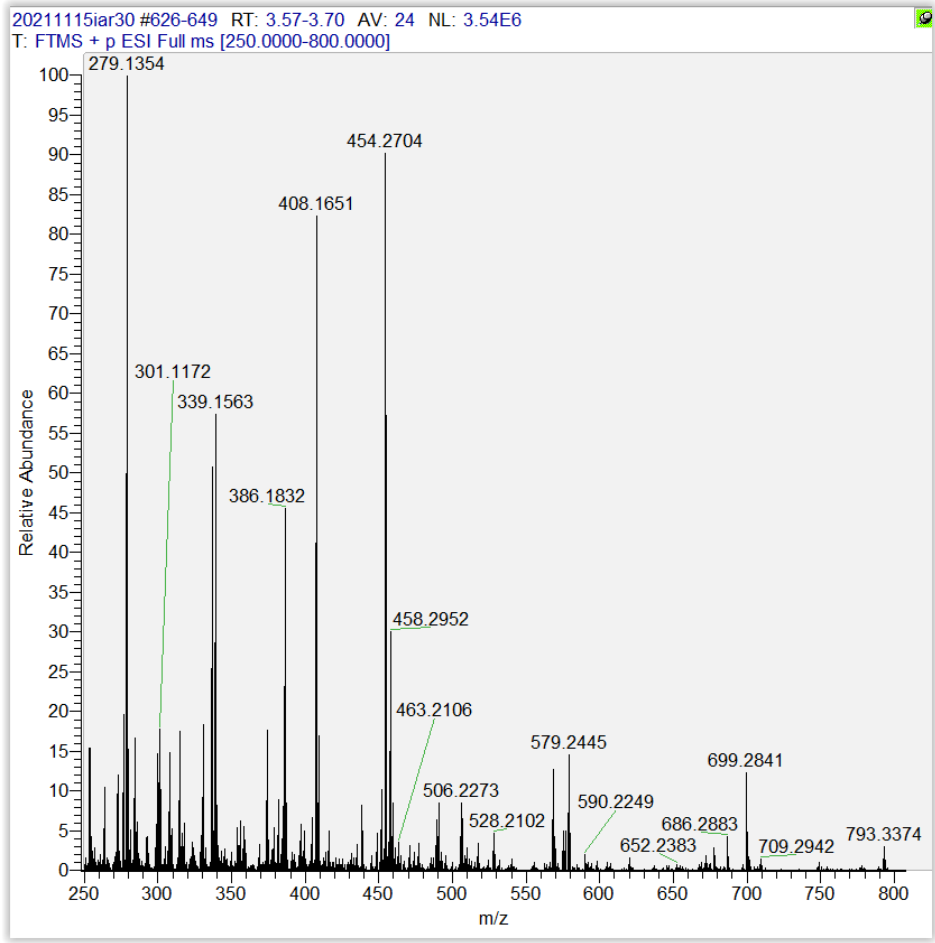


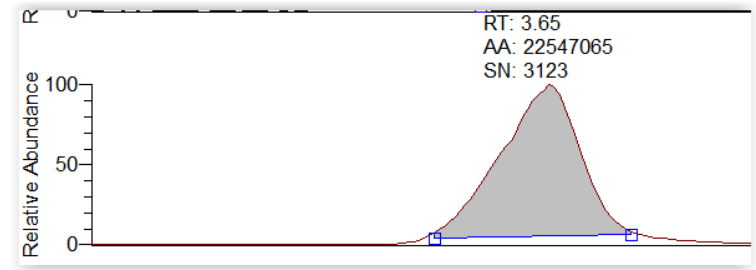
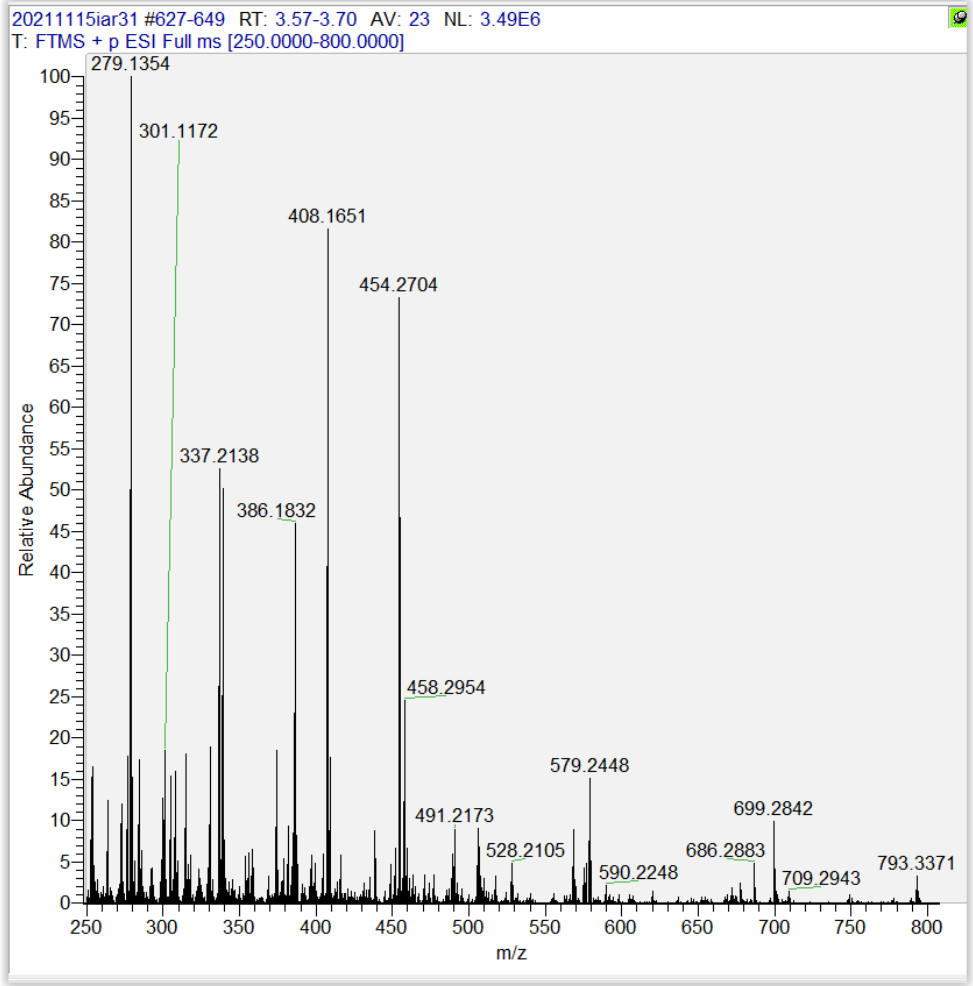
Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortisol mono-derivat med eksakt $m/z = 454,2706$

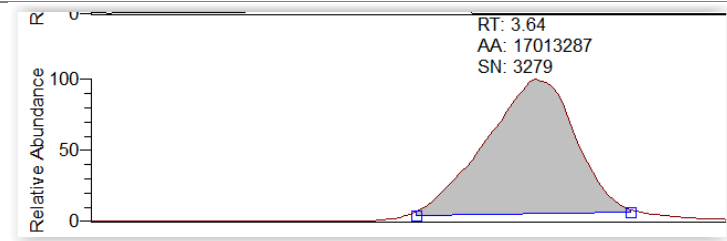
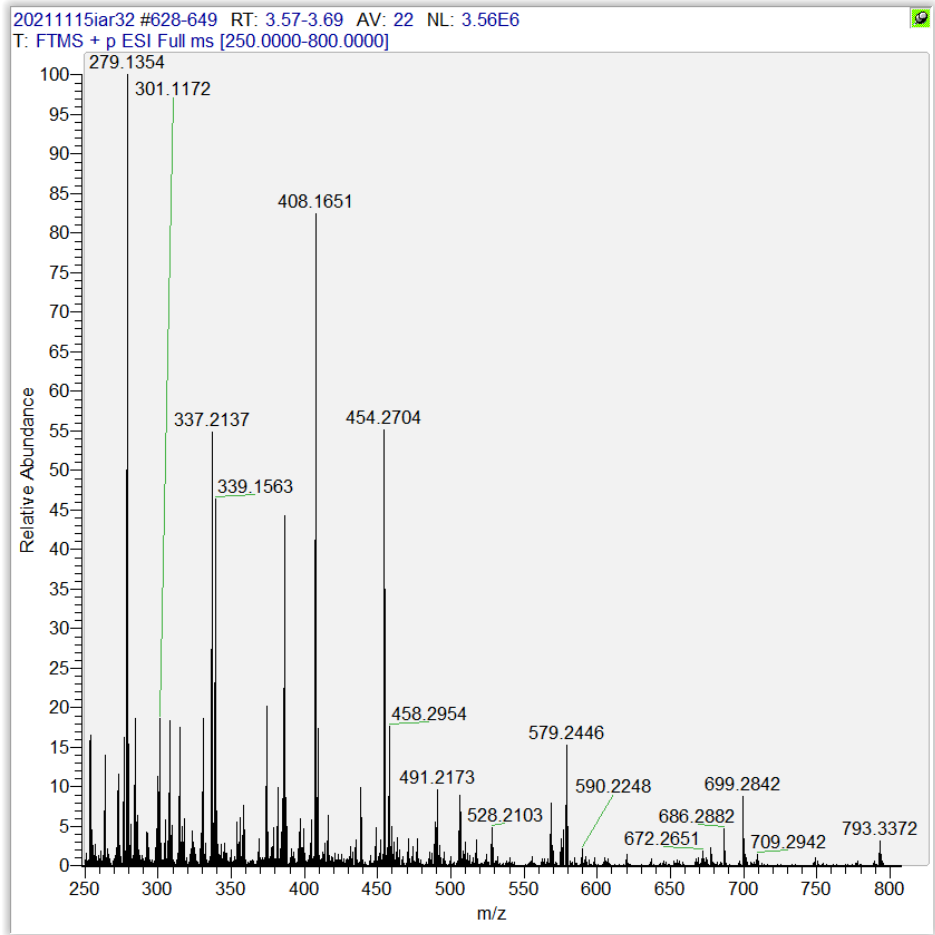
ID	Tid (Min)	MS-spekter	Kromatogram
TB	0	Ikke påvist	Ikke påvist
T0	0	-	-
T1	30		











Vedlegg 15

Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortison di-derivat med eksakt $m/z = 543,3083$

ID	Tid (Min)	Massespekter	Kromatogram	Signal
T1	30	<p>20211115iar28 #590-609 RT: 3.38-3.48 AV: 20 NL: 2.31E7 T: FTMS + p ESI Full ms [250.0000-800.0000]</p>		670 000

Derivasjon med 2-HP med maursyre (0,1 %, v/v) for kortisol-di-derivat med eksakt masse 545,3240

ID	Tid (Min)	Massespekter	Kromatogram	Signal
T1	30	<p>20211115iar28 #539-559 RT: 3.09-3.20 AV: 21 NL: 4.79E6 T: FTMS + p ESI Full ms [250.0000-800.0000]</p> <p>Relative Abundance</p> <p>m/z</p>	<p>RT: 3.15 MA: 1759552 SN: INF</p> <p>Relative Abundance</p> <p>Time (min)</p>	350 000



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway