

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	4
Sammendrag .....	5
Summary .....	6
Forkortelser .....	8
1 Introduksjon .....	10
1.1 Rettstoksikologi .....	10
1.1.1 Rettstoksikologi inkludert i metoden .....	11
1.2 Komponentene i metoden .....	11
1.2.1 Struktur og molekylformler for komponentene i metoden .....	13
1.2.2 Statistikk for komponentene i metoden. ....	14
1.3 Eksisterende metode .....	16
1.4 Målsetning .....	16
2 Teori .....	17
2.1 Kromatografi .....	17
2.1.1 UPLC .....	18
2.2 Massespektrometri .....	19
2.2.1 Ionekilden .....	19
2.2.2 Masse analysator .....	20
2.2.3 Tandem massespektrometri (MS/MS) .....	20
2.3 Prøveopparbeidelse .....	22
2.3.1 Væske-væske ekstraksjon .....	22
2.3.2 Fastfase ekstraksjon .....	22
2.3.3 Filter .....	23
2.4 Matrikseffekter .....	23
2.4.1 Fosfolipider .....	23
2.5 Intern standard .....	24
3 Eksperimentelt .....	25
3.1 Utstyr .....	25
3.1.1 Utstyr og apparatur .....	25
3.1.2 Kjemikalier .....	26

3.1.3	Referansestoffer.....	27
3.2	Tillaging av løsninger .....	28
3.2.1	Tillaging av standarder, kontroll og intern standard.....	28
3.2.2	Tillaging av buffer .....	30
3.2.3	Andre løsninger .....	30
3.3	UPLC-MS/MS.....	31
3.3.1	Kolonne .....	32
3.3.2	Uttesting av UPLC betingelser .....	32
3.3.3	Uttesting av MS/MS betingelser .....	33
3.4	Prøveopparbeidelsen .....	38
3.4.1	Uttesting av væske-væske ekstraksjon .....	38
3.4.2	Uttesting av fast fase ekstraksjon .....	39
3.4.3	Uttesting av filterplater .....	39
3.4.4	Fosfolipider .....	39
3.4.5	Test av utstyr til bruk under prøveopparbeidelse. ....	40
3.5	Validering .....	40
3.5.1	Retensjonstider .....	40
3.5.2	Linearitet.....	40
3.5.3	Presisjon og riktighet.....	40
3.5.4	Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) og minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) .....	41
3.5.5	Overdrag .....	41
3.5.6	Ekstraksjonsutbytte.....	41
3.5.7	Matrikseffekter .....	42
3.5.8	Stabilitet og robusthet.....	42
3.5.9	Sammenligning med gammel metode .....	43
4	Resultater og diskusjon .....	44
4.1	Valg av UPLC betingelser .....	44
4.1.1	Valg av gradient programmet .....	44
4.1.2	Mobilfaser .....	46
4.2	Valg av MS/MS betingelser .....	48
4.3	Valg av prøveopparbeidelse .....	49

---

4.3.1	Væske-væske ekstraksjon.....	49
4.3.2	Fast fase ekstraksjon. ....	49
4.3.3	Filterplater .....	50
4.3.4	Fosfolipider .....	50
4.3.5	Resultat på test av utstyr, tette lokk og 96 kanals pipette.....	52
4.3.6	Sammenligning av prøve opparbeidelsene. ....	53
4.4	Metodevalideringen .....	54
4.4.1	Retensjonstider .....	54
4.4.2	Linearitet.....	55
4.4.3	Presisjon og riktighet.....	56
4.4.4	Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) og minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) .....	64
4.4.5	Overdrag .....	66
4.4.6	Ekstraksjonsutbytte.....	66
4.4.7	Matrikseffekter .....	67
4.4.8	Stabilitet og robusthet.....	69
4.4.9	Sammenlikning med eksisterende metode .....	76
4.4.10	Spesifisitet.....	78
4.5	Videre arbeid.....	78
5	Konklusjon.....	79
6	Referanseliste.....	80
7	Appendiks .....	82
7.1	Oversikt over struktur på foreldre ion og fragment ioner i MRM-overgangene i metoden. ....	82
7.2	Kromatogram av komponentene i TargetLynx, topper med og uten glatting er sammenlignet med 0-prøve. ....	86
7.3	Linearitet for komponentene, fra 0 til 100µM, både ved bruk av høyde og areal i beregningen.....	90
7.4	Presisjon og riktighet for andre komponenter enn amfetamin, metamfetamin og MDMA. ....	92
7.5	Spesifisitet.....	102

## Forord

Masteroppgaven ble utført ved Nasjonalt folkehelseinstitutt, divisjon for rettsmedisin og rusmiddelforskning, avdeling for rusmidler (REAR), i samarbeid med universitetet for miljø og biovitenskap (UMB), institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap i perioden januar 2010 til mars 2012.

Takk til hovedveilederen min ved UMB, Dag Ekeberg, med gode tips og tilbakemeldinger.

Mange takk til veileder Dag Helge Strand, avdelingsdirektør ved REAR, alltid like rolig, selv om det kan koke litt andre steder. Alltid med åpen kontordør, klar til å løse problemer, og ingen problemer er for store. Vi tar en ting om gangen!

En stor takk til alle kollegaene på REAR, en fantastisk gjeng, alltid positive og står på, også i kaos perioder med full ombygging av avdelingen. Jeg har fått mye god støtte og hjelp, det er også bra med en påminnelse om at dette er selvvalgt i vanskelige perioder, løft opp hodet, dette går bra! Jeg ønsker spesielt å nevne Thomas Berg, som alltid har tid til å ta en liten diskusjon på teorier og fremgangsmåter, og for hans vurderinger og tilbakemeldinger i teori delen i oppgaven. Grete Lied Sigernes, som har utført en stor del av beregningene av serier benyttet under valideringen. Og Eline Buchman, vår engelskeksperter, som sjekket at summary var forståelig og kom med gode veiledninger. Også takk til kollega Gerrit Middelkoop på avdeling for legemiddelanalyser, REAL, alltid full kontroll, også på statistikken.

Tusen takk til samboer Anders, og mine to søte barn, Silje og Atle, som har vært svært hjelpsomme og forståelsesfulle. Når frustrasjonen har vært på topp på grunn av referanseverktøy, kranglete datamaskin, og lignende, da funkete det bra å roe ned med kaffe, boller og vafler 😊!

Rasta, 13.mars 2012

Mariann Nilsen

## Sammendrag

Det er utviklet en metode til kvantitativ bestemmelse av amfetaminer i blod ved bruk av UPLC-MS/MS, der prøveopparbeidelsen er ACN MeOH felling av blod, og filtrering av supernatant på Captiva ND<sup>LIPID</sup> 96-brønns filterplater. I metoden er det amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA, MDEA, PMA, PMMA, mCPP, 2C-B, MDPV, katinon, metkatinon, efedrin, pseudoefedrin, norefedrin og norpseudoefedrin som kvantifiseres, ved bruk av 2 <sup>13</sup>C og 1 deuterium merket intern standard. Metoden skal erstatte en eksisterende metode for bekreftelse av amfetaminer i blod ved Nasjonalt folkehelseinstitutt, divisjon for rettsmedisin og rusmiddelforskning (FHI-RE).

Under uttesting av prøveopparbeidelse, var det et fokus på 96-brønns-format, fosfolipider og enkelhet. Bruk av filterplater ble sammenlignet med væske-væske ekstraksjon og flere fastfase (SPE) ekstraksjoner, de var enklere og mer effektive på å fjerne fosfolipider med fremgangsmåtene benyttet i denne oppgaven. Væske-væske ekstraksjon ble ikke testet med tanke på fosfolipider, da denne fort viste seg vanskelig å gjennomføre på 96-brønns format. 4 ulike filterplater ble testet, Captiva, Ostero, HybridSPE-Phospholipid og Strata Impact.

Til separasjon av komponentene ble det benyttet en C18 kolonne, omvendtfase separasjonssystem, der mobilfasene er 5 mM ammoniumformatbuffer pH 10,2 og metanol. Et gradientprogram på 6 minutter, gir en god separasjon på komponentene, amfetamin og PMA har en liten overlapp, det samme gjelder 2C-B og mCPP. I MS metoden er komponentene delt inn i grupper, der hver komponent har minimum to MRM overganger.

FHI-RE er et akkreditert laboratorium, ved validering benyttes divisjonens kvalitetshåndbok, som følger US Food and Drug Administration (FDA) sitt dokument ISO 17025. I denne metoden er det amfetamin, metamfetamin og MDMA som er de akkrediterte komponentene, disse tre tilfredsstillende. For de andre komponentene i metoden var det også tilfredsstillende resultater, men PMA, mCPP og 2C-B ligger i grenseområdet med en påvisningsgrense i et litt usikkert område.

Alle komponentene er lineære i standardkurve området, beregnet minste detekterbare konsentrasjon (MDK) og minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) ligger innenfor fastsatt påvisningsgrense, og det var en god presisjon, stabilitet og holdbarhet på prøvene. Riktigheten for PMA og PMMA hadde et avvik, her er det i ettertid laget nye standarder og kontroller, ellers stemte riktigheten bra for alle de andre komponentene.

Overdrag test viser at overdrag kan bli et problem ved høye konsentrasjoner av spesielt MDPV, men også PMMA og 2C-B kan få overdrag > påvisningsgrense ved konsentrasjoner over 10 µM. Ekstraksjonsutbytte er bra, ~80% på konsentrasjonen av ekstraktet, men også et tap på 20% i volum ved bruk av 96 kanals pipette, som ikke har betydning for resultatene i denne oppgaven. Matrikseffekter er undersøkt, det er et par tilfeller av ione forsterkelse, men stabiliteten på responsen til intern standardene tyder på lite problemer med matrikseffekter.

## Summary

A method for quantitative determination of amphetamines in blood by UPLC-MS/MS has been developed. Sample preparation is performed by ACN:MeOH blood precipitation and filtration of the supernatant on Captiva ND<sup>LIPID</sup> 96-wells filter plates. The method determines amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, MDEA, PMA, PMMA, mCPP, 2C-B, MDPV, cathinon, methcathinon, ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and norpseudoephedrine concentrations quantitatively. The method will replace an existing method for confirmation of amphetamines in blood at "The Norwegian Institute of Public Health, division of forensic medicine and drug research (FHI-RE)

During evaluation of sample preparation, the focus was on utilizing a 96-well-format, efficient removal of phospholipids, and ease of use. Use of filter plates was compared to liquid-liquid extraction and several solid phase (SPE) extractions. The filter plates were easier to use and more effective in removing phospholipids with the approach used during this study. Liquid-liquid extraction was not tested with regard to phospholipids, because this proved to be difficult to carry out on 96-wells format. 4 different filter plates were tested, Captiva, Ostero, HybridSPE-Phospholipid and Strata Impact.

A reversed phase system was used to separate the components on a C18 column, with a mobile phase containing 5 mM ammoniumformate buffer pH 10,2 and methanol. A gradient program lasting 6 minutes gives a good separation of all the components. Amphetamine and PMA has a small overlap, which is also the case for 2C-B and mCPP. In the MS methods the components are divided into groups, where each component has a minimum of two MRM transitions.

FHI-RE is an accredited laboratory. Validation is performed using the division's quality handbook. The handbook follows US Food and Drug Administration (FDA) document ISO 17025. For the current method, amphetamine, methamphetamine and MDMA are the accredited components. All three components meet the criteria sufficiently. Sufficient results were also obtained for the other components in the method, but PMA, mCPP and 2C-B lies in a border area where the detection line lies in a little uncertain area.

All components are linear in the standard curve area, and the calculated limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) lies within the determined detection limit. The precision, stability, and durability is good, for the analyzed samples. Accuracy for PMA and PMMA had one deviation, thus it has later been produced new standards and quality controls. Beside this, the accuracy was good for all other components.

Testing shows that carry over may be a problem in high concentration samples, especially for MDPV, but also PMMA and 2C-B may be subject to carry over detection limit with concentration above 10 µM. Extraction recoveries are good, ~80% of the concentration of the extract. A loss of 20% of the volume when using 96-canals pipette was also observed, but this has no signification for the present study. The matrix effects are examined, a couple of

cases of ion enhancement were observed. Still, the stability of the internal standard response indicates no problem with matrix effects.

## Forkortelser

µL	mikroliter
µM	mikromol per liter
2C-B	4 brom-2,5-dimetylphenetylamin
ACN	acetonitril
cm	sentimeter
CV	standardavvik/ gjennomsnitt = RSD
ES+	positiv elektropray modus
eV	elektron volt
FHI	Nasjonalt folkehelseinstitutt
FHI-RE	Nasjonalt folkehelseinstitutt, divisjon for retts toksikologi og rusmiddelforskning.
GC	gasskromatografi
H <sub>2</sub> O	vann
HCl	saltsyre
HPLC	high performance liquid chromatography
ktr	kontroll
kV	kilovolt
LC	væskkromatografi
L/hr	liter per time
m/z	masse per ladning
mCPP	meta-klorfenyl piperazin
MDA	metylenedioksyamfetamin
MDK	minste detekterbare konsentrasjon
MDMA	metylenedioksymetamfetamin
MDPV	metylenedioksyprovaleron
mM	millimol per liter
MeOH	metanol
min	minutter
MKK	minste kvantifiserbare konsentrasjon
mL	milliliter
ml/min	milliliter per minutt
MRM	multiple reaction monitoring
MS	massespekter
MS/MS	tandem massespektrometer
n og N	antall prøver
NaOH	natriumhydroksyd
nM	nanomol per liter
PM	periodisk vedlikehold
PMA	para-metoksyamfetamin



PMMA	para-metoksymetamfetamin
RE	Divisjon for rettsmedisin og rusmiddelforskning
REAR	Divisjon for rettsmedisin og rusmiddelforskning, avdeling for rusmiddelanalyser
RRT	relativ retensjonstid (retensjonstid analytt/ retensjonstid intern standard)
RSD	relativt standardavvik (standardavvik/ gjennomsnitt verdi)
RT	retensjonstid
s	sekunder
SD	standardavvik
snitt	gjennomsnitt
SPE	fastfase ekstraksjon
std	standard
TIC	total ion chromatogram
TOF	time of flight (masseanalysator)
u og V	mobilfase hastighet
UMB	Universitet for miljø og biovitenskap
UPLC-MS/MS	ultra performance liquid chromatography- tandem massespetrometri

## 1 Introduksjon

Amfetamin og metamfetamin er blant de mest brukte stimulerende rusmidlene i Norge i dag, bruken av disse økte kraftig på 1990 tallet [1]. I tillegg til disse to økte bruken av ecstasy på midten av 1990-tallet, mens det de siste årene er de ecstasy lignende stoffene, para-metoksyamfetamin (PMA) og para-metoksymetamfetamin (PMMA), som har fått mest oppmerksomhet i media [2]. Amfetamin, metamfetamin, ecstasy og flere ecstasy lignende komponenter er komponenter som skal kvantifiseres i oppgaven.

Khat er et rusmiddel som kan gi psykose, og efedrin er en astma medisin som kan gi uventet død hos små barn [3, 4]. Virkestoffene i khat er katinon og norpseudoefedrin, dette er andre komponenter som skal kvantifiseres, sammen med efedrin, pseudoefedrin og norefedrin.

De fleste stoffene i oppgaven er stoffer på narkotikalistene, det er metylenedioksypropyvaleron (MDPV) og de fire efedrin stoffene som ikke står på listen [5]. Blodprøvene som kommer inn til Nasjonalt folkehelseinstitutt, divisjon for rettsmedisin og rusmiddelforskning (FHI-RE) dreier seg ofte om påvirkning ved bilkjøring, ulykker eller vold. Amfetamin og metamfetamin er vanlige komponenter å finne i blodprøvene fra disse hendelsene, andre komponenter er sjeldne, men viktige å fange opp når de dukker opp. Både viktig informasjon i forbindelse med etterforskninger, for å finne årsak til uventet dødsfall, og for å informere befolkningen i Norge dersom farlige stoffer har tilgjengelig ute på gata.

Denne oppgaven er utvikling av en bekreftelses metode for amfetaminer i blodprøver, som skal erstatte en eksisterende metode. Metoden skal benyttes til å bekrefte og kvantifisere amfetaminer som er funnet i screening metode.

### 1.1 Rettstoksikologi

FHI-RE er den nasjonale kompetanseinstitusjon for rettstoksikologi og rusmiddelforskning, som skal overvåke bruken av rusmidler ved skader, ulykker og vold i Norge [6]. Instituttet prøver å få en best mulig oversikt over rusmiddelbruken i landet.

Forensic toxicology laboratory guidelines [7] deler rettstoksikologien inn i tre hovedgrupper, obduksjonssaker, påvirkningssaker og brukssaker. Obduksjonssaker er i hovedsak blodprøver som er tatt fra avdøde for å si noe om legemidler eller rusmidler har hatt betydning for dødsfallet. Påvirkningssaker er analyseresultater fra blodprøver som kan brukes til å vurdere påvirkning i forbindelse med straffbare forhold. Prøvene tas av politiet og brukes ved mistanke om rus ved bilkjøring (veitrafikk saker), overgrepssaker, vold og lignende. Når det gjelder brukssaker er det mest urinprøver som brukes, dette fordi vi finner de fleste rusmidlene lengre i urin enn i blod. Dette er saker der det er spørsmål om bruk av stoffer på narkotikalistene, bruk av rusmidler i kriminalomsorg, yrkesliv, forsvaret eller olje- og rederi bedrifter, eller i medisinsk diagnostikk som blant annet forgiftning, overdosering eller feilmedisinering og ved legemiddelassistert rehabilitering.

Det skal utføres en screening analyse, der alle positive resultater skal analyseres på en uavhengig bekreftelses metode. For å sikre kvaliteten på alt som utføres på RE, er divisjonen akkreditert, dette innebærer at alle ledd fra prøvemottak til fortolkning av prøveresultat er under kontinuerlig overvåkning.

### 1.1.1 Rettstoksikologi inkludert i metoden

Flere av komponentene som inngår i metoden er komponenter som står på den norske narkotikalistens, de som får påvist bruk vil derfor omfattes av narkotikalovgivningen [8].

De aller fleste sakene som skal analyseres i metoden er påvirkningssaker, for disse sakene har RE i disse dager utarbeidet faste grenser for påvirkning i blodprøvene [9]. Det er satt forbundsgrenser (påvisningsgrense) og straffeutmålingsgrenser på samme måte som vi har for alkohol ved 0,2 (forbundsgrense), 0,5 og 1,2 promille, der påvirkning skal tilsvare alkoholpåvirkning ved nevnte promiller. Dette prosjektet ble klart 1. februar 2012, og angår denne oppgaven.

I denne metoden er det amfetamin, metamfetamin og metylenedioksymetamfetamin (MDMA) som inngår i prosjektet, det er også disse tre komponentene som er de akkrediterte komponentene i metoden. På grunn av lite eksperimentelle studier og vanskeligheter med å sette grenser tilsvarende 0,5 og 1,2 promille, blir det for disse tre komponentene kun satt en påvisningsgrense i faste grenser.

## 1.2 Komponentene i metoden

Amfetamin og metamfetamin er sentralstimulerende stoffer, som blant annet gir virkning på sentralnervesystemet, som økning i puls, blodtrykk, åndedrett og temperatur [1]. Det blir en større risiko for hjerte- og karsykdommer som hjerneblødning, hjerteinfarkt og hjerterytmeforstyrrelser på grunn av økt stimuli. Fordi det er redusert evne til konsentrasjon om flere oppgaver, nedsatt kritisk sans og økt sjansetaking, øker risikoen for ulykker. Metamfetamin er et mer potent stoff enn amfetamin, slik at lavere dose metamfetamin gir samme rus som amfetamin. Ved funn av metamfetamin i en prøve, sees også ofte amfetamin, siden amfetamin også er en metabolitt av metamfetamin.

Ecstasy er et rusmiddel som ble spesielt populært i "house parties" på 1990 tallet [2].

Ecstasy er primært MDMA, men brukes også om andre designer drugs som metylenedioksyamfetamin (MDA) og metylenedioksyetylmetamfetamin (MDEA), som er nært beslektet med MDMA. Ecstasy er stimulerende som amfetamin, men de er også hallusinogene som LSD. Hallusinasjoner er sansebedrag, på syn, hørsel og følelser, noe som kan gi forfølgelsestanker, panikk og angst. MDA er på samme måte som amfetamin en metabolitt av både MDMA og MDEA, derfor vil vi ofte se MDA ved positive funn av MDMA og MDEA.

MDPV, meta-klorfenyl piperazin (mCPP), 4 brom-2,5-dimetylphenetylamin (2C-B), PMA og PMMA er ecstasylignende stoffer, her er det spesielt PMMA som fikk mye omtale i 2010. I Norge fikk vi flere dødsfall etter inntak av PMMA, som fikk navnet "Death" [10]. Fordi

effekten ofte inntreffer langsommere ved bruk av PMMA, oppfattes det som et svakt stoff som kan føre til gjentatte inntak og/eller større inntak. I tillegg anses stoffet å være mer toksisk enn amfetamin og ecstasy, forskjellen på dose som gir rus eller død er liten. Ved funn av PMMA i en prøve, vil det også ofte finnes PMA, siden PMA er en metabolitt av PMMA.

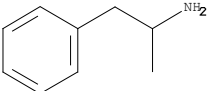
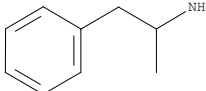
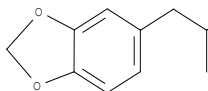
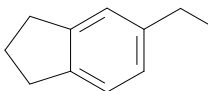
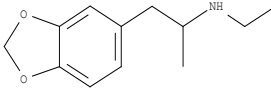
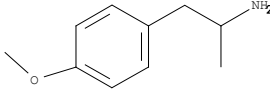
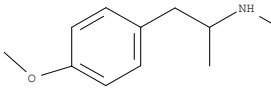
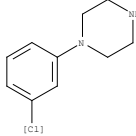
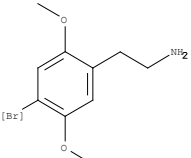
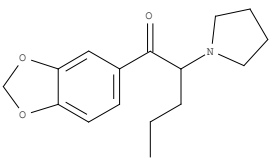
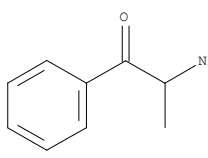
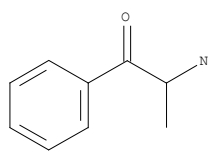
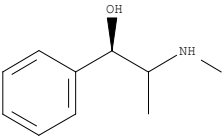
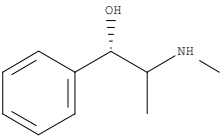
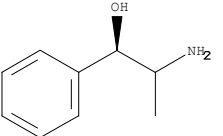
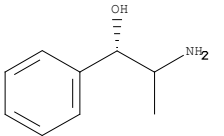
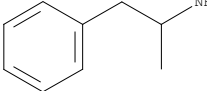
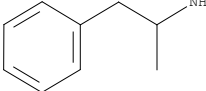
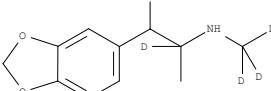
Et annet rusmiddel som er blitt kjent i Norge er khat, det har kommet til Norge gjennom økt innvandring fra øst Afrika, der dette er et vanlig rusmiddel [3, 11]. I khat finnes de amfetaminlignende stoffene katinon, katin og norefedrin. Bruk av khat kan utløse psykoser, mani, hyperaktivitet, paranoide tanker og aggressivitet, i tillegg til stimulerende effekt på hjerte- og karsystemet.

Efedrin og pseudoefedrin er to legemidler som også er med i metoden, disse brukes mot luftveisplager som astma. Norefedrin som er et av stoffene i khat er også et legemiddel som brukes ved luftveisinfeksjoner, og ved urininkontinens hos kvinner. Disse stoffene er med i metoden siden de er amfetaminlignende stoffer. Efedrin og pseudoefedrin har samme molekylvekt og molekylformel, de har 2 kirale sentre, så her er det fire stereoisomere, to som separeres (efedrin og pseudoefedrin), og to som ikke separeres, uten bruk av spesial (kiral) kolonne. Norefedrin og norpseudoefedrin har også to kirale sentre, dette er de to komponentene av fire som kan separeres her. Norefedrin blir også kalt fenylpropanolamin, mens katin brukes også om norpseudoefedrin. Efedrin er spesielt interessant å se etter i prøver fra barn, der det har oppstått et uventet dødsfall [4, 12]. Efedrin som er et hostemiddel, kan gi alvorlige bivirkninger hos små barn på grunn av påvirkningen på sirkulasjon og sentralvervesystemet.

### 1.2.1 Struktur og molekylformler for komponentene i metoden

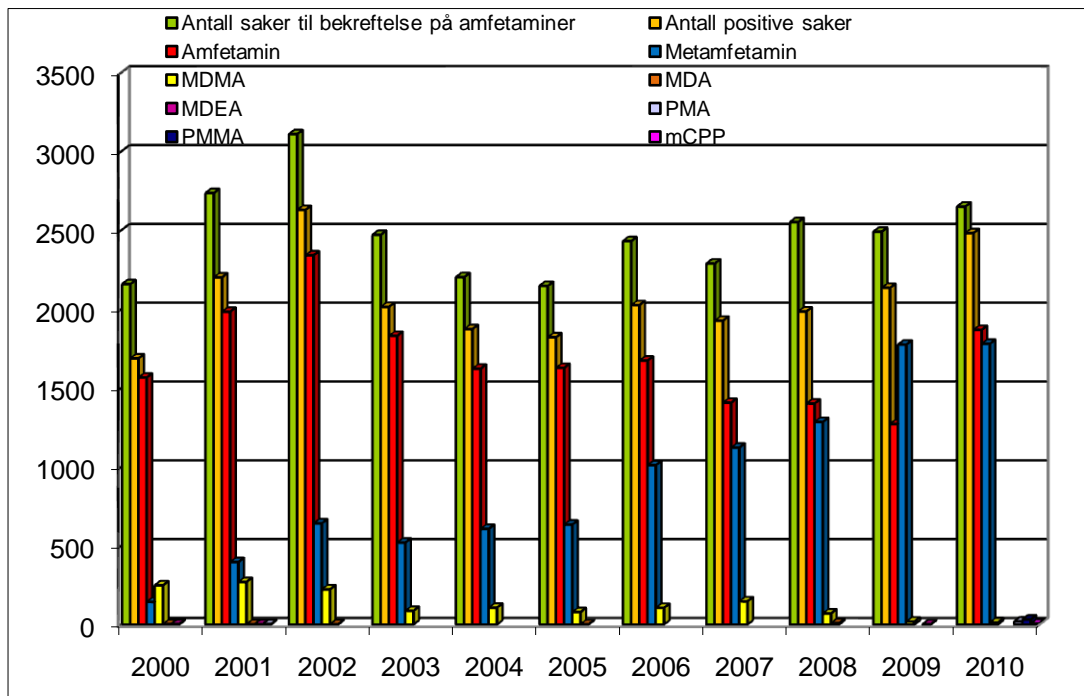
Tabell 1-1 viser hvor like komponentene i metoden er, det er mCPP, 2C-B og MDPV som skiller seg mest ut. Alle komponentene har en benzenring og en nitrogengruppe, som primær, sekundær eller tertiær amin. Amfetamin har primær amin, som MDA (metylenedioxyamfetamin), PMA (para-metoksyamfetamin) og katinon. Alle komponentene med metamfetamin, som metylenedioxyamfetamin (MDMA) og para-metoksyamfetamin (PMMA), samt metkatinon, har en metylgruppe festet til nitrogengruppa, slik at vi får sekundær amin. Forskjellen på efedrin/ pseudoefedrin og norefedrin/ norpseudoefedrin er den samme som forskjellen som metamfetamin og amfetamin, en metylgruppe.

Tabell 1-1 Komponentene i metoden, her oppgitt med eksakt molekylvekt, siden det er eksakte masser som benyttes i MS'en.

 <p>Amfetamin MV 135,10 C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N</p>	 <p>Metamfetamin MV 149,12 C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N</p>	 <p>MDMA MV 193,11 C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub></p>	 <p>MDA MV 179,09 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub></p>
 <p>MDEA MV 207,13 C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub></p>	 <p>PMA MV 165,12 C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO</p>	 <p>PMMA MV 179,13 C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO</p>	 <p>mCPP MV 196,08 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub></p>
 <p>2C-B MV 259,02 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>Br</p>	 <p>MDPV MV 275,15 C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub></p>	 <p>Katinon MV 149,08 C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO</p>	 <p>Metkatinon MV 163,10 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO</p>
 <p>Efedrin MV 165,12 C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO</p>	 <p>Pseudoefedrin MV 165,12 C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO</p>	 <p>Norefedrin MV 151,10 C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO</p>	 <p>Norpseudoefedrin MV 151,10 C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO</p>
 <p><sup>13</sup>C<sub>6</sub>amfetamin MV 141,12 *6 <sup>13</sup>C i benzenringen</p>	 <p><sup>13</sup>C<sub>6</sub>metamfetamin MV 151,14 *6 <sup>13</sup>C i benzenringen</p>	 <p>MDMA-d5 MV 198,14 C<sub>11</sub>D<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub></p>	

### 1.2.2 Statistikk for komponentene i metoden.

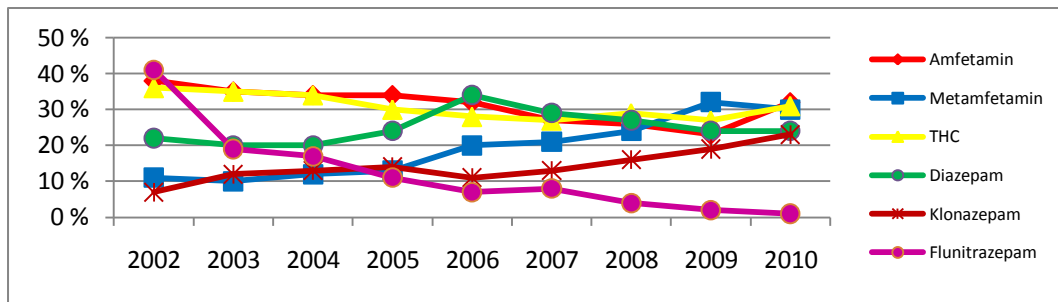
Bekreftelse av amfetaminer i blod er en av de store bekreftelses metoder på RE. I 2010 hadde divisjonen ca 2700 saker til bekreftelse av amfetaminer, det utgjør litt over 50 saker i uka, på grunn av paralleller blir det over 100 prøver i uka. Totalt antall saker til bekreftelse på amfetaminer, antall positive etter bekreftelse og hvilke komponenter som blir funnet, se Figur 1-1. Figuren viser funn i perioden 2000 til 2010 [13].



Figur 1-1 Totalt antall saker til bekreftelse av amfetaminer ved REAR fra år 2000 til 2010.

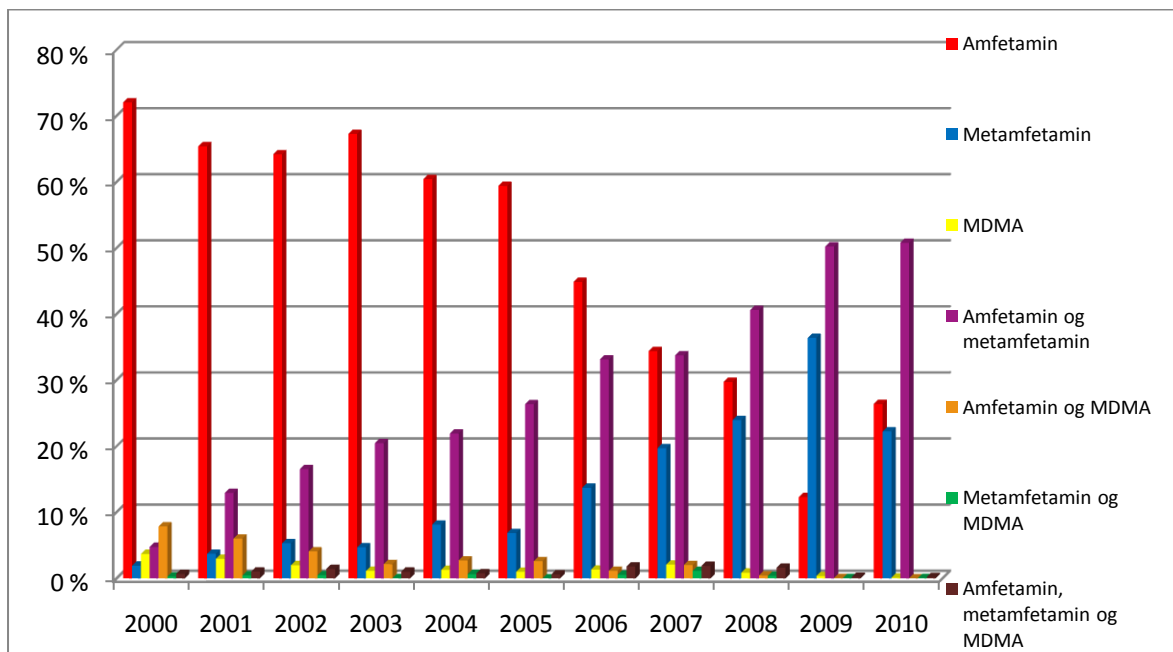
I dette totale antall av saker som er positive på amfetamin og metamfetamin var i 2010 ca 94 % påvirkningssaker, hvor 81% var veitrafikk saker og 13% andre påvirkning saker fra politi. Ca 5% var obduksjonssaker og ca 1% fra medisinske saker, prosjekt og kvalitetskontroller. Men for PMA og PMMA det samme året, er ca 45% veitrafikk saker, 32% obduksjons saker og 23% andre påvirkning saker fra politiet. Betydelig flere obduksjonssaker på PMA og PMMA i forhold til funn, sammenlignet med amfetamin og metamfetamin.

FHI gir hvert år ut rusmiddelstatistikk, funn i blodprøver hos bilførere mistenkt for påvirket kjøring [13]. Siden veitrafikk saker utgjør ca 80% av prøvene til metoden, er det tatt med "TOPP 5" funn fra 2002 til 2010, se Figur 1-2. "Topp 5" er de vanligste komponenter utenom alkohol i blodprøver fra veitrafikk saker, det er totalt seks komponenter som har vekslet mellom å være fem på topp, derfor er alle de seks komponentene med i hele perioden. Blant disse 6 finner vi to av komponentene i denne metoden, amfetamin og metamfetamin i ca 30% av veitrafikk sakene. Amfetamin har vært inne på lista alle 9 årene, mens metamfetamin var ute av lista i 2003 og 2004, men helt på topp i 2009.



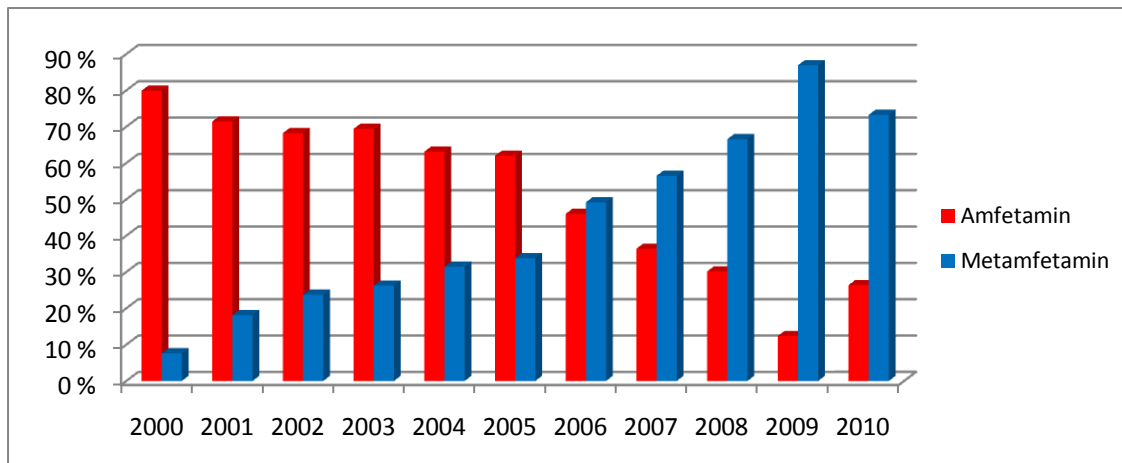
Figur 1-2 "TOPP 5", de vanligste funn av andre stoffer enn alkohol i blod, i veitrafikk saker, perioden 2002-2010

Figur 1-3 viser at det i hovedsak er funn av amfetamin og metamfetamin i sakene til bekreftelse, disse to komponentene utgjør ca 90-95% av positive funn. Nærmere titt på disse to komponentene i veitrafikk sakene, viser at funnene av disse to har endret seg en del de siste 10 år. I 2000 var det stort sett bare amfetamin i sakene, men så har metamfetamin og spesielt saker med både amfetamin og metamfetamin steget kraftig fra 2000 til 2010.



Figur 1-3 Funn av en eller flere komponenter i positive saker.

Det er vanlig å finne litt amfetamin i saker med metamfetamin, siden amfetamin er en metabolitt av metamfetamin. Ved RE er det gjort en beregning på hvilke inntak som skyldes kun metamfetamin og hvilke som skyldes inntak av både amfetamin og metamfetamin, se Figur 1-4. Figuren viser at metamfetamin har tatt mer og mer over, i 2006 var det ca 50/50 av de to komponentene. Det kan se ut som metamfetamin synker litt og amfetamin stiger litt i 2010 i forhold til 2009.



Figur 1-4 Beregnet inntak av amfetamin og metamfetamin

### 1.3 Eksisterende metode

Metoden til analyse av amfetaminer i blod, er i dag en væske-væske ekstraksjon, som analyseres på gasskromatografi med massespetrometer (GC-MS) [14]. Dette er en metode som krever en prøveopparbeidelse med derivatisering, for å gjøre stoffene mer temperatur stabile før gasskromatografien. Denne metoden har vært svært god og stabil i mange år på divisjon for rettsmedisin og rusmiddelforskning, avdeling for rusmiddelanalyser (REAR), men det er en ulempe med derivatiseringen. Den store derivatisering gruppen binder seg til amin gruppa, men den kan ha problemer å binde seg til sekundær aminer. Når det sitter en metylgruppe på aminet, går det greit, men det er problemer med MDEA, som har en etylgruppe til aminet. Det gir svært varierende resultater på MDEA, kontroller og standarder kan sprike mye i resultater. MDPV som har tertiær amin, har vi ikke lyktes med å derivatisere, denne komponenten er ikke med i gammel metode. I tillegg er derivatiserings reagenset giftig, derfor ikke så gunstig å jobbe med.. En annen ulempe er at metoden er belastende for ermer og skuldre på grunn av flere trinn der prøvene skal overføres fra et rør til et annet rør ved hjelp av pipette, og flere trinn hvor korker skal tas av og på under prøveopparbeidelsen. En serie med prøver består her av ca 50 prøver, det føles belastende på ermer og skuldre når 50 prøver skal overføres en og en, eller når 50 korker skal av eller på prøverørene.

### 1.4 Målsetning

Målet er å utvikle en sensitiv, selektiv og enkel metode, som kan erstatt den eksisterende metoden. Det er behov for en enkel prøveopparbeidelse på grunn av stort antall prøver, og en enkel metode hvor det er lett å ta inn nye komponenter. Et annet mål er ergonomi, utvikle en metode hvor det er minst mulig belastning på ermer og skuldre. REAR har flere nye høytrykksvæskeskromatografi tandemmassespektrometri (UPLC-MS/MS), som det ønskes å benytte til metodeutviklingen.



## 2 Teori

### 2.1 Kromatografi

Kromatografi er mye brukt for å separere rus og legemidler i biologisk materiale [15, 16]. Stoffene skilles gjennom en kolonne, fordi de har forskjellig affinitet til stasjonærfasen og mobilfasen i kolonnen. Jo lengre tid stoffene bruker gjennom kolonnen, jo bedre tid til spredning av stoffene. Ulike båndspredningsprosesser sørger for at vi får en spredning på de ulike stoffene gjennom kolonnen. Bredden på båndene til stoffene øker med tiden gjennom kolonnen. Derfor er det viktig at tiden gjennom kolonnen ikke blir for lang. Separasjonen i kolonnen kan optimaliseres ved å regulere mobilfasehastighet, mobilfasegradient, mobilfasesammensetning, temperatur eller trykket. Båndspredning kan reduseres ved å velge en effektiv kolonne. Effektiviteten i et kromatografisk system måles som platetall, som viser systemets evne til å produsere smale bånd.

I gasskromatografi (GC) er mobilfasen en gass og det benyttes ofte lange, tynne, og åpne kapillærkolonner med tynn stasjonærfase. I væskekromatografi (LC) er mobilfasen væske, kolonnene er kortere med større diameter og pakket med partikler. Disse to systemer har kolonner med svært ulikt platetall, Eksempel, GC med sine 12 – 30 meter lange kolonner, med indre diameter på 0,3mm, har et platetall per meter på ca 3000, gir totalt platetall på 36000 – 90000. LC kolonner med lengde 10 cm, diameter på 4-5mm og pakket med 5 mikron partikler har et platetall per meter på 75000, totalt 7500 plater.

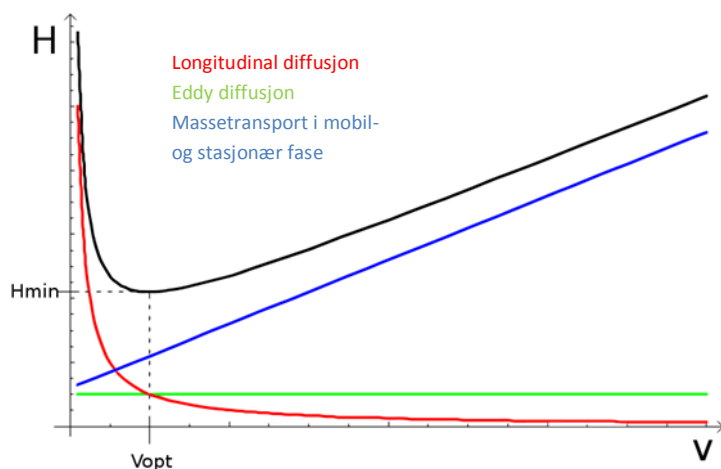
Båndspredningsprosessene som virker inn er longitudinal diffusjon, eddy diffusjon, og massetransport i mobilfase, stillestående mobilfase, og stasjonærfase. Longitudinal diffusjon er stoffers diffusjon fra område med høy konsentrasjon av stoffet til område med lav konsentrasjon, og er omvendt proporsjonalt med mobilfasehastigheten. Det er stor forskjell i diffusjonshastigheten i gass og væske, den er betydelig større i gass ( $10^4$ - $10^6$  ganger større), derfor har longitudinal diffusjon mye større betydning i GC enn i LC.

Eddy diffusjon er analyttens vei gjennom kolonnen, ofte flere vei muligheter, noen trangere passasjer der hastigheten går ned, mens den er raskere i brede passasjer. Eddy diffusjon er proporsjonalt med diameter på pakkemateriale i kolonnen, den vil derfor være konstant, og ikke ha betydning for åpne kapillærkolonner.

Massetransport i mobilfase vil si at hastigheten i strømmen av mobilfase er forskjellig, molekyler som ligger i midten av strømmen har høyere hastighet enn de som ligger ut mot kanten av strømmen. Dersom molekylerne går inn i de porøse partiklene i kolonnen, blir det massetransport i stillestående mobilfase, mens massetransport i stasjonærfase er molekyler som diffunderer dypt inn i den stasjonære fasen til kolonnen. Massetransportene har størst betydning for LC og mindre betydning ved GC med åpne kapillærkolonner.

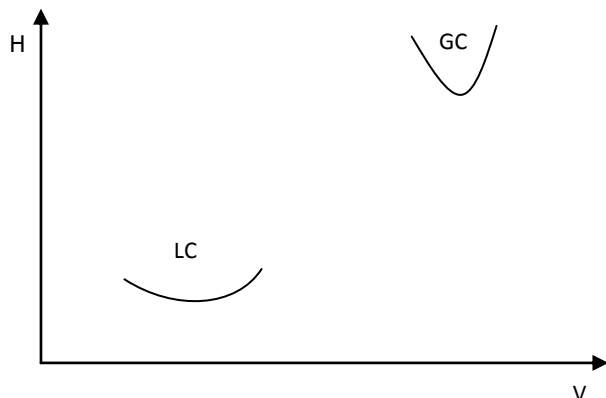
Van Deemter ligning viser kolonnens effektivitet som;  $H = A + B/u + Cu$ . H er platehøyden, kolonnens lengde delt på platetall. Det ønskes høyest mulig platetall, derfor lavest mulig platehøyde for å få størst mulig effektivitet. A er Eddy diffusjon, B er longitudinal diffusjon, C

er massetransport i begge faser, og  $u$  er mobilfasehastigheten. Figur 2-1 viser hvordan de ulike båndspredningsprosessene virker inn, og hvilken hastighet på mobilfase som gir lavest platehøyde.



Figur 2-1 Båndspredningsprosessenes påvirkning på van Deemters plott, platehøyde mot mobilfasehastighet. Figuren er hentet fra [17]

Den største forskjellen på HPLC og GC er at diffusjons koeffisienten er mye høyere i gass enn i væske, Fordi store partikler og åpne kolonner gir bratte kurver, mens små partikler og trange kolonner gir flate kurver, vil van Deemter plott med GC og LC bli seende ut som Figur 2-3.



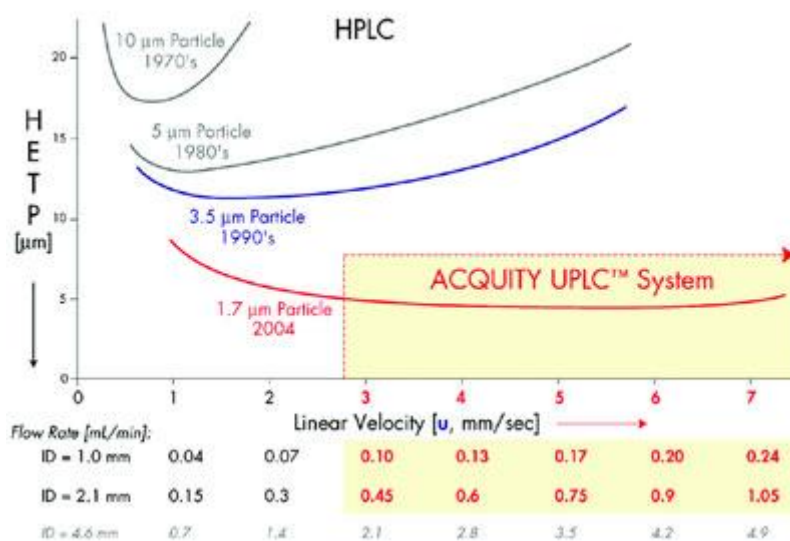
Figur 2-2 Van Deemter plott av HPLC og GC system

Fordelen med en flatere kurve, systemet har optimal effektivitet i et lengre område av mobilfasehastigheten.

### 2.1.1 UPLC

En av utfordringene til High Performance Liquid Chromatography (HPLC), som opprinnelig var forkortelse for High Pressure Liquid Chromatography, er høyt mottrykk. Mobilfase flow, viskositeten på mobilfasen, og partikkelstørrelse på pakkematerialet i kolonnen er årsaken til høyt trykk. Økende viskositet gir høyere trykk, mindre partikkel størrelse gir høyere trykk, lengre kolonne gir høyere trykk og høyere mobilfasehastighet gir høyere trykk.

UPLC (ultra high performance liquid chromatography) bruker kolonner med mindre partikkelstørrelse enn HPLC, det gir lavere platehøyde, mulighet for lavere analysetid, men høyere trykk. Effektiviteten ved ulike partikkelstørrelser, se Figur 2-3.



Figur 2-3 Van Deemter plott ved ulike partikkelstørrelser i HPLC og UPLC system. Figuren er hentet fra [18]

Figur 2-3 viser at effektiviteten på kolonnen øker med mindre partikkelstørrelse, og at kurven også blir flatere. Tabellen i figuren viser hvilken mobilfasehastighet som kan velges ved ulike indre diameterer på kolonnen, for å ha mest mulig effektiv kolonne.

## 2.2 Massespektrometri

Massespektrometer består av tre hovedkomponenter, ionekilde, masseanalysator og detektor [19]. Ionekilden produserer ioner i gassfase av komponentene, masseanalysatoren separerer ionene på bakgrunn av deres masse/ ladning ( $m/z$ ) og detektoren detekterer ionene og oversetter til elektriske signaler. Signalet er proporsjonalt med mengden ioner som detekteres, ionets intensitet, en datamaskin behandler dataene.

### 2.2.1 Ionekilden

Av de mest vanlige ioniseringsteknikker, er elektron ionisasjon, kjemisk ionisasjon, og elektropray. Ved elektron ionisasjon blir molekyler bombardert av elektroner som har høy energi, molekylene får slått løst et elektron, og de får overført energi når de treffes. Det blir dannet radikale kationer med samme molekylmasse som molekylet, men på grunn av høy indre energi vil de fleste fragmentere. Dette er en hard ioniserings teknikk. Kjemisk ionisering er en myk ioniseringsteknikk, det benyttes en gass med lavere protonaffinitet enn molekylet som skal ioniseres. Gasser som ofte benyttes i denne teknikken er hydrogen, metan, butan og ammoniakk, som i denne rekkefølge har økende protonaffinitet. Ioniseringen skjer ved protonoverføring fra gass til molekyl, ofte dannes kluster og adduksjoner ved høy protonaffinitet på gassen. Det er også mulig å få ladningsoverføring istedenfor proton overføring ved kjemisk ionisering, da benyttes argon gass. Siden det er en

myk ionisering skjer det lite fragmentering. Både elektron ionisering og kjemisk ionisering krever molekyler i gassform, og begge prosessene foregår under vakuum.

Elektrospray er også en myk ioniseringsteknikk ved atmosfærisk trykk, som ofte benyttes ved væskrokromatografi, for å få gassfase ioner av analyttene. Løsningsmiddel med analytt kommer inn til ionekilden gjennom et kapillærrør. Ved enden av kapillærrøret er det satt på en høyspenning som fører til at det dannes en aerosol på grunn av tørkegassen i ionekilden og på grunn av det elektriske feltet mellom kapillæret og cone. Det dannes dråper av en polaritet, der løsningsmiddelet i dråpene fordampes på grunn av varmen i ionekilden, slik at ladningene i dråpene kommer nærmere hverandre, tilslutt er de så nær hverandre at de eksploderer. Prosessen gjentas til alt løsningsmiddel er fordampet. Det blir dannet analytt ioner i gassform med en type polaritet, som kan ha flere ladninger, ionene trekkes mot conen og inn i masseanalysatoren. Om de får positive eller negative ladninger bestemmes ved hvilken modus instrumentet settes i, kapillæret sørger for at det dannes dråper i valgt ladning og at motsatt ladning utlades på kapillæret. Ved positiv modus skjer en proton overføring til analytt, det dannes et ion med masse  $n+1$ , ved negativ modus er det analytt som gir fra seg et proton, vi får et ion med masse  $n-1$ .

### 2.2.2 Masse analysator

Masseanalysatorer som brukes mye er sektorinstrumenter, ionefelle, time off flight (TOF) og kvadrupol. Sektorinstrumenter er høyoppløselige instrumenter som består av en magnet (enkel fokuserende) eller en magnet og elektrostatisk analyser (dobbel fokuserende). Magneten separerer på bakgrunn av ionets moment (masse og flyktighet), mens den elektrostatiske delen separerer på bakgrunn av ionets kinetiske energi. Ionefeller (ion trap) separerer ioner på bakgrunn av deres  $m/z$ , over tid kan man kjøre  $ms^n$ , fordi ionene er lagret i et elektrisk felt inne i ionefellen, der ioner med ønsket  $m/z$  slippes ut. Ionefeller har lav oppløsning i forhold til sektor instrumenter. TOF separerer ioner på bakgrunn av deres flytid, alle ionene mottar samme kinetiske energi, så hastigheten er proporsjonal med kvadratroten av massen til ionet. Oppløsningen varierer med flytid og masse til ionet, men reflektron TOF har høyere oppløsning enn lineær TOF, men begge er lavere enn sektor instrumentene.

Kvadrupolen er en lavere oppløselig masseanalysator bestående av fire staver, mellom disse stavene er det spenning med motsatt polaritet. Det er både en fast likespenning og en vekselspenning i radiofrekvens området, som sørger for at masser med et vist  $m/z$  slipper gjennom kvadrupolen ved å variere spenningen. Kvadrupolen kan transportere både positive og negative ioner.

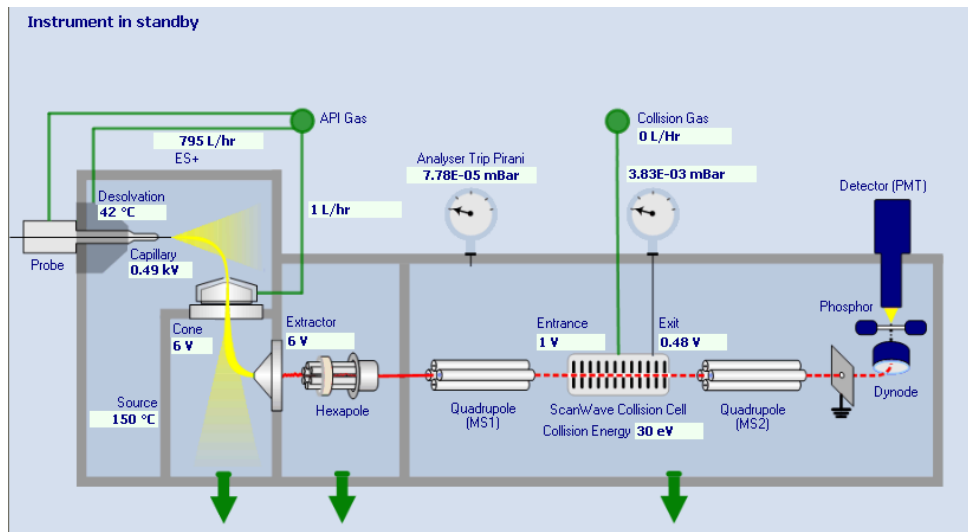
### 2.2.3 Tandem massespektrometri (MS/MS)

MS/MS er en fordel når man har en ionekilde som ikke fragmenterer fullstendig, eller når kromatografiske teknikker ikke separerer fullstendig.

Ionefelle er eksempel på MS/MS i tid, men i rommet er det to masseanalysatorer i kombinasjon. Det er mange mulige kombinasjoner mellom kvadrupol, TOF og sektorinstrumenter som er mulig, for eksempel kvadrupol-TOF, sektorinstrument – TOF,

TOF-TOF eller kvadrupol - kvadrupol. Det er kvadrupol – kvadrupol som benyttes i denne oppgaven.

Figur 2-4 viser oppbygningen til MS/MS der MS'ene er to kvadrupoler med en kollisjonscelle imellom. I kollisjonscellen blir ionene fragmentert ved hjelp av kollisjonsgass.



Figur 2-4 MS/MS til Waters TQ-MS. Figuren er hentet fra skjermbildet på instrumentet.

Ved bruk av MS/MS er det flere muligheter til scan av ioner, se Figur 2-5. Ved å veksle mellom og scanne alle ioner eller plukke bestemte masser på kvadropolene, og å ha en aktiv eller inaktiv kollisjons celle, gir det mulighet til produkt ion scan, foreldre ion scan, MRM med mer.

Scan type	Instrument component			Data type
	MS1	Collision cell	MS2	
MS scan	Scan	Inactive	RF only (acts as ion guide)	Qualitative
MS2 scan	RF only (acts as ion guide)	Inactive	Scan	Qualitative
SIR	Mass filter	Inactive	RF only (acts as ion guide)	Quantitative
Product ion (daughter) scan	Mass filter	Active	Scan	Qualitative
Precursor ion (parent) scan	Scan	Active	Mass filter	Usually Qualitative, sometimes Quantitative
Multiple reaction monitoring (MRM)	Mass filter	Active	Mass filter	Quantitative
Neutral loss	Scan	Active	Scan	Usually Qualitative, sometimes Quantitative

Figur 2-5 Scan typene i tandem MS. Bildet er scannet inn fra manualen til instrumentet.

## 2.3 Prøveopparbeidelse

Ved analyse av blodprøver er det behov for en prøveopparbeidelse for å rense bort komponenter som kan ødelegge eller interferere med systemet hvor prøven skal analyseres. Prøveopparbeidelsen kan også innebære en oppkonsentrering eller fortynning av prøven. Ved prøveopparbeidelse til kromatografiske systemer, er det viktig at prøven blir blandbar med det systemet den skal introduseres for, i dette tilfellet UPLC-MS/MS.

### 2.3.1 Væske-væske ekstraksjon

Væske-væske ekstraksjon er en teknikk der det benyttes to ikke blandbare væsker, der den ene er vandig og den andre er et organisk løsningsmiddel. Stoffene i prøven kan separeres ved at stoffene velger ulik fase. Det er viktig å velge et løsningsmiddel hvor fordelingen organiskfase/ vandigfase blir høy for analytt, men lav for komponenter som er uønsket i prøven. Ved å overføre organisk fase til nytt prøverør, kan opprensingen fortsette med nye løsninger, inndamping for oppkonsentrering og/eller reløsing i egnet løsning, eller sette prøven direkte på systemet dersom løsningsmiddelet er egnet for systemet. Bruk av syrer eller baser kan benyttes for komponenter som kan ioniseres. Ioniserte molekykler er mer blandbare med den uorganiske fasen.

### 2.3.2 Fastfase ekstraksjon

De aller fleste komponenter kan benytte fastfase ekstraksjon (SPE). Det finnes et stort antall fastfase- kolonner og 96-platerkolonner på markedet i dag, både normalfase, omvendtfase, ionebytter, og kombinasjoner av disse. Prinsippet er at analytten fester seg til pakkematerialet i kolonnen, danner interaksjoner med stasjonærfasen, mens andre uønskede komponenter vaskes ut. Deretter elueres ønsket analytt ut av pakkematerialet.

I normalfase SPE, hvor mobilfasen er mer upolar enn stasjonærfasen, er primærinteraksjonen polare interaksjoner, som er sterke hydrogen bindinger mellom analytt og stasjonærfasen. For å få til dette må analytten kunne danne hydrogenbindinger i polart eller upolart miljø, avhengig av miljø hvor hydrogenbinding dannes, velges vaskeløsning og elueringsmiddel. I for eksempel et upolart miljø vil man kunne vaske med vann og eluere ut med et organisk løsningsmiddel som vil kunne danne hydrogenbinding med analytten.

Ved omvendt fase SPE er stasjonærfasen hydrofob, det dannes hydrofobe interaksjoner, som er svake van der Waalske krefter mellom analytt og stasjonærfase, som styrkes i vandig miljø og svekkes i organisk miljø. For å danne hydrofobe interaksjoner er det viktig at de komponentene som ønskes å finne er uladet før de settes på kolonnen, dette kan gjøres ved å tilsette en syre eller en base dersom det er sure eller basiske komponenter man ser etter. Alle komponenter som ikke danner hydrofobe interaksjoner vaskes bort med vann, før de som har dannet interaksjonene elueres ut med et organisk løsningsmiddel.

Ionebyttere kan benyttes for komponenter som kan ioniseres, det danner ioniske interaksjoner, som er veldig sterke ionebindinger mellom analytt og stasjonærfasen. pH justeres for skru av og på ladning på komponentene. Av ionebytter materiale finnes de som

har negativ ladning, som er kationbyttere, de bytter til seg analytter med positiv ladning, og materiale med positiv ladning som er anionbyttere, som bytter til seg analytter med negativ ladning. Fordi ionebindingene er så sterke, kan det vaskes med løsninger som fjerner andre typer bindinger som hydrofobe interaksjoner. Ved eluering benyttes en pH løsning som skruer av ladningen til analytt, slik at ionebindingene brytes og analytten skylles ut.

### 2.3.3 Filter

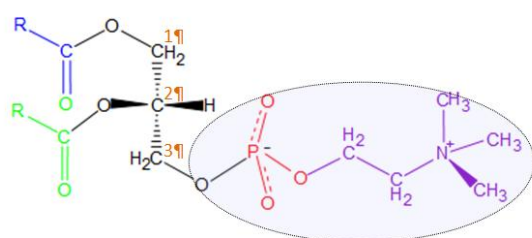
Det finnes mange filter kolonner, sprøyter, plater og lignende på markedet i dag. Dette er enkelt og greit en filtrering av prøvene, blant annet med pakkematerialet av polymerer/ polypropylen og mye hemmelig fra produsentene. Flere av filtrene har basert seg på å fjerne fosfolipider, som er en komponent som kan gi matrikseffekter og forstyrre mye for ønsket analytt.

## 2.4 Matrikseffekter

Matrikseffekter er forhold i prøven som kan bidra til å forstyrre resultatet på ønsket komponent. Forstyrrelsene kan være reduksjon (ione undertrykkelse) eller økning (ione forsterkelse) av ione intensiteten, som kan føre til reduksjon eller økning av sensitiviteten for analytt over tid, forhøyet baselinje og dårligere presisjon på resultater. [20, 21]. En stor del av matrikseffektene i blodprøver, ved bruk av elektropray, kommer fra fosfolipider.

### 2.4.1 Fosfolipider

I kroppen er fosfolipider en viktig byggestein i cellemembraner, dette er fettstoffer som er blant de vanligste fettstoffene i kroppen vår [22]. Fosfolipidene er oppbygd av en hydrofil del - "hodet", som vender ut av cellen, og en hydrofob del - "halen" som er vender inn i cellen, dette sørger for at transporten gjennom celleveggen blir veldig liten. De to hovedgruppene av fosfolipider er glycerolfosfolipid og sfingomyelin, der de største forskjellene på disse er ulike grupper på den hydrofobe delen [23]. Glycerolfosfolipid har enten eter eller ester i posisjon 1 og ofte ester i posisjon 2, mens sfingomyelin har alkyl kjede i posisjon 1 og amid gruppe i posisjon 2. Den hydrofile delen sitter i posisjon 3, den består av en fosfatgruppe som har bundet et organisk molekyl, dette molekylet kan variere hos glycerolfosfolipidene, og klassifiserer disse i ulike klasser. Cholin er molekylet som vi finner hos sphingomyelin og hos klassen lektiner hos glycerolfosfolipid. Lektiner er de mest vanlige fosfolipidene vi finner i plasma, ca 60-70%, Figur 2-6 viser kjemisk struktur av lektin.



Figur 2-6 Kjemisk struktur av lektin. Figuren er hentet fra [24], men har fått lagt på nummerering av posisjon 1,2 og 3 på lipidet, samt blå markert gruppen som benyttes i foreldre ion scan til søk etter fosfolipider.

## 2.5 Intern standard

Valg av intern standard kan ha mye å si for både linearitet og matrikseffekter ved LC/MS med elektropray ionisering. Ved RE har vi mest erfaring med å benytte deuteriumsmerkede intern standarder. Ved GC/MS analyse har det ofte blitt valgt intern standard med høyest mulig deuterium merking, for å unngå mest mulig forstyrrelser mellom analytt og intern standard, slik at både kvantiserings ion og target ion blir forskjellig. På eksisterende metode er det benyttet amfetamin-d11 og metamfetamin-d11. LC/MS analyser gir andre problemer som ione undertrykkelse og ione forsterkelse, intern standarden bør være mest mulig lik analytt. Ved bruk av  $^{13}\text{C}$  merket intern standard som er svært lik komponent i molekylstruktur og samme retensjonstid som komponent, blir linearitet bedre, siden påvirkningen blir den samme på både analytt og intern standard [25].



### 3 Eksperimentelt

#### 3.1 Utstyr

##### 3.1.1 Utstyr og apparatur

Tabell 3-1 Instrumentering brukt i oppgaven

Instrumentering	Produkt	Produsent
Væskekromatograf	Acquity UPLC	Waters
Detektor	Massespektrometer, Xevo TQ MS	Waters
Lab-data system	TargetLynx	Waters
Kolonne	Acquity BEH-C18, 1,7 $\mu$ M partikler	Waters

Tabell 3-2 Pipetter brukt i oppgaven

Pipetter	Produkt	Produsent
Blod	Finpipette	Labsystem/ Carlsberg/ Biohit/ Gilson
Standard/ kontroll	Finpipette	Labsystem/ Carlsberg/ Biohit
Intern standard	Multipipette	Eppendorf
Overføring til ekstraksjonsplater/ filterplater	8-kanals pipette 96-kanals pipette	Rainin Integra/ Liquidator 96 Rainin
ACN: MeOH (85:15)	Multipipette 8-kanals pipette 96-kanals pipette	Eppendorf Rainin Integra/ Liquidator 96 Rainin

Tabell 3-3 Annet utstyr benyttet i oppgaven

Utstyr	Produkt	Produsent
Whirlmixer	Reax control MSI minishaker	Heidolph/ IKA Works INC
Inndamper	TurboVap 96	Zymark
Sentrifuge	Centrifuge 5804R Allegra X-15R	Eppendorf Beckman Coulter
pH-meter	Lab 850	Scott Instruments

Tabell 3-4 Rør og 96-brønns plater brukt i oppgaven

Rør/ plater	Produkt	Produsent
Ekstraksjon	5 mL plastrør	Sarstedt
Ekstraksjons plater	96-brønn plater 2mL m/runde brønner	Nunc
Lokk til 96-plater	Axymat AM-2mL-RD, silicon sealin mat 96-well cap nautral 96-well mat 96-well pl.cover	VWR Nunc Teknolab Agilent Technologies
Forseglingstape	Sealing Tape, Vinyl, Pre scored for repeat piercing	Nunc
Filterplater	Captiva ND Lipid 96 well Ostero HybridSPE-Phospholipid Strata Impact	Agilent Technologies Waters Supelco Phenomenex
Ekstraksjons kolonner	Oasis MCX Strata-X SPE	Waters Phenomenex
Oppsamlingsplater	96-brønnsplater 2 mL 1 mL collection plate	Nunc Agilent Technologies

### 3.1.2 Kjemikalier

Tabell 3-5 Kjemikalier brukt i metoden

Kjemikalie/ substans	CAS-nr	Molekylvekt	Kvalitet	Produsent
Metanol	67-56-1		HPLC	Merck/ LabScan
Acetonitril	75-05-8		HPLC	Lab Scan
Ammonium format	540-69-2	63,03	>98 % p.a	Prolabo
Ammoniakk løsning 25 %	1336-21-6		p.a	Merck
Eddiksyre konsentrert			p.a	Merck
Etylacetat	141-78-6		LiChrosolv	Merck
Heptan	142-82-5		p.a	Merck
n Hexan	110-54-3		p.a	Rathburn
Maursyre			>90 % p.a	Prolabo
NaOH	1310-73-2	40,00	p.a	Merck
Saltsyre konsentrert 37 %				Merck
Syklohexan	110-82-7	84,16	p.a	Merck
Tert-butylmetyleter	1634-04-4		p.a	Sigma-Aldrich
Milli-Q-vann			>18 Ω	RE
Blodbankblod (2g NaF, 1,6mL heparin, 10mL PO-vann til 450mL humant blod)			Screenet neg. Testet for hepatitt B, HIV og HTLV.	Blodbanken, Ullevål sykehus og Ahus. Evt andre blodbanker.

### 3.1.3 Referansestoffer

Tabell 3-6 Referansestoffer i metoden

Komponent	Molekylvekt	Bruk	Produsent
<b>Amfetamin</b>			
DL-amfetamin	135,21	Kalibrator	Cerilliant
DL-amfetamin-sulfat	368,49	Kontroll	Sigma
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> amfetamin-sulfat	374,45	Intern standard	Chiron
<b>Metamfetamin</b>			
DL-metamfetamin	149,24	Kalibrator	Alltech
(+)-metamfetamin-HCl	185,70	Kontroll	Cerilliant
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> metamfetamin-HCl	191,65	Intern standard	Chiron
<b>MDMA</b>			
(±)-3,4-metylenedioxyamfetamin-HCl *	193,25	Kalibrator Kontroll	Alltech Cerilliant
(±)-3,4-metylenedioxyamfetamin-HCl-d5*	198,21	Intern standard	Cerilliant
<b>MDA</b>			
(±)-3,4-metylenedioxyamfetamin-HCl *	179,22	Kalibrator Kontroll	Alltech Cerilliant
<b>MDEA</b>			
3,4 – metylenedioxyetylamin-HCl *	207,27	Kalibrator/ kontroll	Alltech
<b>PMA</b>			
p-metoxamfetamin-HCl *	165,23	Kalibrator Kontroll	Cerilliant Lipomed
<b>PMMA</b>			
p-metoxamfetamin-HCl *	179,26	Kalibrator Kontroll	Cerilliant Lipomed
<b>mCPP</b>			
1-(3-klorfenyl)piperazin-HCl *	233,14	Kalibrator Kontroll	Sigma Alltech
<b>2C-B</b>			
2 bromo-2,5 dimetoksyphenetylamin HCl *	260,13	Kalibrator Kontroll	Cerilliant Lipomed
<b>MDPV</b>			
Metylenedioxypropylamfetamin-HCl *	275,30	Kalibrator/ kontroll	Cerilliant
<b>Katinon</b>			
Katinon S HCl	185,65	Kalibrator Kontroll	Sigma USP
<b>Metkatinon</b>			
Metkatinin HCl	199,70	Kalibrator/ kontroll	Sigma
<b>Efedrin</b>			
1R,2S(-)-efedrin-HCl *	165,24	Kalibrator/kontroll	Cerilliant
<b>Pseudoefedrin</b>			
Pseudoefedrin-HCl *	201,70	Kalibrator/ kontroll	Sigma
<b>Norefedrin</b>			
Fenylpropanolamin-HCl	187,67	Kalibrator/kontroll	Alltech
<b>Norpseudoefedrin</b>			
Katin-HCl	187,66	Kalibrator/kontroll	Sigma

\*Konsentrasjonen for disse referansestoffene er oppgitt som fri base, derfor er molekylvekten for disse stoffene uten HCl.

## 3.2 Tillaging av løsninger

### 3.2.1 Tillaging av standarder, kontroll og intern standard

For både standarder, kontroller og intern standarder, med unntak MDMA-d5, lages det stamløsninger. Stammløsningene består av et referankestoff løst i metanol (MeOH), har en konsentrasjon på >500 µM og har en holdbarhet på minst 2 år i fryser.

Fra stamløsningene lages bruksløsningene, ofte via en mellomfortynning. Bruksløsninger og mellomfortynninger er løst i milli-Q-vann, og de er holdbare minst 4 måneder i kjøleskap. Bruksløsningen til intern standardene er holdbare i minst 6 måneder i kjøleskap. Målet er å lage standarder og kontroller med 2 måneders mellomrom, slik at de får god overlapp med nye bruksløsninger. Standardene benyttes 2 måneder med "gammel" kontroll og 2 måneder med "ny" kontroll, det samme gjelder kontrollene.

Bruksløsningene som er benyttet i oppgaven er de samme som benyttes i eksisterende metode. Siden det i ny metode var ønske om kvantitativ analyse av komponenter hvor det tidligere kun er en kvalitativ analyse, ble det behov for å lage nye bruksløsninger for både standarder og kontroller ved oppstart av oppgaven. Bruksløsningene for standardene og kontrollene ble laget med få dager mellomrom, det er god kontroll på de fleste komponentene, mens de "nye" komponentene hadde lite å sammenlignes med. De nye bruksløsningene ble også tatt i bruk i eksisterende metode. Mot slutten av oppgaven ble det på grunn av faste grenser prosjektet bestemt nye påvisningsgrenser for flere av komponentene i metoden, det ble derfor behov for å endre konsentrasjonene på bruksløsningene og derfor lage nye. Tabell 3-7 og Tabell 3-8 viser de nye konsentrasjonene til bruksløsningene.

Tabell 3-7 Konsentrasjoner på bruksløsningene som benyttes som standarder i metoden.

Komponent	Standard 1 µM	Standard 2 µM	Standard 3 µM	Standard 4 µM	Standard 5 µM
Amfetamin	0,20	0,50	2,01	10,07	20,14
Metamfetamin	0,20	0,50	2,00	10,02	20,03
MDMA	0,20	0,50	2,00	10,01	20,03
MDA	0,20	0,50	2,01	10,04	20,09
MDEA	0,20	0,50	2,01	10,04	20,08
PMA	0,050	0,126	0,502	2,512	5,023
PMMA	0,050	0,126	0,502	2,510	5,021
mCPP	0,051	0,127	0,508	2,542	5,084
2C-B	0,050	0,126	0,504	2,518	5,036
MDPV	0,050	0,127	0,509	2,543	5,085
Katinon		0,30		5,06	
Metkatinon		0,30		5,01	
Efedrin		0,50		5,01	
Pseudoefedrin		0,50		5,06	
Norefedrin		0,50		5,01	
Norpseudoefedrin		0,51		5,01	

Tabell 3-8 Konsentrasjon på bruksløsningene som benyttes som kontroller i metoden.

Komponent	Kontroll 1 μM	Kontroll 2 μM	Kontroll 3 μM	Kontroll 4 μM
Amfetamin	0,10	0,20	3,03	
Metamfetamin	0,10	0,20	3,00	
MDMA	0,10	0,20	3,00	
MDA	0,10	0,20	3,01	
MDEA	0,10	0,20	3,04	
PMA	0,025	0,050		1,00
PMMA	0,025	0,050		1,00
mCPP	0,025	0,050		1,00
2C-B	0,025	0,050		1,01
MDPV	0,025	0,050		1,00
Katinon		0,30	3,00	
Metkatinon		0,30	5,02	
Efedrin		0,50	5,03	
Pseudoefedrin		0,51		5,06
Norefedrin		0,50		5,01
Norpseudoefedrin		0,50		5,01

Intern standardene som benyttes i metoden er  $^{13}\text{C}_6$ amfetamin,  $^{13}\text{C}_6$ metamfetamin og MDMA-d5.  $^{13}\text{C}_6$ amfetamin benyttes til amfetamin,  $^{13}\text{C}_6$ metamfetamin benyttes til metamfetamin, og MDMA-d5 benyttes til resten av komponentene i metoden. Tabell 3-9, viser konsentrasjon i bruksløsninger og konsentrasjon i prøvene.

Tabell 3-9 Intern standard bruksløsning

Intern standard	Konsentrasjon i bruksløsning	Konsentrasjon i prøven
$^{13}\text{C}_6$ amfetamin	5,02 μM	2,51 μM
$^{13}\text{C}_6$ metamfetamin	5,03 μM	2,51 μM
MDMA-d6	5,05 μM	2,52 μM

### 3.2.2 Tillaging av buffer

*Ammoniumformat-buffer, 5 mM, pH 10,2*

Stamløsning: 50 mM ammoniumformat; 6,3 g ammoniumformat løses opp i 2 L milli-Q-vann.

Bruksløsning: 100 mL av stamløsningen tilsettes 900 mL milli-Q-vann. pH justeres til pH 10,20 med konsentrert ammoniakk løsning.

*Ammoniumformat-buffer, 5 mM, pH 8,5*

Bruksløsning; lages på samme måte med samme stamløsning som ved pH 10,2. pH justeres til pH 8,5 med konsentrert ammoniakk løsning.

*Ammoniumformat-buffer, 10 mM, pH 3,1*

Stamløsning; bruker samme som ved pH 10,20.

Bruksløsning; 200 mL av stamløsningen tilsettes 800 mL milli-Q-vann. pH justeres til pH 3,10 med konsentrert maursyre.

### 3.2.3 Andre løsninger

ACN: MeOH (85/15); 850 mL ACN og 150 mL MeOH

Etylacetat: Heptan (4:1); Etylacetat og heptan blandes i forholdet 4+1.

Hexan: Etylacetat (7:1); Hexan og etylacetat blandes i forholdet 7+1

Tertiær-butylmetyleter: MeOH: ammoniakk (70:25:5); tertiær-butylmetyleter, MeOH og ammoniakk blandes i forholdet 70+25+5.

MeOH: ammoniumformatbuffer pH 10,2 (10:90); MeOH og ammoniumformatbuffer blandes i forholdet 1+9.

1% HCl i MeOH; 2,7 mL konsentrert saltsyre (37%) opptil 100 mL med MeOH.

0,5% maursyre i MeOH; 0,5 mL konsentrert maursyre (>90%) opptil 100 mL med MeOH.

0,5% eddiksyre i MeOH; 0,5 mL konsentrert eddiksyre opptil 100 mL med MeOH.

10% NaOH; 100 g NaOH opptil 1000 mL med milli-Q-vann.

0,1 M HCl; 4,15 mL konsentrert saltsyre (37%) opptil 500 mL med milli-Q-vann.

5% MeOH; 50 mL MeOH opptil 1000 mL med milli-Q-vann.

### 3.3 UPLC-MS/MS

Waters Acquity UPLC koblet til Waters Xevo TQ MS tandem massespektrometer ble benyttet til å identifisere og kvantifisere komponentene i oppgaven. UPLC-MS/MS 'ene på REAR brukes til flere ulike metoder, derfor ønskes mest mulig standardiserte betingelser, slik at det kan settes på flere metoder samtidig, som kan analyseres på instrumentet over natten. Det ble derfor tatt utgangspunkt i eksisterende UPLC-MS/MS metoder, for å bestemme betingelsene [26].

Til beregning av analyseserier, benyttes TargetLynx, et program i Waters MassLynx 4,1.

<b>Injektor</b>	Injiseringsmodus;	Partial loop
	Loop-volum;	10 µL
<b>Løsninger</b>	Weak-wash;	5% MeOH i Milli-Q-vann
	Strong-wash;	90% MeOH i Milli-Q-vann
	Vaskeløsninger;	30% MeOH i Milli-Q-vann
	Mobilfase løsning A	5 mM Ammoniumformatbuffer (pH 10,2)
	Mobilfase løsning B	MeOH
<b>UPLC</b>	Flowhastighet;	0,4 mL/min
	Kolonnetemperatur;	60°C

<b>Source</b>	Kapillær spenning;	1 kV
	Extraktor spenning;	3 V
	RF lens;	0,2 V
	Source temperatur;	150 °C
	Desolvation temperatur;	500 °C
	Desolvation gas flow;	1100 L/hr
	Cone gas flow;	100 L/hr
<b>Analyzer</b>	Low mass resolution 1;	3
	High mass resolution 1;	15
	Ion energy 1;	0,5
	Entrance lens;	-2
	Collision gas flow;	0,20 L/hr
	Exit lens;	2 V
	Low mass resolution 2;	3
	High mass resolution 2;	15
Ion energy 2;	0,5	
<b>Detektor</b>	Multiplier;	Instrument avhengig

### 3.3.1 Kolonne

Det ble kun benyttet en type kolonne i oppgaven, av samme grunn som over, for å få mest mulig standardiserte betingelser. Forkolonne benyttes for å spare kolonnen, det injiseres mange prøver på systemene, av og til blir kolonnene forurenset, da er det økonomisk besparende og kun måtte bytte forkolonnen.

<b>UPLC-kolonne</b>	Merke;	Aquity-BEH-C18
	Lengde;	5 cm
	Indre diameter;	2,1 mm
	Partikkel størrelse;	1,7 $\mu$ m
<b>Forkolonne</b>	Merke:	Aquity-BEH-C18
	Lengde;	0,5 cm
	Indre diameter;	2,1 mm
	Partikkel størrelse;	1,7 $\mu$ m

### 3.3.2 Uttesting av UPLC betingelser

#### 3.3.2.1 Gradient program

For å sette opp gradient programmet, ble det utført en isokratisk test med ulik % organisk fase for å få et bilde på komponentenes vandringshastighet ved ulik % MeOH. Det ble laget en løsning som inneholdt alle komponentene, og det ble satt opp flere program på instrumentet, fra 5% MeOH og oppover til alle komponenter gikk rett gjennom. Programmet ble holdt isokratisk i 20 minutter, før det ble satt på 100% organisk for å få gjennom alle komponenter før neste test. Testen ble utført med 5 mM ammoniumformatbuffer pH 10,2 som mobilfase.

#### 3.3.2.2 Mobilfaser

Det benyttes i dag tre ulike mobilfaser på REAR, et instrument benytter ammoniumformatbuffer pH 3,1, et annet instrument benytter ammoniumformatbuffer pH 8,5 og flere instrumenter benytter ammoniumformatbuffer pH 10,2. Alle instrumentene benytter MeOH som organisk fase. Hvert av instrumentene har prøvetårn, slik at det er mulig å sette på flere serier om gangen, som det ofte gjøres. Det er derfor en fordel å kunne bruke en av de mobilfasene som allerede benyttes på andre metoder, derfor ble nettopp disse tre mobilfasene testet.

Siden toppene kom litt raskere ut ved pH 3,1 og pH 8,5 enn pH 10,2, ble det laget et litt annet gradient program for disse, for å få en lignende separasjon som ved pH 10,2. Det ble sett på respons, retensjonstid og toppbredde, og resultater på kjente standarder og kontroller ble vurdert for de tre mobilfasene.

De samme ekstraktene ble brukt til de tre mobilfasene, de ble analysert hver sin dag. For å vise til at ikke endringene skyldes holdbarhet på ekstrakter eller at instrumentet hadde "tapt" seg, ble mobilfasen fra dag 1 (pH 10,2) analysert på nytt dag 3.



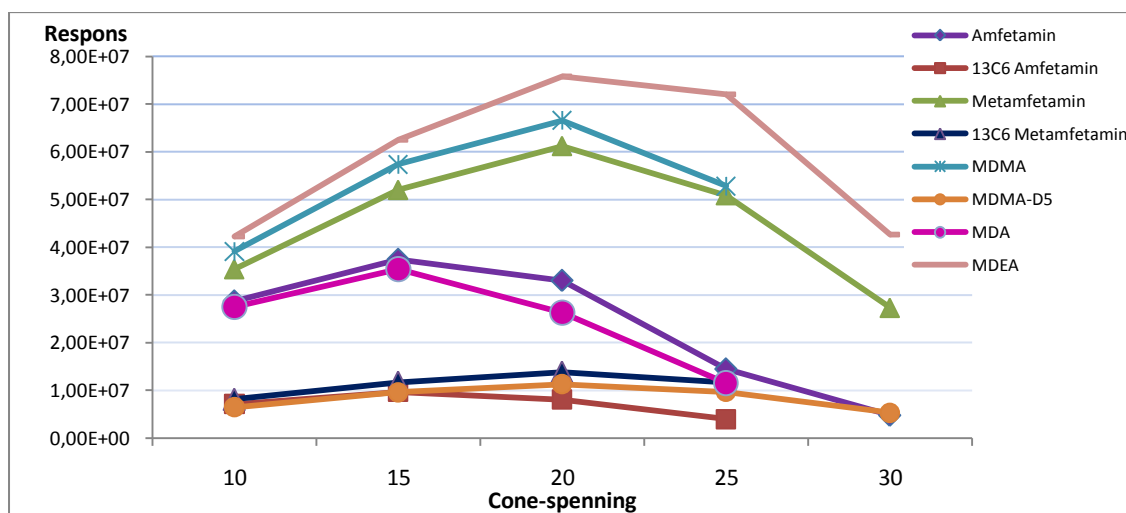
### 3.3.2.3 Stabilitet til retensjonstiden ved små endringer i mobilfasens pH.

For bufferen ammoniumformat 5 mM, pH 10,2 ble det testet stabilitet på retensjonstid dersom pH endrer seg litt ved tillaging. Det ble ikke testet noe stabilitet ved variasjon i buffer styrke.

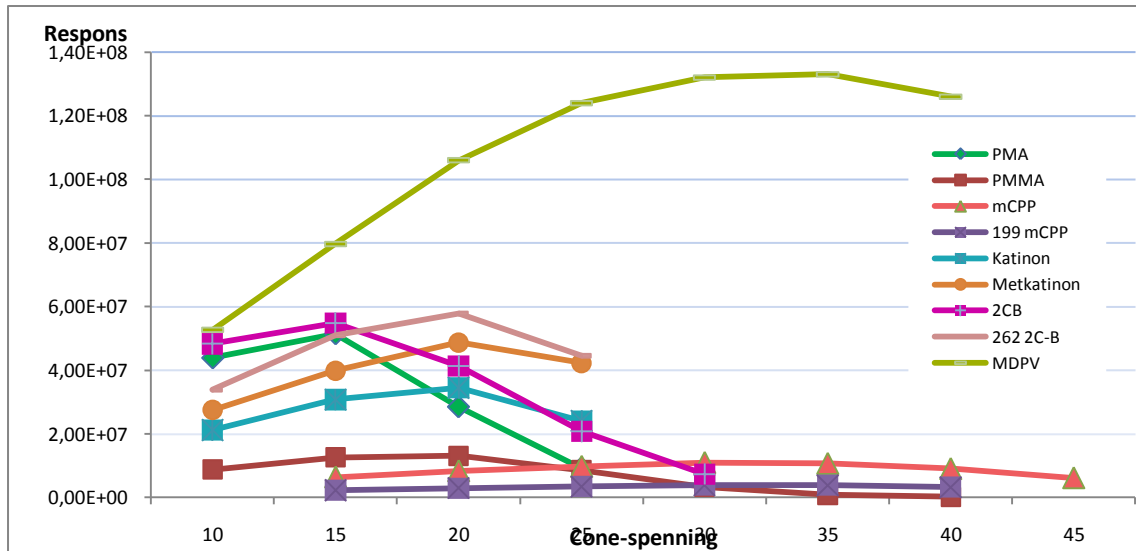
### 3.3.3 Uttesting av MS/MS betingelser

#### 3.3.3.1 MRM overganger, cone spenning og kollisjons energi.

Waters Xevo TQ MS tandem massespektrometri har en funksjon, IntelliStart, som tuner komponentene automatisk. Denne funksjonen ble benyttet for å bestemme multiple reaction monitoring (MRM) overganger, cone-spenning og kollisjons energi. Det var ikke alle stoffene som klarte å finne MRM-overganger, resultatet varierte fra 0 til 5 overganger. På grunn av problemene med IntelliStart, ble det utført flere manuelle optimaliseringer med selected ion monitoring (SIM), i Figur 2-5 kalt SIR. Da er kollisjons energi inaktivert, for ikke å fragmentere ionene. Det ble satt opp flere SIR metoder med ulik cone spenning, fra 10 V til 45 V. Komponentene ble analysert og responsen ble målt, Figur 3-1 og Figur 3-2 viser resultatene.



Figur 3-1 Respons for intern standardene, amfetamin, metamfetamin, MDMA , MDA og MDEA ved SIM analyse med ulik cone spenning



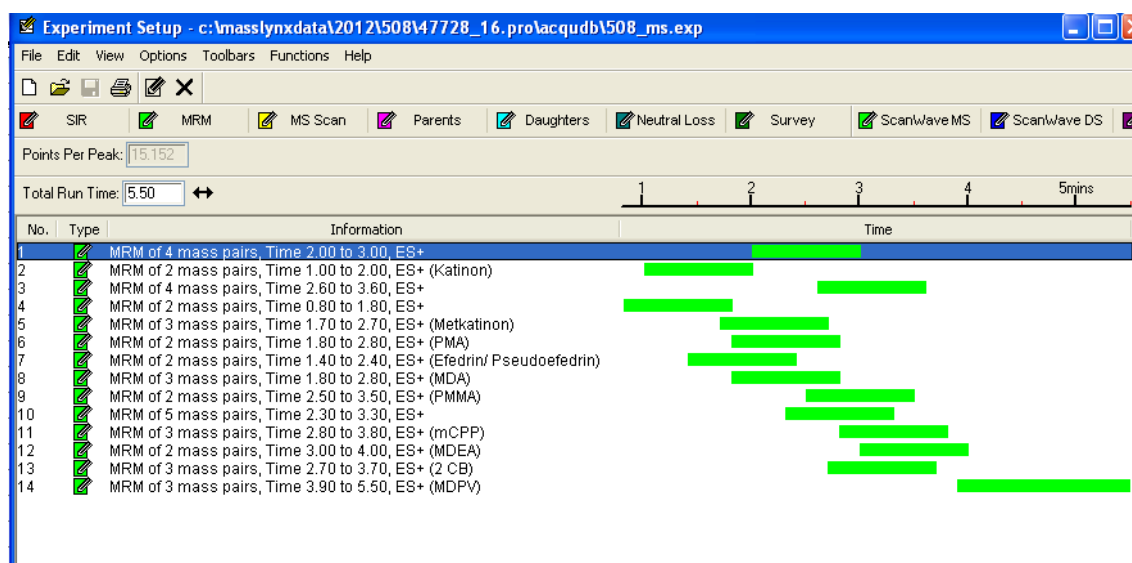
Figur 3-2 Respons for PMA, PMMA, mCPP, 2C\_B, katinon, metkatinon og MDPV ved SIM analyse med ulike cone spenninng.

For å bestemme MRM overgangene og kollisjonsenergi, ble det satt opp flere produkt ion scan med forskjellig kollisjonsenergi. Kollisjonsenergien ble satt opp fra 5 eV, med 5 eV intervaller opp til 35 eV, responsen ble målt for produkt ionene. Tabell 3-10 viser MRM overgangene og kollisjonsenergi for de ulike overganger, i tillegg cone spenninng og hvordan komponentene er delt inn grupper i MS metoden, Figur 3-3.

Tabell 3-10 Retensjonstid, MRM overganger, conespenning, kollisjonsenergi og dwelltid til komponentene i oppgaven.

Komponenter	Gruppe	Tid (min)	MRM-overganger (ES+)	Cone-spenning (V)	Kollisjonsenergi (eV)	Dwell tid (s)
Amfetamin	1	1,8 - 2,8	136,11>91,05	15	15	0,005
			136,11>119,09	15	10	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> amfetamin	1	1,8 - 2,8	142,13>97,07	15	15	0,005
			142,13>125,11	15	10	
Metamfetamin	3	2,3 - 3,3	150,13>91,05	20	15	0,005
			150,13>119,09	20	10	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> metamfetamin	3	2,3 - 3,3	156,15>97,07	20	15	0,005
			156,15>125,11	20	10	
MDMA	10	2,2 - 3,2	194,12>133,07	20	20	0,005
			194,12>135,04	20	20	
			194,12>163,08	20	15	
MDMA-d5	10	2,2 - 3,2	199,15>135,08	20	20	0,005
			199,15>165,09	20	15	
MDA	8	1,8 - 2,8	180,10>133,07	15	15	0,005
			180,10>135,04	15	15	
			180,10>163,08	15	10	
MDEA	12	3,0 - 4,0	208,13>133,07	20	20	0,005
			208,13>163,08	20	15	
PMA	6	1,8 - 2,8	166,12>121,07	15	20	0,005
			166,12>149,10	15	10	
PMMA	9	2,3 - 3,3	180,14>121,07	20	20	0,005
			180,14>149,10	20	10	
mCPP + <sup>199</sup> mCPP	11	2,8 - 3,8	197,08>119,07	30	25	0,005
			197,08>154,04	30	20	
			199,08>156,04	30	20	
2C-B + <sup>262</sup> 2C-B	13	2,5 - 3,5	260,03>134,00	15	25	0,005
			260,03>243,00	15	15	
			262,03>245,00	20	15	
MDPV	14	3,9 - 4,9	276,16>126,13	35	25	0,055
			276,16>175,08	35	20	
			276,16>205,09	35	15	
Katinon	2	1,0 - 2,0	150,09>105,03	20	20	0,007
			150,09>132,08	20	15	
Metkatinon	5	1,7 - 2,7	164,11>105,03	20	20	0,005
			164,11>131,07	20	20	
			164,11>146,10	20	10	
Efedrin	7	1,4 - 2,4	166,12>117,07	20	20	0,005
			166,12>148,11	20	10	
Pseudoefedrin	7	1,4 - 2,4	166,12>117,07	20	20	0,005
			166,12>148,11	20	20	
Norefedrin	4	0,8 - 1,8	152,11>117,07	15	20	0,017
			152,11>134,10	15	10	
Norpseudoefedrin	4	0,8 - 1,8	152,11>117,07	15	20	0,017
			152,11>134,10	15	10	

Figur 3-3 viser hvordan MS metoden er bygget opp i Warers TQ-MS, gruppene er delt inn etter komponenter bestående av to til fem MRM overganger. I gruppe 10, som er gruppa til MDMA, finnes de tre overgangene til MDMA og de to overgangene til MDMA-d5. Se Tabell 3-10 for å se hvilke komponenter som ligger i ulike gruppene.



Figur 3-3 MS-metoden

### 3.3.3.2 Dwell tid

Waters TQ-MS har en innstilling der det kan velges antall punkter over en topp med bredde på valgt antall sekunder. I denne funksjonen er det lagt inn på 15 punkter over en topp på 4 sekunder, dermed beregnes dwell tiden automatisk for hver av overgangene i MS metoden.

### 3.3.3.3 Andre MS/MS betingelser

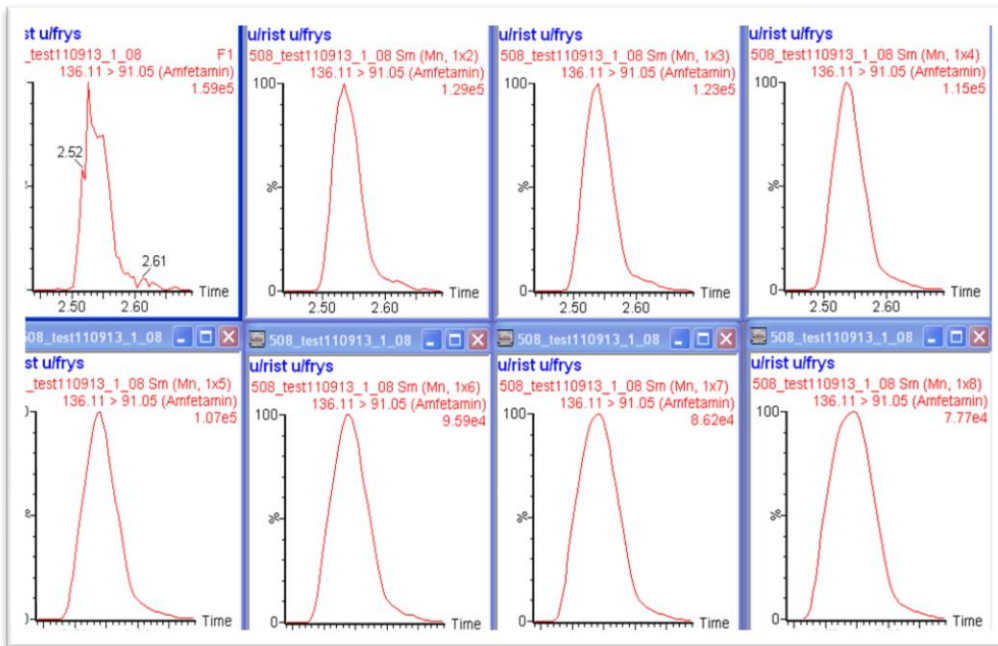
For hver komponent er det minimum to MRM overganger, en av disse overgangene blir kvantifiserings ion, der responsen til denne overgangen blir responsen til analytten. Den/de andre overgang-(ene) blir target ion, der det beregnes et forhold, kvantifiserings ion/ target ion. Det er et krav i MS metoden at target ion skal være tilstede og at forholdet mellom disse ikke skal avvike mer enn  $\pm 30\%$ .

Det mest stabile ionet, med minst forstyrrelser og best respons, prioritert i denne rekkefølge, blir valgt til kvantifiserings ion.

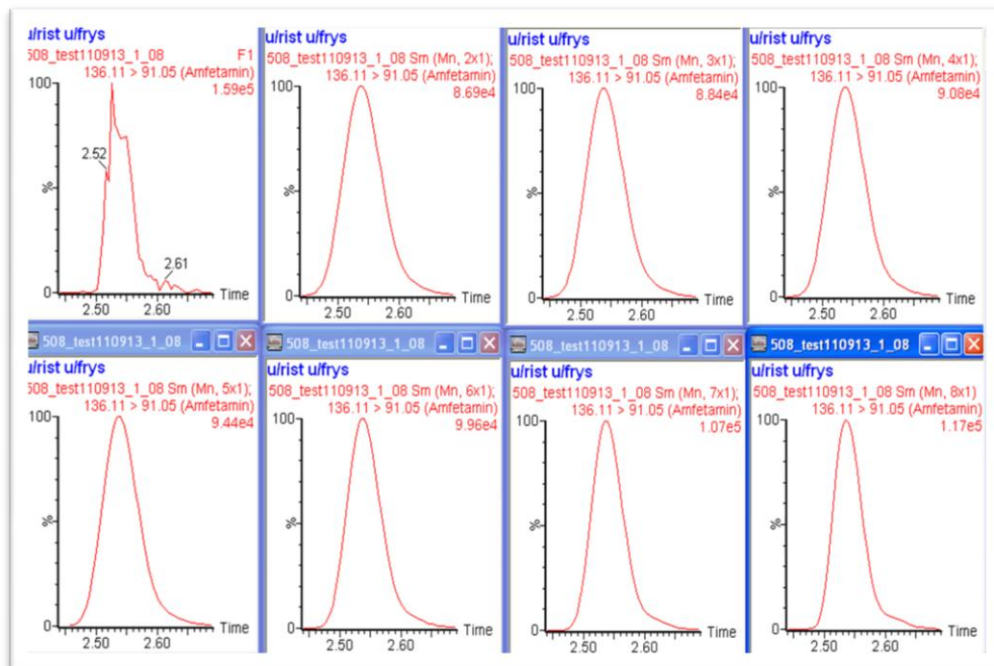
Ved lave konsentrasjoner blir det ofte litt taggete topper, for å unngå for mange manuelle integreringer benyttes smooting (glatting) av toppen. Det er mulig å velge hvor mange punkter over toppen som glattingen skal ta et gjennomsnitt av (vindu størrelsen), eller hvor mange ganger/ runder det skal glattes over toppen. Det er også mulig å velge en kombinasjon av disse to, for eksempel at man skal velge en vindusbredde på to som skal utføres tre ganger.

På våre UPLC-MS/MS er det to glattings metoder, mean og Savizky Golay. Figur 3-4 viser glatting der det kun er størrelsen på vinduet som er endret, med metoden mean. Det første

bildet i figuren er en ikke glattet topp, toppen blir så gradvis bredere ved økende vindusbredde, og responsen på toppen avtar jo større båndbredden på toppen blir.



Figur 3-4 Glattning med endring av vindusbredden fra 1 til 8.



Figur 3-5 Glattning med endring av antall runder med glattninger, fra 1 til 8 runder.

I Figur 3-5 over er det kun antall runder med glattning som er endret, også her i metoden mean. Da avtar responsen litt i starten, men øker litt igjen og toppen blir litt smalere.

### 3.4 Prøveopparbeidelsen

Der er et mål å få til en prøveopparbeidelse på 96-brønns plater. Dette på grunn av antall prøver, prøvevolum og for å tilpasse til et nytt format som kan benyttes på ekstraksjonsroboter. Bruk av fler kanals pipetter vil kunne pipettere løsninger til flere brønner samtidig, også ved overføringer. En utfordring ble blanding av prøver under opparbeidelsen, et behov for tett lokk, for å unngå kontaminering fra en brønn til en annen.

Ved prøveopparbeidelse på fastfase kolonneplater og filterplater ble det utført en felling av blodprøvene, for å fjerne blodet før påsetting på kolonne- og filterplatene. Felling med acetonitril (ACN) og MeOH er den samme som benyttes i to publiserte metoder på RE [27, 28].

#### 3.4.1 Uttesting av væske-væske ekstraksjon

Første test var å prøve eksisterende metode i nytt format [14]. De basiske amfetamin komponentene blir mer løselige i organisk enn vandig miljø ved å tilsette NaOH, organisk fase overføres og dampes inn. Før inndamping ble prøvene i eksisterende metode derivatisert før inndamping, dette trinnet er fjernet, derfor ble det utført noen forsøk med å tilsette syrer før inndamping. Hensikten er å gjøre de basiske komponentene mindre løselige i den organiske fasen som skal avdampes, et forsøk på å holde komponentene igjen i prøverøret. På grunn av sykloheksan som er løsningsmiddelet i metoden, var det behov for å dampe helt inn og deretter reløse prøvene, derfor ble syrene løst i MeOH. Det ble også testet for andre løsningsmidler, som etylacetat:heptan og hexan:etylacetat, med og uten bruk av syrer. Fremgangsmåten er vist i Tabell 3-11.

Tabell 3-11 Prøveopparbeidelse ved væske-væske ekstraksjon.

Opparbeidelsen;	100 µL	standard/kontroll/prøve/blindprøve	Utføres i prøverør
	100 µL	0-blod til std/ktr/blind, og H <sub>2</sub> O til ukjente prøver	
	50 µL	Intern standard	
	<i>Blande og overføre til 96 brønns plater</i>		Utføres på 96-plater
	100µL	10 % NaOH	
	600µL	løsningsmiddel	
	<i>Blande, sentrifugere og overføre organiskfase til ny 96 brønns plate</i>		
	25-50µL	1 % syre i MeOH	
	<i>Dampe inn til tørrhet</i>		
	200µL	5 % MeOH:H <sub>2</sub> O	

### 3.4.2 Uttesting av fast fase ekstraksjon

Oasis MCX er kationbytter SPE fra Waters som blant annet finnes i 96-kolonne-plateformat. Det ble valgt en opparbeidelse som var lik en annen ikke publisert metode på REAR. Dette er en enkel opparbeidelse som lot seg greit gjennomføre på 96 kolonneplater, se Tabell 3-12.

Tabell 3-12 Prøveoppbeidelsen ved SPE.

Opparbeidelsen;	100 µL	standard/kontroll/prøve/blindprøve	Utføres i prøverør
	100 µL	0-blod til std/ktr/blindprøve, og H <sub>2</sub> O til ukjente prøver	
	50 µL	Intern standard	
	<i>Blande og overføre til 96 brønns plater</i>		Utføres på 96-plater
Felling av blod	750µL	ACN:MeOH (85:15)	
	<i>Riste 15 sekunder, sentrifugere og overføre organiskfase til kondisjonerte 96 brønns kolonner</i>		
Vask	750µL	H <sub>2</sub> O	
	400µL	0,1 M HCl	
	750µL	MeOH	
Eluer	750µL	Tertiær-butyl-eter/MeOH/ammoniakk (70:25:5)	
		<i>Dampe inn til tørrhet</i>	
Reløsning	200µL	5 % MeOH eller MeOH/ammoniumformatbuffer (10:90)	

Fra Phenomenex ble det testet en utviklingsplate som inneholdt 4 ulike typer sorbenter, det var en 96-brønnsplate med både omvendt fase, svak kationbytter, sterk kationbytter og anionbytter. Her ble samme opparbeidelse som for Oasis MCX valgt, samt et lite forsøk på å justere pH for å få bedre utbytte.

### 3.4.3 Uttesting av filterplater

Av filterplater var det mest interesse å teste de som reklamerte med å fjerne fosfolipidene, fire slike 96-plater ble testet. For alle platene ble det testet om blodprøven kunne filtreres direkte eller med en fortykning, det fungerte ikke så bra. Det ble med for mye blod til at vi turte å analysere prøvene på UPLC-MS/MS. Derfor ble det en felling av prøvene før påsetting på filteret, samme prøveoppbeidelse ble benyttet for alle filterplatene, se Tabell 3-13.

Tabell 3-13 Prøveoppbeidelsen ved bruk av filterplater.

Opparbeidelsen;	100 µL	standard/kontroll/prøve/blindprøve	Utføres i prøverør
	100 µL	0-blod til std/ktr/blind,og H <sub>2</sub> O til ukjente prøver	
	50 µL	Intern standard	
	<i>Blande og overføre til 96 brønns plater</i>		Utføres på 96-plater
Felling av blod	750µL	ACN:MeOH	
	<i>Riste 15 sekunder, sentrifugere og overføre organiskfase til 96 brønns filterplate</i>		
	<i>Den filtrerte prøven samles opp i 96 brønns plater, klar til analyse.</i>		

Filterplatene som ble testet var Ostero, Captiva, HybridSPE-Phospholipid og Strata Impact.

### 3.4.4 Fosfolipider

For å finne ut hvor mye de ulike opparbeidelsene "renset bort" fosfolipider, ble det kjørt foreldre ion scan på m/z 184, siden m/z 184 er et produkt ion av flere fosfolipider ved positiv elektropray modus [20, 23].

### 3.4.5 Test av utstyr til bruk under prøveopparbeidelse.

For å kunne felle blodet i 96 plater krever det tette lokk til platene på grunn av behov for kraftig risting. En prøve med høy konsentrasjon amfetamin (40  $\mu\text{M}$ ) ble tilsatt i annenhver brønn, se Figur 3-6, som viser en 96 brønns plate, der det er pipetert ut 100  $\mu\text{L}$  høy amfetamin i alle X og 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  i alle 0. Det ble tilsatt 750  $\mu\text{L}$  ACN:MeOH i alle brønner, før det ble satt på lokk. Platen ble satt på whirl-mikser på maks ristehastighet, og ristet 3X lengre tid enn platene "normalt" ristes. 3 ulike lokk ble testet på denne måten.

X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0
0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0
0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0
0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0
0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X

Figur 3-6 Illustrerer en 96-plate med høy prøve (X) og blindprøve (0).

En 96-kanals pipette som REAR har anskaffet ble benyttet under opparbeidelsen. Ulempen med denne pipetten er at den har maks volum på 200  $\mu\text{L}$ , mens det skal tilsettes og overføres volum på 750  $\mu\text{L}$  og ca 700  $\mu\text{L}$ . Det ble derfor utført et forsøk der det ble pipetert et volum på 800  $\mu\text{L}$  frem og tilbake mellom 2 plater 5 ganger, det vil si  $4 \times 5 = 20$  pipetteringer, for å se om det ble noe problem med drypping fra pipetten ned på platene. I dette forsøket var det som ved lokk forsøket, en høy standard i annenhver brønn og blank prøve i de andre brønnene.

## 3.5 Validering

Ved validering av oppgaven benyttes bilag 10,1 i kvalitetshåndboken til RE, dette bilaget følger International Organization for Standardization (ISO) 17025, et dokument fra US Food and Drug Administration (FDA) [29].

### 3.5.1 Retensjonstider

For å se på stabiliteten i retensjonstid, ble retensjonstiden innen en serie vurdert, samt retensjonstiden over 10 serier.

### 3.5.2 Linearitet

Linearitet ble undersøkt for alle komponentene i standard kurveområdet og høyere, både ved høyde og areal beregning. Det ble benyttet standarder på konsentrasjoner opp til 75  $\mu\text{M}$ , også 100  $\mu\text{M}$  for noen komponenter, i dette forsøket.

### 3.5.3 Presisjon og riktighet

For å vurdere metodens presisjon og riktighet har kontroll prøvene fra 10 serier blitt vurdert. På hver serie er det med minst to kontroller med minst to ulike konsentrasjoner. Noen av kontrollene er også med to ganger per serie. For disse kontrollene er det beregnet



gjennomsnitt verdi, standardavvik (SD), relativt standard avvik (RSD) og avvik fra teoretisk verdi, riktighet.

Presisjon innen serie ble vurdert ved å analysere samme prøve 10 ganger på samme serie. Det ble benyttet 2 konsentrasjoner på de fleste komponentene. Denne testen viser instrumentets presisjon.

Det ble også tatt 10 uttak av samme prøve, som ble opparbeidet og analysert på samme serie. Denne testen viser metodens presisjon.

#### **3.5.4 Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) og minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)**

For de fleste komponentene ble MDK og MKK beregnet ut fra en kontroll som lå på ca 1/3 av påvisningsgrensen, eventuelt laveste kontroll for komponenten, på 10 serier. Blindprøvene i de 10 seriene var 0, og fordi vi mener vi får riktigere standard avvik ved å velge en verdi litt høyere enn 0. Ved å bruke 0, blir det bare en varians på verdiene over 0, siden det ikke er resultater med negative verdier, men ved å løfte opp over 0, blir variansen både over og under den valgte konsentrasjon. MDK er beregnet ut fra gjennomsnitt til kontroll 0 + 3 x SD til laveste kontroll for komponenten. MKK er beregnet ut fra gjennomsnitt til kontroll 0 + 10 x SD til laveste kontroll for komponenten.

#### **3.5.5 Overdrag**

Høye prøver som var 2X høyeste standard ble analysert for alle komponenter, med tre blindprøver bak, for å måle overdrag. Det ble opparbeidet to prøver for hver komponent, og prøvene ble analysert to ganger hver, til sammen fire forsøk.

#### **3.5.6 Ekstraksjonsutbytte**

Det ble utført en utbytte test med to sett standardrekker (standard 1-5). Det ene settet ble ekstrahert på vanlig måte, mens det andre settet ble ekstrahert uten intern standard, den ble først tilsatt etter ekstraksjonen. Ved å beregne konsentrasjon av standardrekke tilsatt intern standard før ekstraksjon, mot konsentrasjon på standardrekke hvor intern standard er tilsatt etter ekstraksjon, kan utbytte beregnes. Man forventer at konsentrasjonen der intern standard er tilsatt etter ekstraksjon blir lavere, enn den andre standard rekken, fordi det tapes analytt under opparbeidelsen, men ikke noe tap av intern standard. Konsentrasjonen for analytt beregnes som respons analytt / respons intern standard.

Ved overføring av supernatanten etter felling av blod, ses tydelig at ikke all supernatanten blir med i overføringen, spesielt ikke ved bruk av flerkanalspipette. I første forsøk ble det tatt en omtrentlig beregning etter øyemål, hvor stort tapet ble i dette trinnet, for å beregne korrigert utbytte. Derfor ble det utført et nytt forsøk, der vært overføringstrinn ble målt med pipette.

### 3.5.7 Matrikseffekter

For å undersøke matrikseffekter i blod, ble artikkelen til Matuszewski et al fulgt [21]. Det ble valgt ut 6 ulike blod som alle var negative på komponentene i oppgaven. Det ene blodet var blodbankblod, som var screenet negativt, de 5 andre var positive på diverse andre stoffer, som ulike opiater, THC, benzodiazepiner og alkohol. 2 av blodprøvene var blod tatt ved obduksjon.

Til undersøkelsen ble det valgt å bruke 2 standard nivåer for de fleste komponentene, standard 2 (lav kons) og standard 4 (høy kons), og intern standard. Det ble dermed 3 sett med forsøk, der hvert sett bestod av 8 prøver, 6 med ulike blod og 2 med milli-Q-vann. Fremgangsmåten for hvert sett var som følger; 100 µL av hver av de 8 prøvene ble tilsatt 750 µL ACN:MeOH, prøvene ble ristet og sentrifugert. 650 µL supernatant fra hver prøve ble overført til filterplate og filtrert, etter filtrering ble det utpipetert 550 µL til et rør, der sett 1 fikk tilsatt 100 µL standard 2, sett 2 fikk 50 µL standard 4 og sett 3 fikk 50 µL intern standard. Det var viktig å få med nøyaktig samme mengde av hver av prøvene i hvert trinn, slik at forskjellen på prøvene med blod og milli-Q-vann kun skulle bli matriksen.

Prøvene ble analysert 2 ganger, gang nummer 2 ble prøvene stokket om for å få en annen rekkefølge enn gang nummer 1. Viktig med 2 analyser for å se om det er gjentakende effekter i prøvene eller mer tilfeldige utslag som gir avvik på responsene, og om rekkefølgen har betydning.

En annen test på matrikseffekter er å se på stabiliteten til intern standardene, som har samme konsentrasjon i alle prøvene. Variasjon på respons i 10 ulike serier ble vurdert.

### 3.5.8 Stabilitet og robusthet

På REAR er det to UPLC med Xevo TQ-MS, begge disse er benyttet i oppgaven. På disse to instrumentene har det i samme periode blitt analysert andre metoder, både med spytt og blod matrikser. Siden det ene instrumentet har vært mye nede på grunn av problemer i forbindelse med feil under installasjon og feil oppstått under periodisk vedlikehold (PM), har det blitt stor belastning på det andre instrumentet. Dette har stort sett gått bra, men av og til problemer med litt lav respons rett etter den ene spyttmetoden. Et problem som også de andre metodene fikk, også metoden som lagde problemet. Det jobbes med løsninger for å fjerne dette problemet, det er også flere nye instrumenter på vei inn til REAR, slik at metoder som kan forstyrre for hverandre ikke trenger å bli analysert på samme instrument.

Ved analyse av ukjente prøver blir det analysert parallellt, datasystemet vårt sørger for at disse parallellene ikke blir ut pipetert samtidig og at de ikke blir analysert på samme serie. Dette for å få to uavhengige uttak og for at de ikke skal beregnes med samme standard kurve. Et system der standarder og kontroller har faste plasser, mens de ukjente prøvene leses inn i tilfeldig rekkefølge, gjør at rekkefølgen på prøvene blir ulik for de to parallellene. De to parallellene kan også bli analysert på ulike instrument.

### **3.5.8.1 Uttesting av holdbarhet og stabilitet på opparbeidede prøver.**

Siden det kan oppstå problemer med instrumentene våre, som gjør at ekstraktene ikke kan analyseres samme dag som opparbeidelsen er utført, eller det blir behov for en re analyse, er det viktig å vite hvor holdbare de ekstraherte prøvene er. Holdbarheten til ekstraherte prøver ble testet ved å kjøre serien med standarder, kontroller og 10 ukjente saker, 10 ganger over en periode på 14 dager. Resultatene på kontrollene og de ukjente prøvene ble vurdert med gjennomsnitts verdi, SD og RSD. Prøvene stod i hele perioden i prøvetårnet til instrumentet, som har en temperatur på ca 10 °C.

### **3.5.8.2 Signal/ støy forhold (S/N)**

Robustheten til komponentene og S/N forholdet til komponenten blir mye det samme, det er komponentene med lavt S/N som først sliter når instrumentet begynner å bli "skittent". Derfor ble S/N forholdet til de laveste konsentrasjonene på 21 serier vurdert med gjennomsnittsverdi, RSD og laveste S/N.

### **3.5.8.3 Injeksjonsvolum 2µL, 4µL og 6µL**

For å finne ut hvilken innvirkning volumøkning på injeksjon fra 2 µL til 4 µL eller 6 µL har på retensjonstid, respons og S/N, ble samme serie analysert med de tre injeksjonsvolum. Om stabiliteten til retensjonstiden er stabil ved større volum av tilnærmet 100% organisk injeksjon. Også interessant om 200% økning i volum gir 200% økning i respons, og ikke minst om det gir 200% økning i S/N.

### **3.5.8.4 Inndampingsforsøk**

I starten av oppgaven var det behov for oppkonsentrering av prøvene på grunn av problemer med instrumentene. Når instrumentet ble i orden, ble det ikke lengre behov for oppkonsentreringen. Det er allikevel interessant å være klar over muligheten og resultatene på respons og S/N, dersom det av ulike årsaker blir behov for en oppkonsentrering igjen. Det gir metoden en ekstra robusthet, dersom det er litt å gå på i forhold til respons og S/N på komponentene i metoden. Derfor er resultatene fra inndampingsforsøket med i oppgaven.

## **3.5.9 Sammenligning med gammel metode**

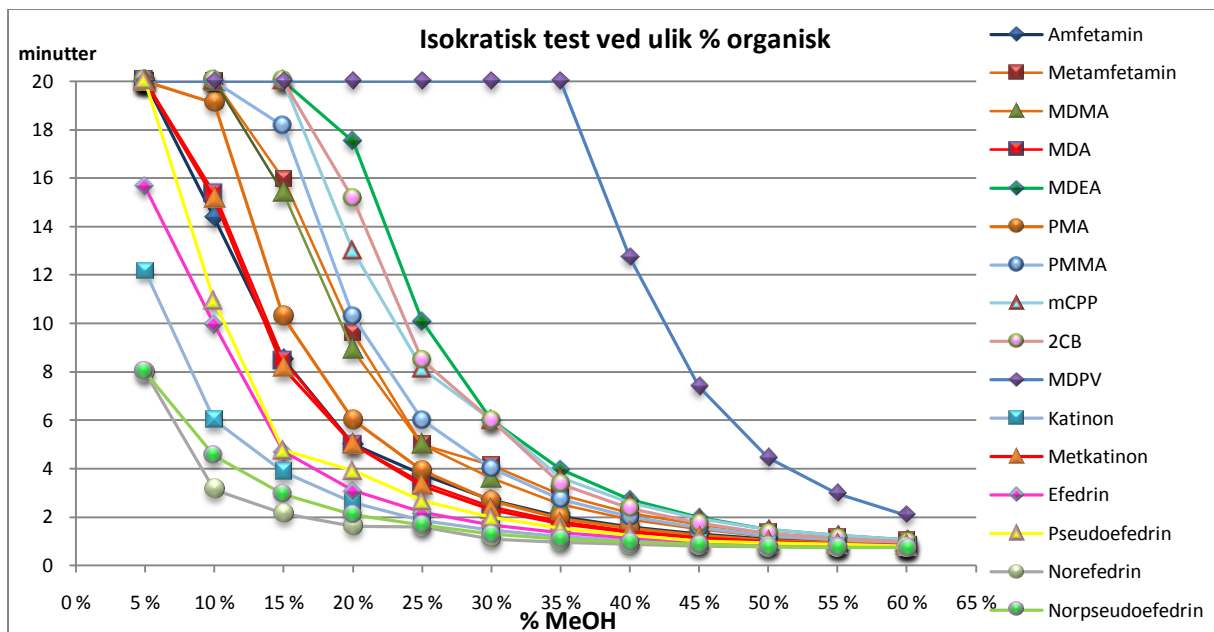
Ny metode ble kjørt parallelt med gammel metode i en periode på ca 3 uker, i denne perioden var det to uavhengige uttak til begge metoder. Prøvene på ny metode ble fordelt på til sammen 10 ulike serier, totalt 120 ukjente saker (240 prøver). Flere av komponentene har få, sjelden eller nesten aldri positive funn, for de med få funn, ble det etter rekvirert noen saker. For de med sjelden eller nesten aldri ble det ingen sammenligning mellom ny og eksisterende metode foruten kontrollene, som er de samme på begge metoder.

## 4 Resultater og diskusjon

### 4.1 Valg av UPLC betingelser

#### 4.1.1 Valg av gradient programmet

Figur 4-1 viser eluering ved ulike % organiske. Ved første test på 5% MeOH er det kun norpseudoefedrin, norefedrin, katinon og efedrin som i løpet av 20 minutter kommer gjennom kolonnen til detektoren. De komponentene som ligger på 20 minutter, er de som ikke rakk frem til detektoren i løpet av 20 minutter. Ved 10%, 15% og 20% har vi en veldig god spredning på komponentene, men de bruker lang tid, det er spesielt MDPV som holder igjen. Ved >35% MeOH bruker alle komponenter, minus MDPV, mindre enn 4 minutter gjennom kolonnen, og ved > 50% er de samme komponentene gjennom på under 2 minutter. Det kan se ut som det er mellom 30% og 50% organisk, det kan bli behov for å bremse litt på komponentene for å få en best mulig separasjon, samt en analysetid på rundt 4-5 minutter.



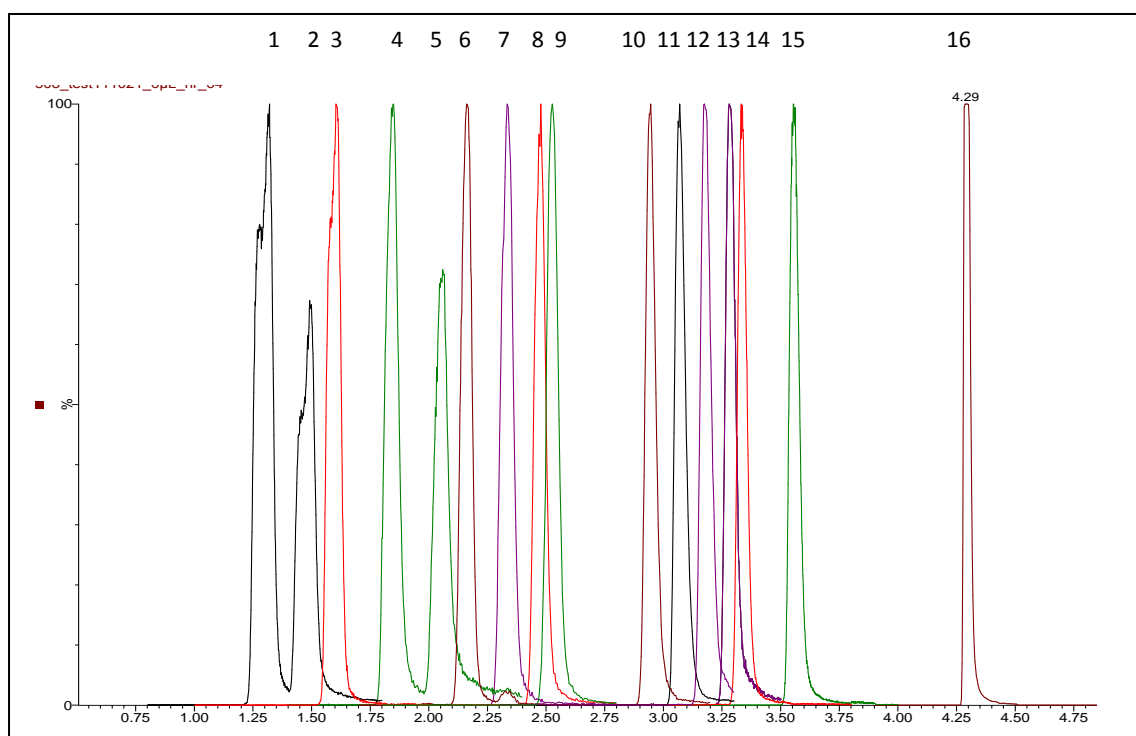
Figur 4-1 Eluering ved ulike elueringsgrad.

I testen Figur 4-1 følger flere av komponentene hverandre tett, som amfetamin, MDA og metkatinon, og som metamfetamin og MDMA. Disse kan det se ut til å bli en utfordring å separere.

Tabell 4-1 Gradient programmet ved bruk av ammoniumformatbuffer med pH 10,2 og MeOH. Kurve 6 er i gradient programmet til Waters en lineær kurve.

Gradient;	Tid (min)	1: Buffer	2;MeOH	Kurve
	0,00	95%	5%	6
	0,15	95%	5%	6
	0,30	70%	30%	6
	2,00	60%	40%	6
	3,00	50%	50%	6
	4,20	2%	98%	6
	5,20	2%	98%	6
	5,40	95%	5%	6

Tabell 4-1 viser valgt gradient program, etter en del uttesting på å separere komponentene i metoden mest mulig. Under i Figur 4-2 er kromatogram som viser separasjonen vi fikk med gradientprogrammet, hvilken komponent de ulike toppene er, se Tabell 4-2. I kromatogrammet er det ikke valgt å justere komponentene i forhold til virkelig intensitet % i forhold til hverandre, men intensitet % fra hver inndelt gruppe i MS metoden se Figur 3-3, Derfor har de fleste en intensitet på 100 %, siden hensikten er å vise separasjonen på komponentene.



Figur 4-2 Kromatogram som viser separasjon av komponentene med gradient programmet. X-aksen er retensjonstiden i minutter og y-aksen er % intensitet (abundance).

Tabell 4-2 Tabell med komponentnavn til figur 4-2

1. Norefedrin	2. Norpseudoefedrin	3. Katinon	4. Efedrin	5. Pseudoefedrin
6. Metkatinon	7. MDA	8. PMA	9. Amfetamin	10. MDMA
11. PMMA	12. Metamfetamin	13. 2C-B	14. mCPP	15. MDEA
16. MDPV				

De fleste toppene er separert, også de som fulgte hverandre tett i den isokratiske testen, Figur 4-1. Separasjonen på amfetamin, MDA og metkatinon er nesten grunnlinje separert, mens PMA har fått en overlapp med amfetamin. 2C-B og mCPP er også to topper som har fått en del overlapp. Alle disse komponentene har ulik molekylmasse, så det bør ikke bli problemer med disse overlappingene i metoden.

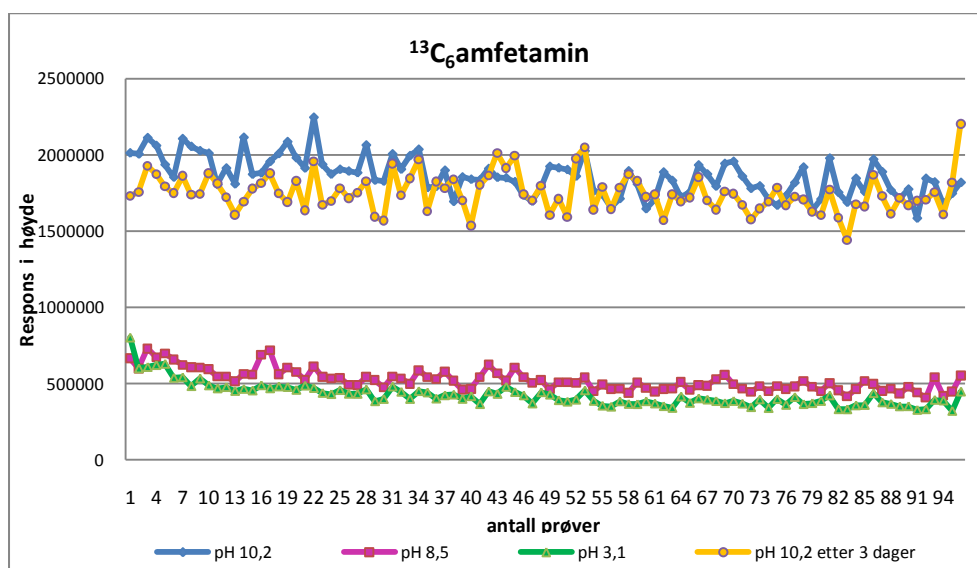
## 4.1.2 Mobilfaser

### 4.1.2.1 Ammoniumformatbuffer pH 3,1, pH 8,5 og pH 10,2

Det er primært intern standardene som blir sett på i dette forsøket, og da igjen  $^{13}\text{C}_6$ amfetamin. Alle de tre intern standardene gav lignende resultater i buffer testene, se Tabell 4-3.

Toppbredden ligger jevnt mellom 3,5 og 4 sekunder ved alle tre pH verdier, ingen signifikant forskjell. Den har derfor ingen betydning for resultatet, og dermed ikke tatt med videre i vurderingen.

Figur 4-4 viser at det blir en høyere respons med buffer pH 10,2 enn med buffer pH 3,1 og buffer pH 8,5, responsen er 3-4 ganger høyere, som er en betydelig forskjell.



Figur 4-4 Responsen for intern standard  $^{13}\text{C}_6$ amfetamin ved ammoniumformat buffer med ulik pH.

I Tabell 4-3 varierer responsen på høyde likt ved ulik pH for de tre intern standardene, variasjonen på responsen innen serien for de tre bufferne har små variasjoner. RSD på responsen er litt lavere for pH 10,2 enn for pH 8,5 og pH 3,1 for alle tre intern standarder. pH 10,2\* er gjentakelse av pH 10,2 etter 3 dager, en kontroll på holdbarheten til prøvene, siden det er de samme prøvene som hver sin dag ble analysert med ulik pH. Det er ikke noe stor forskjell fra dag en til dag tre, -4 % til -15% er betydelig mindre enn reduksjonen ved pH 3,1 og pH 8,5. Instrumentet ble primet godt mellom skifte av pH.

Tabell 4-3 Viser respons, RSD og avvik mellom bufferne for intern standardene

Komponent (antall prøver)	pH 10,2		pH 8,5			pH 3,1			pH 10,2 *		
	Respons høyde	RSD	Respons høyde	RSD	Avvik pH10,2	Respons høyde	RSD	Avvik pH10,2	Respons høyde	RSD	Avvik pH10,2
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> amfetamin (n=96)	1306291	7%	325854	13%	-72%	424271	18%	-77%	1750606	7%	-6%
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> metamfetamin (n=96)	2866249	9%	737637	15%	-74%	701998	21%	-76%	2741841	12%	-4%
MDMD-d5 (n=96)	930360	10%	360968	15%	-61%	381402	16%	-59%	788468	9%	-15%

Tabell 4-4, som er variasjon i høyde respons for komponentene ved ulike pH, viser det at 2 komponenter skiller seg ut. For de fleste komponentene er reduksjonen i respons på -50 til -90 %, mens for mCPP og 2C-B er det en økning på ~100% ved bruk av pH 8,5. Ved pH 3,1 er det også en liten økning for mCPP, her ble det dessverre et uhell med 2C-B, som falt ut av testen, derfor ingen resultat.

Tabell 4-4 Respons variasjon for komponentene i metoden ved ulike pH

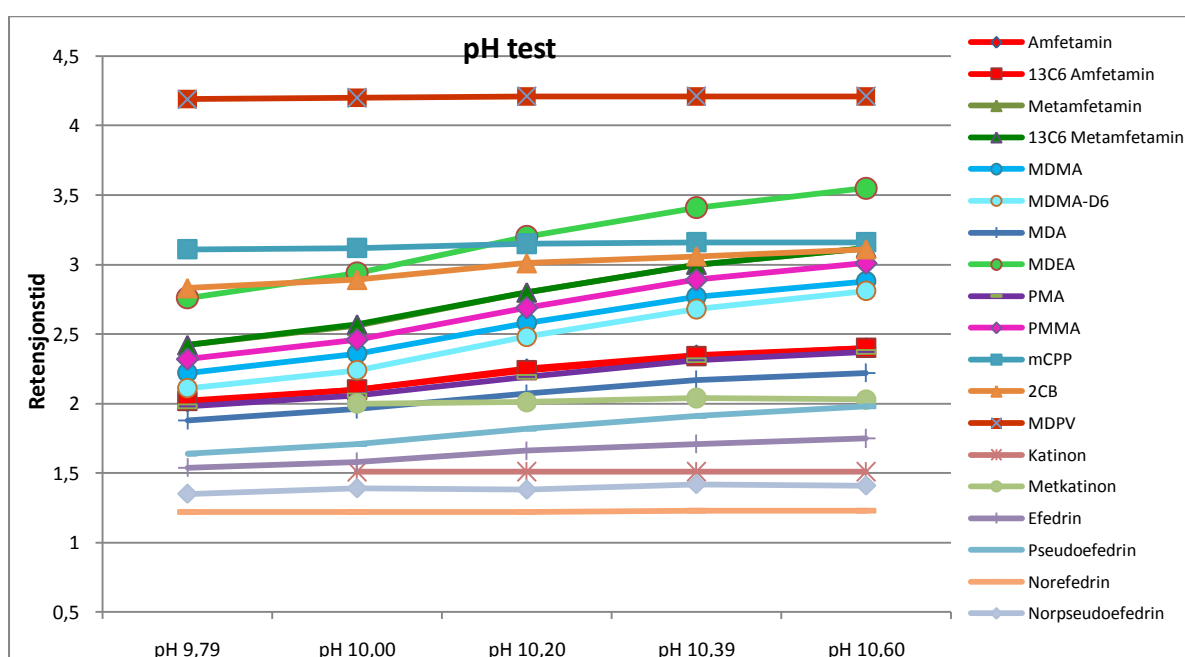
Komponent og (antall)	pH 10,2	pH 8,5		pH 3,1		pH 10,2 *	
	Respons høyde	Respons høyde	Avvik pH 10,2	Respons høyde	Avvik pH 10,2	Respons høyde	Avvik pH 10,2
Amfetamin (n=82)	1306291	325854	-75%	277062	-79%	1385706	6%
Metamfetamin (n=69)	4055377	1312644	-68%	1258503	-69%	4276397	5%
MDMA (n=23)	1222829	542613	-56%	546645	-55%	1086857	-11%
MDA (n=16)	878350	329508	-62%	343090	-61%	790157	-10%
MDEA (n=12)	2957351	1204785	-59%	1192432	-60%	2627712	-11%
PMA (n=15)	304116	119643	-61%	122806	-60%	291532	-4%
PMMA (n=30)	1012157	327582	-68%	300661	-70%	934773	-8%
mCPP (n=14)	191466	476811	149%	222447	16%	147016	-23%
2C-B (n=11)	92207	171859	86%			83360	-10%
MDPV (n=12)	2165827	1514705	-30%	674687	-69%	2630222	21%
Katinon (n=6)	365554	118646	-68%	89075	-76%	286364	-22%
Metkatinon (n=6)	693648	260197	-62%	204614	-71%	410605	-40%
Efedrin (n=5)	1020163	345212	-66%	269383	-74%	799934	-22%
Pseudoefedrin (n=5)	481955	344992	-28%	252471	-48%	400193	-17%
Norefedrin (n=7)	669109	82051	-88%	86736	-87%	607806	-9%
Norpseudoefedrin (n=6)	551304	78115	-86%	72459	-87%	509455	-8%

Også her er det med en pH 10,2\*, som er etter 3 dager. Noen av disse resultatene varierer en del fra dag en til dag tre, spesielt metkatinon og MDPV som benytter samme intern standard. Denne testen ble analysert i en periode hvor analyseinstrumentet hadde noen feil,

som ble oppdaget senere, som førte til plutselige ustabile responser. Derfor blir resultatet her vurdert i mer grove trekk, som at responsene er betydelig lavere ved pH 3,1 og pH 8,5 enn ved pH 10,2, med unntak av mCPP og 2C-B.

#### 4.1.2.2 Retensjons stabilitet ved små endringer av mobilfasens pH.

Små endringer i pH kan gi små endringer i retensjonstid for flere av komponentene, se Figur 4-5. Retensjonstidene øker litt med økende pH, maks økning er under 0,8 minutt, fra pH 9,79 til pH 10,60 (MDEA), en økning som normalt ikke vil gi problemer med MS metoden (Figur 3-3) som benyttes. MS metoden benytter 1 minutt på hver gruppe, så en variasjon på 0,8 minutter er innenfor gruppen. En variasjon på pH fra 9,79 til 10,60 er mye, siden det benyttes pH meter som minst kalibreres og kontrolleres annenhver uke, for å tilfredsstille krav fra norsk akkreditering, er risikoen liten for at variasjonen blir så stor.



Figur 4-5 Retensjonstid stabilitet ved endringer i pH

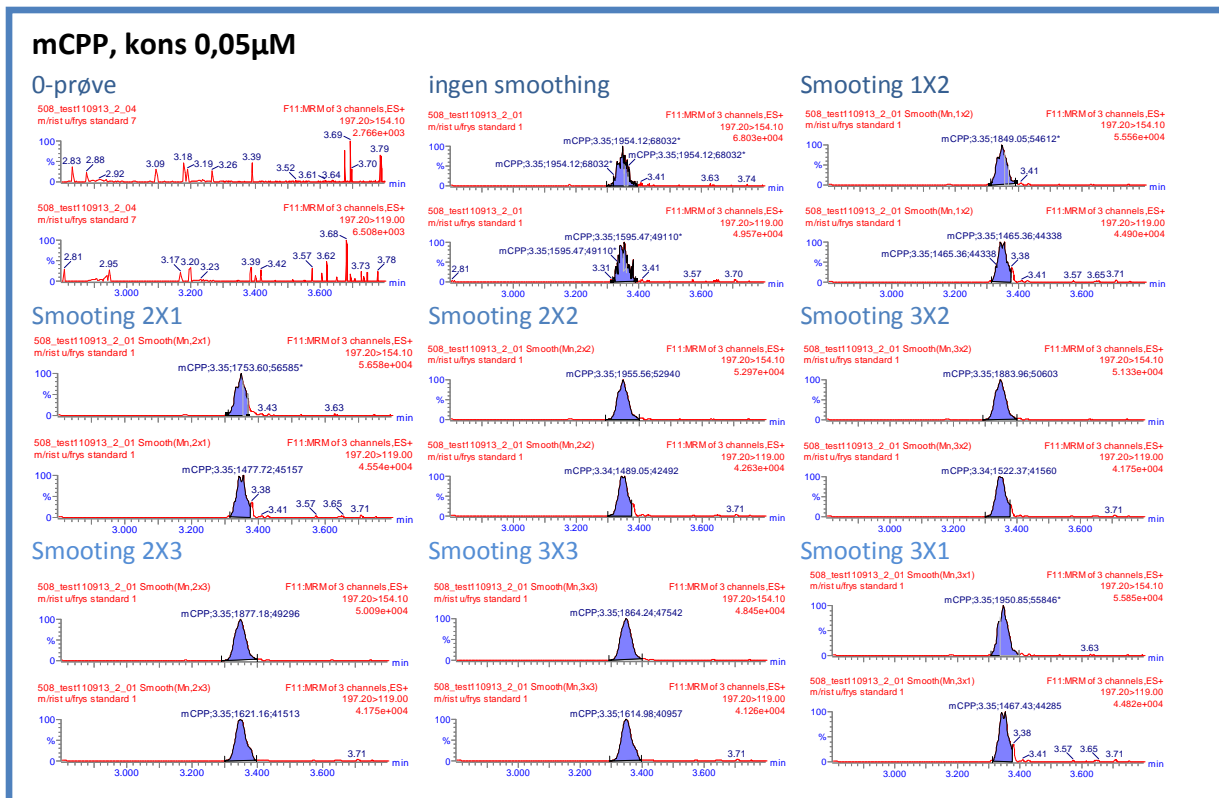
## 4.2 Valg av MS/MS betingelser

Ved valg av kvantifiserings ion ble samme overgang benyttet for intern standard, der analytten har egen intern standard. For eksempel når overgangen 136>91 ble valgt for amfetamin, ble tilsvarende overgang 142>97 valgt for <sup>13</sup>C<sub>6</sub>amfetamin, se appendiks Tabell 7-1, som viser struktur av fragment ionene benyttet i metoden..

Glatting av topper hadde størst betydning for komponenter med lavest påvisningsgrense og lavest respons på toppene. mCPP er en av komponentene der behovet for glatting av toppen var størst, for at hele toppen skal integreres under beregningen uten behov for manuelle integreringer, se Figur 4-6. Figuren viser en svært taggete topp, ved uten glatting, som er tydelig forskjellig fra negativ prøve, til en mer jevn topp ved glatting 3X3.

Appendiks Figur 7-1 og Figur 7-2, er tabeller som viser kromatogram med ulik glatting for andre komponenter, sammenlignet med negativ prøve.





Figur 4-6 Kromatogram av mCPP med konsentrasjon 0,05µM, sammenlignet med 0-prøve, med og uten glatting av topp.

### 4.3 Valg av prøveopparbeidelse

I hvert av forsøkene var det med vandige standarder som ikke ble ekstrahert, som et mål på utbytte i forsøkene. Standardene hadde samme konsentrasjon, og de ble løst i samme volum som sluttvolumet til standardene i ekstraksjonene.

#### 4.3.1 Væske-væske ekstraksjon

Væske-væske ekstraksjon viste seg raskt å bli vanskelig på 96-plate format, det var flere trinn som ble kompliserte som blant annet trinnet der organisk fase skal skilles fra vandig fase. Her er det viktig på grunn av inndampingen senere, at det ikke blir med noe vandig fase i overføringen. Siden det var litt vanskelig ved bruk av flere kanals pipette, ble også inndampingstrinnet vanskelig. Bruk av ulike løsningsmidler viste lite effekt, men bruk av syreløsning før inndampning bedret utbyttet, maks utbytte ca 20%. Resultater ble så dårlig og opparbeidelsen vanskelig, så det ble valgt å prøve andre teknikker enn væske – væske ekstraksjon, før eventuelt flere forsøk.

#### 4.3.2 Fast fase ekstraksjon.

Fast fase ekstraksjon var greit å utføre på 96-plater, Oasis MCX kolonnene ble testet først, her ble utbytte på ca 50%. Resultatet ble litt dårligere med Phenomenex Strata sin utviklingsplate, samme ekstraksjon ble først testet på de 4 ulike sorbentene i platen. Her var det kun Strata-X-C (sterk kationbytter og omvendt fase) som gav noe særlig utbytte (30% - 40%). Det ble utført forsøk med å tilsette syre i prøvene før de settes på kolonnen, og å

bruke vann tilsatt syre til vask av kolonnene, for at de basiske amfetamin komponentene skulle feste seg bedre til omvendt fase kolonnen. Det ble litt begrenset hvor mange forsøk som var mulig å utføre på den ene tilgjengelige 96-platen, beste utbytte tilslutt ble ca 50%, med litt for mange trinn i forhold til å utvikle en enkel prøveopparbeidelse.

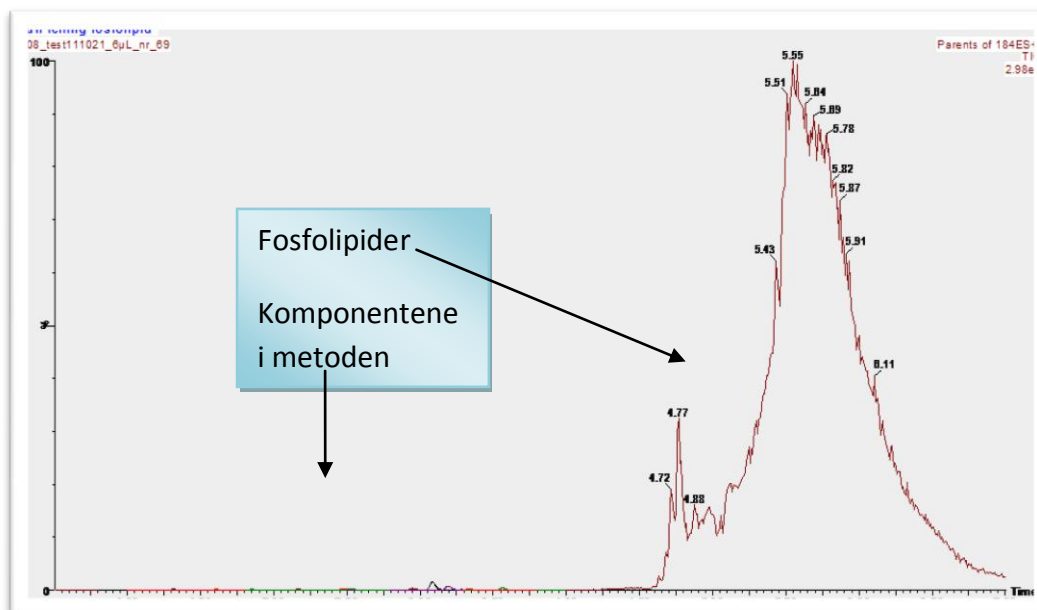
### 4.3.3 Filterplater

Bruk av filterplater er en enkel prøveopparbeidelse, kun felling av blodprøvene før filtrering. Det var små forskjeller i utbytte på de fire filterplatene som ble testet, Captiva best på ~78%, Suppelco på ~63%, og både Ostero og Strata Impact på ~60%. På alle filterplatene gikk ekstraktene gjennom filtrene uten problemer ved hjelp av vannavsug. Captiva filtrene har et non drip (ND) system, som gjør at ekstraktene ikke renner gjennom filteret før det blir satt på vakuüm med pumpe eller vannavsug. For å kunne bruke 96-kanalspipette ved overføring av ekstraktene til filterplaten er dette viktig, slik at vi kan flytte filterplaten fra pipetten til ekstraktor med oppsamlingsplate før prøvene renner gjennom. Det ble utført test på Ostero filteret i ettertid, som viser at heller ikke her renner det gjennom uten sug. De to siste filtrene ble ikke testet for dette.

### 4.3.4 Fosfolipider

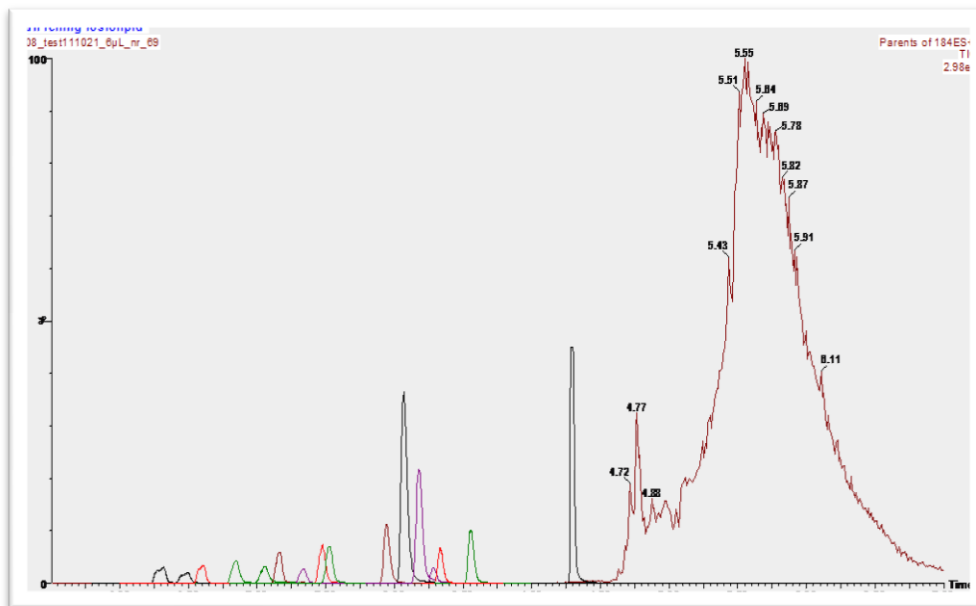
For å se hvor mye fosfolipider som er i blodprøvene som skal analyseres i metoden, ble det kjørt foreldre ion scan på en blodprøve som kun var felt med ACN og MeOH. Denne prøven ble sammenlignet med en prøve der alle komponentene i metoden hadde konsentrasjon 0,2  $\mu\text{M}$  (påvisningsgrense for blant annet amfetamin, metamfetamin og MDMA) og en prøve med høy konsentrasjon (20  $\mu\text{M}$ ) for alle komponentene.

Figur 4-7 viser størrelses forskjell på toppene til fosfolipidene og toppene til komponentene i metoden ved konsentrasjon 0,2  $\mu\text{M}$ .



Figur 4-7 Sammenligning av fosfolipid topp med topper av komponentene med konsentrasjon 0,2  $\mu\text{M}$

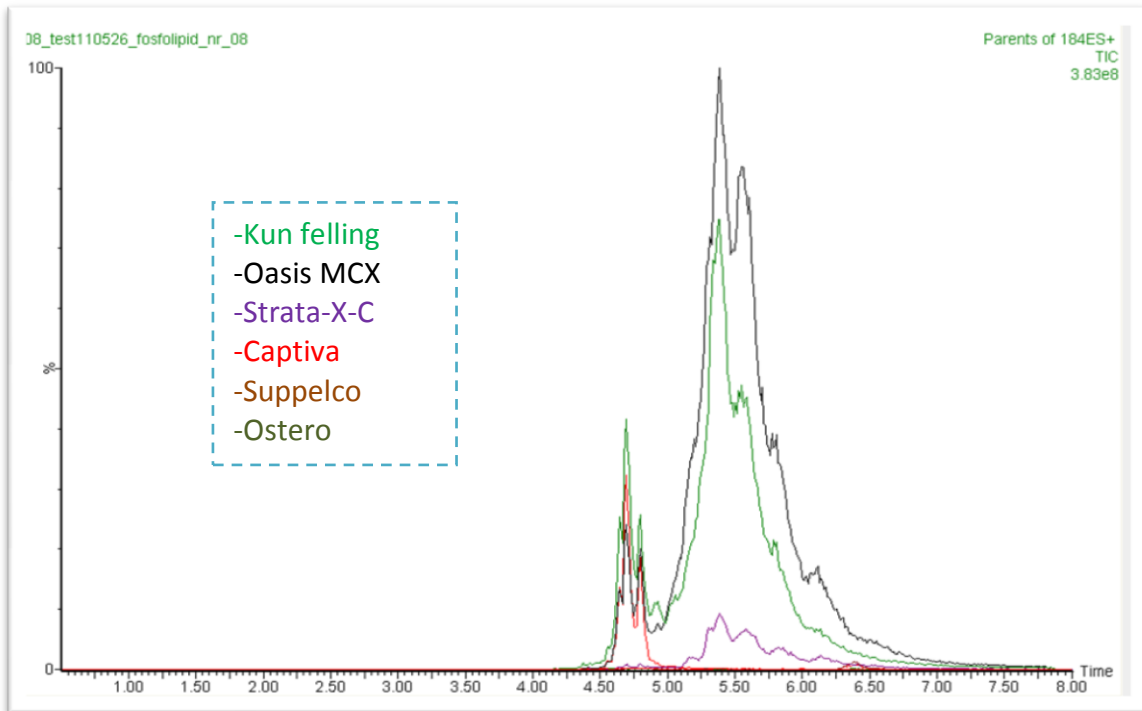
Ved å sammenligne fosfolipidtoppen med en standard med konsentrasjon 20  $\mu\text{M}$  på alle komponenter, blir også disse toppene små i forhold til fosfolipidtoppene.



Figur 4-8 Sammenligning av fosfolipidtoppen mot komponenter med konsentrasjon 20 $\mu\text{M}$

Det er ikke vanskelig å tenke seg at den meget store toppen av fosfolipider vil kunne forurense analyse instrumentet, det er også den erfaring som er observert i andre blod metoder på REAR, instrumentene raskt blir dårlig igjen etter vedlikehold, responsen avtar og de laveste toppene blir mer "taggete". I Figur 4-8, der alle komponentene har samme konsentrasjon men ulik høyde på toppen (ulik respons). Komponentene med lavest respons får ofte først problemer. Derfor er det viktig å få fjernet en del av fosfolipidene under prøveopparbeidelsen.

Figur 4-9 viser hvordan prøve opparbeidelsene testet i denne oppgaven renser for fosfolipider. Væske – væske ekstraksjon er ikke med i testen, da det tidlig ble klart at opparbeidelsen ble vanskelig å få til på 96-plater. Strata Impact filteret er heller ikke med i testen, dette filteret ble først mottatt senere.



Figur 4-9 Fosfolipidtoppene ved de ulike prøveopparbeidelsene.

I Figur 4-9 kan det se ut som det blir mer fosfolipider ved bruk av Oasis kolonner enn ved kun felling av blodprøvene, det stemmer nok ikke siden den samme fellingen også ble brukt før prøvene ble satt på Oasis kolonner. Denne testen ble utført over flere dager med ulikt blod, dette er derfor et tilfeldig utfall i denne testen. Det ble utført flere tester på hver av opparbeidelsene som alle viste samme tendens og resultat. Opparbeidelsen som ble brukt på Oasis kolonnene, ser ikke ut til å fjerne noe av fosfolipidene sammenlignet med prøver som kun var gjennom en felling før analyse. Ved bruk av Captiva filteret fjerner vi den bakerste og største fosfolipidtoppen, men sitter igjen med toppen ved ca 4,5 min (rød kurve). Strata X-C (lilla kurve) gir en liten topp (her er også utbytte ganske lavt), mens Suppelco filter og Ostero filter ikke gir noen synlig kurve i dette bildet. Strata Impact filteret ble testet senere, her ble fosfolipidtoppen nesten på høyde med Oasis MCX. Suppelco og Ostero er de to filtrene som renser best bort fosfolipidene med fremgangsmåtene brukt i denne oppgaven.

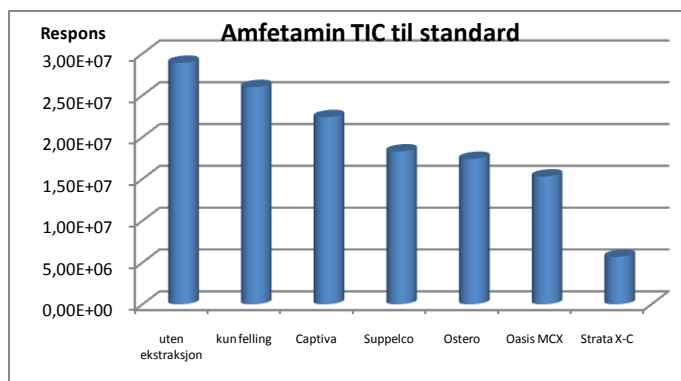
#### 4.3.5 Resultat på test av utstyr, tette lokk og 96 kanals pipette.

2 av 3 lokk var tette nok til å riste prøvene godt ved felling av blod med ACN:MeOH. Lokk som kan benyttes er Axymat AM-2 mL-RD fra VWR og 96 well cap neutral fra Nunc.

Bruk av 96 kanals pipette ga ingen overdrag, her er kun ulempen at det er unødvendig tungvindt, siden kun 200 µL er maks volum. Det er etter dette forsøket kjøpt inn ny 96 kanals pipette, der maks volum er 1200 µL fra Integra, slik at 700 – 750 µL kan tilsettes og overføres i ett trinn.

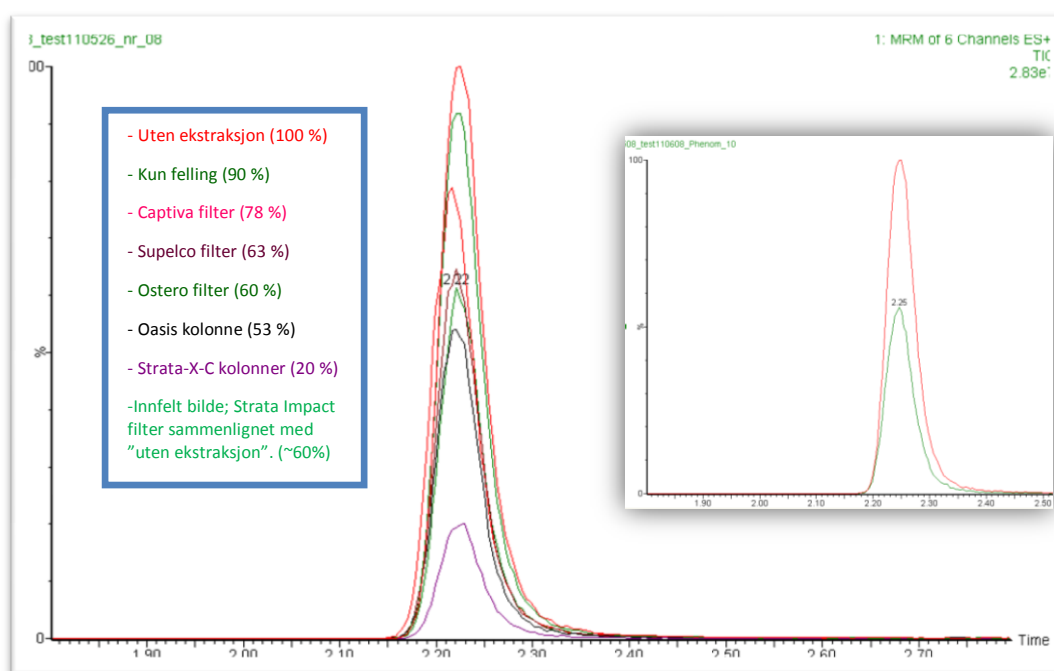
### 4.3.6 Sammenligning av prøve opparbeidelsene.

Figur 4-10 viser respons på totalt ion kromatogram (TIC) til amfetamin gruppen (overgangene til amfetamin og  $^{13}\text{C}_6$  amfetamin) ved ulike prøve opparbeidelsene. Det tapes litt respons ved felling av blodprøven, mer ved filtrering eller kolonner, og responsen blir lavest ved bruk av Strata-X-C.



Figur 4-10 Sammenligning av respons til standard ved ulik prøveoppbeidelse.

Figur 4-11 viser kromatogram av TIC toppen til amfetamin for alle prøve opparbeidelsene i samme bilde. Prøveoppbeidelsen på Strata Impact er lagt som eget bilde ved siden av.



Figur 4-11 Sammenligning av kromatogrammet til amfetamin TIC toppen ved ulik prøveoppbeidelse.

På bakgrunn av disse resultatene, enkelhet og av hensyn til andre metoder på REAR, ble det valgt å gå videre med Captiva filtrene. Disse filtrene slipper gjennom litt mer fosfolipider enn de "beste", men de gir bedre respons på "utbytte" testen under opparbeidelsene enn de andre. Dette filteret kan også benyttes på en annen metode på REAR, der det har vært negative resultater ved test av de andre filtrene. Det er ønske om mest mulig standardisert utstyr, for å minske muligheten til å ta feil utstyr under opparbeidelsen, og for mulighet til å

slå sammen metoder under ekstraksjon. Dersom metoder har samme opparbeidelse og utstyr, er det mulighet for å dele 96-plater under prøveopparbeidelsen, som gir mulighet for oftere analyse av metodene, som igjen virker positivt på svartid.

#### 4.4 Metodevalideringen

Metodevalideringen ble utført med prøveopparbeidelse på Captiva filterplater.

##### 4.4.1 Retensjonstider

Innen samme serie er stabiliteten på retensjonstiden (RT) til intern standardene svært bra, litt mer variasjon over 10 serier, som skyldes mest dag til dag variasjon Tabell 4-5. En RSD på 2,31% for MDMA-d5 gir ingen problemer med å detektere MDMA-d5 i riktig MS gruppe, Figur 3-3, som går over 1 minutt, men det kan bli for stor variasjon for vinduet i target lynx som er satt til  $\pm 0,1$  minutter. Slik at vinduet da bør justeres før intern standard toppen forsvinner ut av vinduet. De to andre intern standardene vil vi mest sannsynlig se uten behov for justering av vinduet. Verdier som kommer utenfor vinduet vil ikke bli sett, disse kan mistes ved beregning av serier.

Når det gjelder innen serie, holder alle intern standardene seg innen for vinduene i TargetLynx, i tillegg holder alle seg innenfor grensen som er satt på variasjon i retensjonstid på 1% innen serie. 1% for retensjonstid på ca 3 minutter gir et vindu på ca 0,030 minutter, mens MDMA-d5 med RSD på 0,17% har resultater innenfor et vindu på 0,019 minutter. Verdier som kommer utenfor 1% blir flagget ut, men blir allikevel med i beregningen av serien.

Tabell 4-5 Stabilitet på retensjonstider til intern standardene.

Analytt	N	Innen serie retensjonstid	Innen serie RSD	N	10 serier retensjonstid	10 serier RSD
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> amfetamin	47	2,500	0,16 %	455	2,530	1,54%
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> metamfetamin	47	3,174	0,16 %	455	3,222	1,91%
MDMA-d <sub>5</sub>	47	2,846	0,17 %	355	2,899	2,31%

For komponenten benyttes relativ retensjonstid (RRT), som er retensjonstid for komponent/retensjonstid for intern standard. RRT har et vindu på  $\pm 0,05$  minutter, og det er satt en grense på 1% i variasjon innen serien. I Tabell 4-6 ser vi resultatene innen en serie og over en periode på 10 serier, i kolonnen RSD for RRT innen serie er også RSD for retensjons tid med i parentes. For å vurdere om bruk av RRT har noe fordel for komponenter som ikke har egen intern standard. Det er kun amfetamin, metamfetamin og MDMA som har egen intern standard, de andre komponentene benytter MDMA-d5 som intern standard.

Komponentene med egne intern standarder har lave RSD verdier både inne serie og over 10 serier, ingen problemer med å holde komponent toppene innenfor vinduene. Stabiliteten på

RRT er tilfredsstillende for alle komponentene innen serie i metoden, ingen problemer med å detektere toppene innenfor vinduet.

Oppdatering av RT er en enkel prosess i Target Lynx, oppdatering av RRT er litt mer jobb. Begge oppdateringene gjøres ofte under beregning av serier på REAR dersom RT eller RRT varierer litt fra forrige serie, slik at toppene til komponentene stort sett alltid befinner seg midt i vinduet. Derfor blir det ikke noe problem at det er litt variasjon fra serie til serie i RRT.

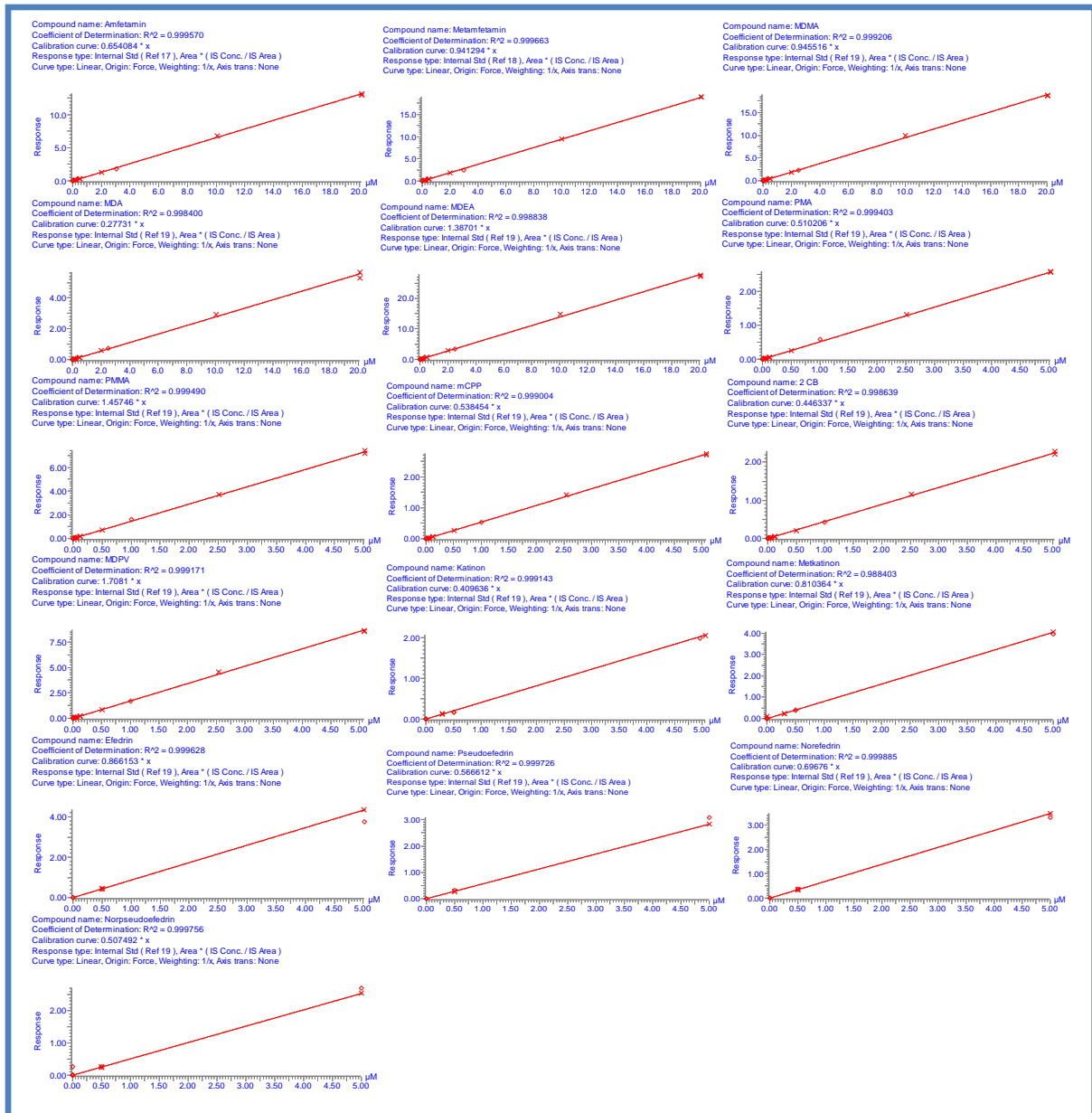
Tabell 4-6 Stabilitet på relativ retensjonstid for komponentene i metoden.

Analytt	N	Innen serie, RRT	Innen serie RSD ved RRT (RSD ved RT)	N	10 serier RRT	10 serier RSD ved RRT
Amfetamin	37	1,001	0,11% (0,20%)	361	1,001	0,10%
Metamfetamin	38	1,000	0,05% (0,18%)	352	1,000	0,05%
MDMA	13	1,030	0,07% (0,20%)	132	1,028	0,30%
MDA	13	0,812	0,08% (0,16%)	132	0,808	0,79%
MDEA	13	1,241	0,13% (0,12%)	132	1,235	0,75%
PMA	11	0,861	0,09% (0,20%)	134	0,856	0,74%
PMMA	14	1,075	0,10% (0,24%)	147	1,073	0,30%
mCPP	12	1,171	0,27% (0,13%)	131	1,153	2,12%
2C-B	12	1,140	0,13% (0,17%)	130	1,128	1,28%
MDPV	13	1,509	0,25% (0,03%)	136	1,484	2,27% (0,05%)
Katinon	7	0,565	0,24% (0,12%)	72	0,556	2,09%
Metkatinon	7	0,761	0,23% (0,13%)	74	0,750	2,01%
Efedrin	6	0,646	0,12% (0,23%)	63	0,644	0,90%
Norefedrin	7	0,461	0,21% (0,13%)	65	0,455	1,85%
Norpseudoefedrin	7	0,524	0,13% (0,10%)	72	0,517	1,63%
Pseudoefedrin	6	0,720	0,09% (0,10%)	62	0,718	0,48%

Enkelte komponenter virker mer stabile ved bruk av RT istedenfor RRT, spesielt MDPV, men også mCPP, katinon og metkatinon. Disse vil bli vurdert videre ved oppstart av metoden i rutinen på RE.

#### 4.4.2 Linearitet

Lineariteten for komponentene ble testet både ved høyde og areal beregning. Figur 4-12 viser lineariteten for komponentene i standardkurve område ved bruk av areal respons ved beregning. Alle komponentene er lineare i dette området, både ved bruk av areal og høyde, det er sjelden at komponenter er høyere enn høyeste standard. I tilfeller der konsentrasjonen er høyere, blir prøvene fortynnet og re analysert for å ligge innenfor området til standard kurven. Det er derfor også mulig å velge kurver som ikke er lineære, når man har flere konsentrasjonsnivåer på standardene.



Figur 4-12 Linearitet ved bruk av areal for alle komponentene i metoden.

Linearitet for komponentene opp til  $75 \mu\text{M}$  for noen og  $100 \mu\text{M}$  for andre, både areal og høyde beregning, se appendiks Figur 7-5 og Figur 7-6.

#### 4.4.3 Presisjon og riktighet

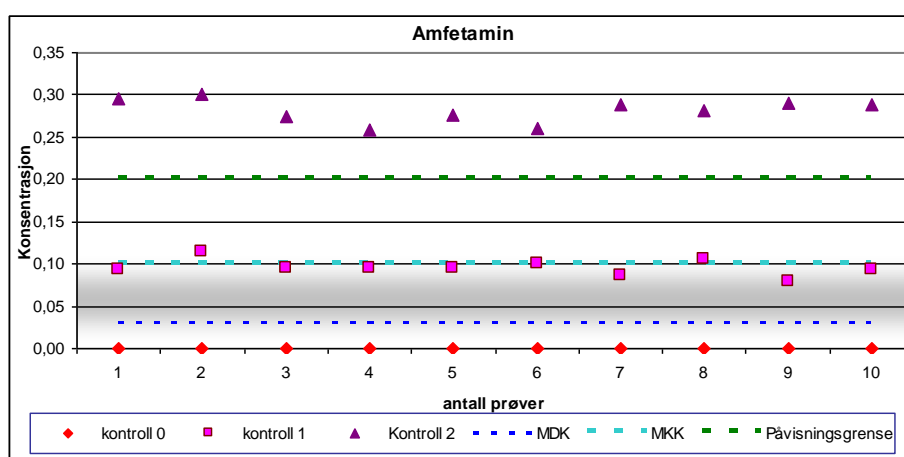
10 serier som ble analysert over en periode på ca 3 uker ble benyttet til å beregne metodens presisjon og usikkerhet. Alle de 10 seriene ble beregnet både med respons på høyde og med respons på areal. Hver komponent har tabell over resultat, diagramplott som viser stabilitet til kontroller og kromatogram som viser laveste kontroller i forhold til blind prøve. Det er mest på amfetamin, metamfetamin og MDMA det blir sett mest på her, de andre resultatene ligger bak i appendiks 7.4.



Tabell 4-7 viser resultatene for amfetamin, der areal verdiene er litt bedre en høyde verdiene for standardavvik og avvik fra teoretisk verdi. Av disse er det presisjonen som vil ha stor betydning for vurdering av metoden, det at det ved bruk av samme standarder og kontroller, gir samme resultat hver gang. Avvik fra teoretisk verdi forteller at det er avvik mellom standarder og kontroller som benyttes i metoden, dersom dette avviket er stort, vil det være behov for å lage nye standard-, og/ eller kontroll løsninger. Et avvik innenfor  $\pm 10\%$  regnes som OK. For amfetamin er presisjonen stort sett bra, litt høyere for kontroll 0,10 $\mu$ M (halvparten av påvisningsgrensen), men innenfor det som aksepteres. Standard avviket til kontroll 0,10 $\mu$ M areal er benyttet til å beregne minste detekterbare konsentrasjon og minste kvantifiserbare konsentrasjon, som er plottet i Figur 4-13.

Tabell 4-7 Presisjon og riktighet for amfetamin

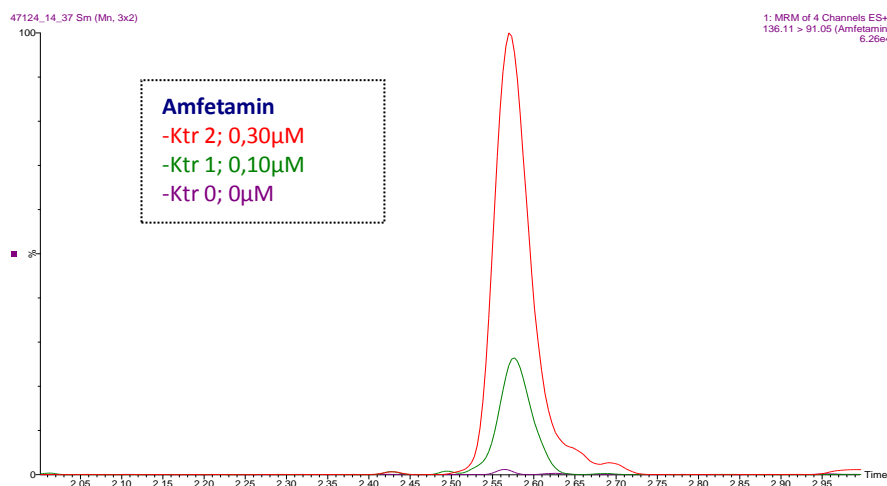
Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0 $\mu$ M			0%		
Kontroll 1; 0,10 $\mu$ M	høyde	10	0,09 $\mu$ M	0,07 $\mu$ M	0,12 $\mu$ M	-9,0%	0,015	16,7%
Kontroll 1; 0,10 $\mu$ M	areal	10	0,10 $\mu$ M	0,08 $\mu$ M	0,12 $\mu$ M	-4,2%	0,010	10,4%
Kontroll 2; 0,30 $\mu$ M	høyde	20	0,28 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,34 $\mu$ M	-6,0%	0,022	7,9%
Kontroll 2; 0,30 $\mu$ M	areal	20	0,29 $\mu$ M	0,26 $\mu$ M	0,32 $\mu$ M	-4,5%	0,016	5,5%
Kontroll 3; 3,03 $\mu$ M	høyde	10	2,82 $\mu$ M	2,68 $\mu$ M	3,07 $\mu$ M	-7,1%	0,113	4,0%
Kontroll 3; 3,03 $\mu$ M	areal	10	2,80 $\mu$ M	2,75 $\mu$ M	2,86 $\mu$ M	-7,7%	0,038	1,4%



Figur 4-13 Plott av amfetamin kontroll 0, 1 og 2, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.

Det er god margin mellom beregnet MKK og RE sin påvisningsgrense, og kontrollene ligger ganske jevnt i Figur 4-13.

Figur 4-14 viser kromatogram av kontroll 0, kontroll 1 og kontroll 2, for å vise forskjellen på topphøydene. En tydelig topp ved 0,10  $\mu\text{M}$  (kontroll 1), som lett kan skilles fra en negativ prøve. Tidligere var påvisningsgrensen 0,30  $\mu\text{M}$ , derfor er kontroll 2 på 0,30  $\mu\text{M}$ , men med påvisningsgrense på 0,20  $\mu\text{M}$  vil det heller ikke bli falske positive.

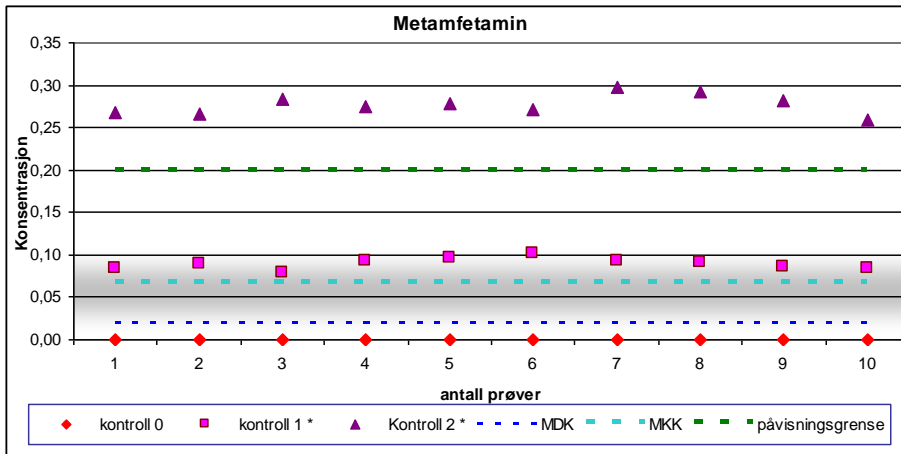


Figur 4-14 Kromatogram av amfetamin, der kontroll 0, 1 og 2 lagt over hverandre for å sammenligne toppene..

Metamfetamin er en komponent som gir bedre respons enn amfetamin i denne metoden, den blir derfor litt mer stabil i det lave området. Tabell 4-8 viser presisjonen og riktigheten, kontroll 1 har lavere standard avvik og RSD enn amfetamin. For metamfetamin er det beregning med høyde, som gir et litt bedre resultat enn areal beregning, men alle resultatene er godt innenfor våre krav til en påvisningsgrense på 0,20  $\mu\text{M}$ .

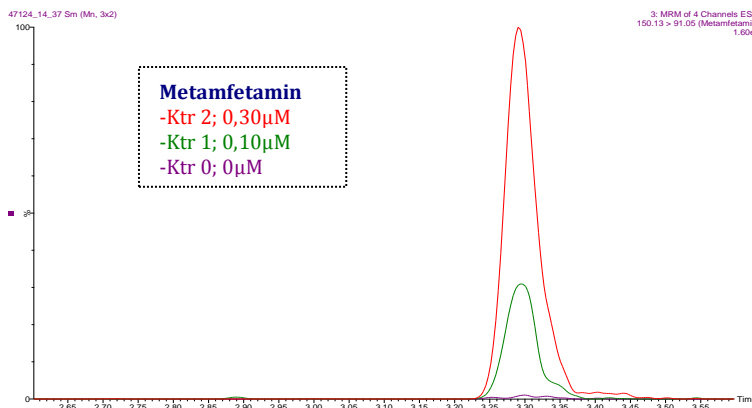
Tabell 4-8 Presisjon og riktighet for metamfetamin

Konsentrasjon	Areal /høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0 $\mu\text{M}$			0 %		
Kontroll 1; 0,10 $\mu\text{M}$	høyde	10	0,10 $\mu\text{M}$	0,08 $\mu\text{M}$	0,11 $\mu\text{M}$	-4,0%	0,008	8,8%
Kontroll 1; 0,10 $\mu\text{M}$	areal	10	0,09 $\mu\text{M}$	0,08 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$	-10,6%	0,007	7,5%
Kontroll 2; 0,30 $\mu\text{M}$	høyde	20	0,30 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$	0,32 $\mu\text{M}$	-0,5%	0,016	5,4%
Kontroll 2; 0,30 $\mu\text{M}$	areal	20	0,28 $\mu\text{M}$	0,24 $\mu\text{M}$	0,32 $\mu\text{M}$	-7,3%	0,019	6,9%
Kontroll 3; 3,03 $\mu\text{M}$	høyde	10	2,88 $\mu\text{M}$	2,73 $\mu\text{M}$	3,04 $\mu\text{M}$	-5,0%	0,093	3,2%
Kontroll 3; 3,03 $\mu\text{M}$	areal	10	2,72 $\mu\text{M}$	2,53 $\mu\text{M}$	2,96 $\mu\text{M}$	-9,3%	0,126	4,6%



Figur 4-15 Plott av metamfetamin kontroll 0, 1 og 2, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.

Figur 4-15 viser hvor god margin vi har mellom påvisningsgrensen til RE, og beregnet MDK og MKK fra standardavviket til kontroll 1, ved bruk av areal beregning. Mens Figur 4-16 viser at det er stor forskjell mellom kontroll på 0,10µM og blindprøve, slik at falske positive prøver skal unngås.

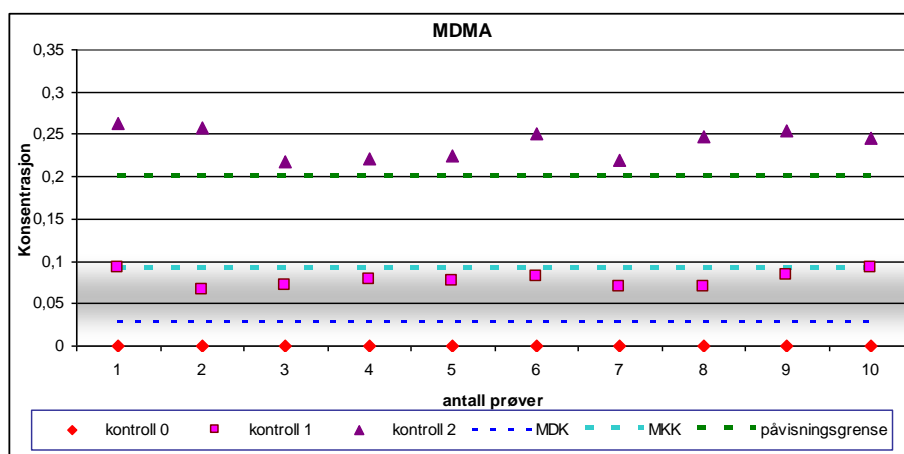


Figur 4-16 Kromatogram av metamfetamin, der kontroll 0, 1 og 2 lagt over hverandre for å sammenligne toppene..

MDMA er en komponent som ligger nær amfetamin i respons, Tabell 4-9 viser at presisjon og riktighet er bra, minimalt bedre ved areal beregning.

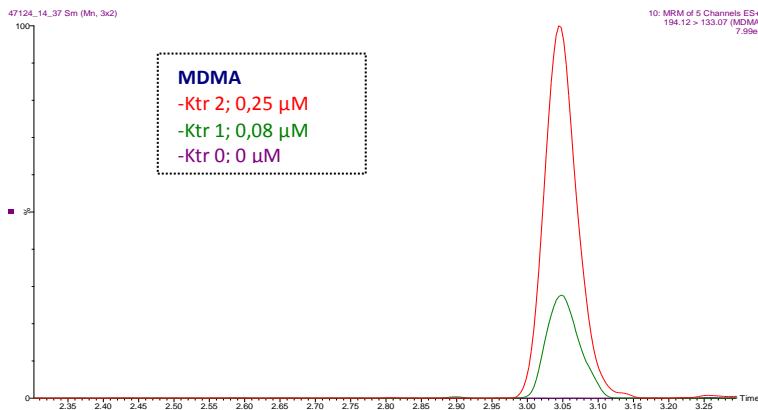
Tabell 4-9 Presisjon og riktighet for MDMA

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0 $\mu$ M			0%		
Kontroll 1; 0,08 $\mu$ M	høyde	10	0,08 $\mu$ M	0,07 $\mu$ M	0,09 $\mu$ M	-5,0%	0,008	11,1%
Kontroll 1; 0,08 $\mu$ M	areal	10	0,08 $\mu$ M	0,07 $\mu$ M	0,09 $\mu$ M	-2,4%	0,009	11,7%
Kontroll 2; 0,25 $\mu$ M	høyde	20	0,24 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,27 $\mu$ M	-6,0%	0,020	8,4%
Kontroll 2; 0,25 $\mu$ M	areal	20	0,25 $\mu$ M	0,22 $\mu$ M	0,28 $\mu$ M	-0,9%	0,019	7,6%
Kontroll 3; 2,50 $\mu$ M	høyde	10	2,43 $\mu$ M	2,23 $\mu$ M	2,57 $\mu$ M	-2,8%	0,110	4,5%
Kontroll 3; 2,50 $\mu$ M	areal	10	2,50 $\mu$ M	2,33 $\mu$ M	2,61 $\mu$ M	0,1%	0,088	3,5%



Figur 4-17 Plott for MDMA kontroll 0, 1 og 2, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDM og MKK fra areal resultater.

Figur 4-17 viser at også MDMA har god margin mellom påvisningsgrensen til RE og beregnet MKK fra standardavviket til kontroll 1 ved areal beregning. En tydelig topp ved konsentrasjon 0,08  $\mu$ M, som er godt under påvisningsgrensen på 0,2  $\mu$ M, se Figur 4-18.



Figur 4-18 Kromatogram av MDMA, der kontroll 0, 1 og 2, lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Resultatet til de resterende komponentene er bak i appendiks 7.4, der resultatene er tilfredsstillende for de fleste komponentene. Det er PMA, mCPP og 2C-B som har en litt høy RSD, kontrollene ved påvisningsgrensen viser at dette området er litt ustabil, men for alle er beregnet MDK og MKK innenfor påvisningsgrensen. Riktigheten til spesielt PMA, PMMA, 2C-B og kation avviker, her er det blitt laget nye standard- og kontroll løsninger som skal testes mer ut.

De fleste komponentene gir best resultater ved bruk av areal i beregningen, det kan derfor se ut som dette vil bli foretrukket fremfor høyde beregning. En fordel med høyde beregning, er at det ofte er mindre manuelle integreringer, fordi start og stopp på integreringen ikke har samme innvirkning på resultatet som ved areal beregning. Spesielt dersom toppene for eksempel får litt tailing (hale) da kan det være vanskelig å integrere riktig og likt.

Presisjon innen serie, som er samme prøve analysert 10 ganger på samme serie, viser hvor mye instrumentet varierer fra prøve til prøve, et mål på instrumentets presisjon, repeterbarhet. Tabell 4-10 viser resultatet for alle komponentene, RSD ligger innenfor 10% for de fleste, og under 5% for mange. De som ligger over 10% er MDA 0,20 µM, PMA 0,05 µM, mCPP 0,05 µM og 2C-B 0,05 µM, disse komponentene er litt ustabile i disse områdene, som er påvisningsgrensene deres. Den komponenten som ligger over 5% bortsett fra de over 10%, er amfetamin 0,20 µM, RSD 7,3%. Denne vurderes som OK, og alle andre under 5% på RSD vurderes som bra. Tabell 4-10 Presisjon innen serie, der samme prøve er analysert 10 ganger.

Tabell 4-10 Presisjon innen serie, der samme prøve er analysert 10 ganger.

Analytt	Antall	Konsentrasjon gjennomsnitt	Minst - maks	SD	RSD
Amfetamin	10	0,19 µM	0,16 – 0,21 µM	0,014	7,3%
	10	4,85 µM	4,64 – 5,03 µM	0,102	2,1%
Metamfetmin	10	0,19 µM	0,18 – 0,20 µM	0,008	4,4%
	10	4,53 µM	4,34 – 4,65 µM	0,109	2,4%
MDMA	10	0,19 µM	0,17 – 0,20 µM	0,008	4,5%
	10	4,04 µM	3,88 – 4,17 µM	0,080	2,0%
MDA	10	0,18 µM	0,14 – 0,22 µM	0,023	12,3%
	10	4,23 µM	4,12 – 4,38 µM	0,075	1,8%
MDEA	10	0,19 µM	0,18 – 0,20 µM	0,007	3,7%
	10	4,05 µM	3,92 – 4,12 µM	0,062	1,5%
PMA	10	0,044 µM	0,032 – 0,054 µM	0,0058	13,3%
	10	1,130 µM	1,066 – 1,186 µM	0,0345	3,1%
PMMA	10	0,045 µM	0,043 – 0,048 µM	0,0015	3,6%
	10	1,030 µM	0,999 – 1,059 µM	0,0215	2,1%
mCPP	10	0,045 µM	0,036 – 0,054 µM	0,0069	15,4%
	10	0,806 µM	0,742 – 0,871 µM	0,0259	4,5%
2C-B	10	0,039 µM	0,020 – 0,053 µM	0,0104	27,2%
	10	1,052 µM	0,973 – 1,160 µM	0,0520	4,9%
MDPV	10	0,049 µM	0,046 – 0,051 µM	0,0020	4,1%
	10	0,779 µM	0,756 – 0,794 µM	0,0132	1,7%
Katinon	10	6,94 µM	6,72 – 7,26 µM	0,166	2,4%
Metkatinon	10	4,50 µM	4,39 – 4,61 µM	0,076	1,7%
Efedrin	10	4,95 µM	4,81 – 5,14 µM	0,112	2,3%
Pseudoefedrin	10	5,24 µM	4,97 -5,62 µM	0,179	3,4%
Norefedrin	10	5,14 µM	4,99 – 5,32 µM	0,113	2,2%
Norpseudoefedrin	10	5,23 µM	4,99 – 5,38 µM	0,111	2,1%

Når 10 paralleller av samme prøve blir ekstrahert og analysert på samme serie, blir det et mål på metodens presisjon innen samme serie. Det er forventet at variasjonen vil bli litt større enn i Tabell 4-10 fordi variasjonen i ut pipettering av prøve og prøveopparbeidelse er med i tillegg til variasjon i instrumentet, se Tabell 4-11. Det er en minimal økning på ~1%, stort sett er resultatene lik resultatene i Tabell 4-10. Det er en god presisjon på metoden innen serie, det kan se ut som prøveopparbeidelsen innen serie, gir mindre variasjon enn instrumentvariasjonen innen serie.

Tabell 4-11 Presisjon innen serie, 10 paralleller av samme prøve analysert i samme serie.

Analytt	Antall	Konsentrasjon gjennomsnitt	Minst - maks	SD	RSD
Amfetamin	10	0,20 µM	0,18 – 0,23 µM	0,016	8,1%
	10	4,88 µM	4,72 – 5,34 µM	0,177	3,6%
Metamfetmin	10	0,19 µM	0,17 – 0,24 µM	0,021	10,9%
	10	4,37 µM	4,26 – 4,75 µM	0,142	3,3%
MDMA	10	0,21 µM	0,18 – 0,24 µM	0,017	8,0%
	10	4,29 µM	4,14 – 4,64 µM	0,137	3,2%
MDA	10	0,22 µM	0,19 – 0,26 µM	0,019	8,7%
	10	4,39 µM	4,17 – 4,84 µM	0,192	4,4%
MDEA	10	0,21 µM	0,18 – 0,25 µM	0,019	9,4%
	10	4,20 µM	4,08 – 4,52 µM	0,123	2,9%
PMA	10	0,047 µM	0,037 – 0,059 µM	0,0071	15,0%
	10	1,200 µM	1,113 – 1,341 µM	0,0639	5,3%
PMMA	10	0,053 µM	0,047 – 0,062 µM	0,0045	8,4%
	10	1,125 µM	1,074 – 1,208 µM	0,0424	3,8%
mCPP	10	0,047 µM	0,040 – 0,061 µM	0,0065	13,9%
	10	0,859 µM	0,815 – 0,930 µM	0,0343	4,0%
2C-B	10	0,045 µM	0,032 – 0,055 µM	0,0076	17,0%
	10	1,093 µM	1,036 – 1,181 µM	0,0417	3,8%
MDPV	10	0,051 µM	0,046 – 0,061 µM	0,0040	7,9%
	10	0,791 µM	0,756 – 0,863 µM	0,0278	3,5%
Katinon	10	7,04 µM	6,72 – 7,62 µM	0,260	3,7%
Metkatinon	10	4,50 µM	4,28 – 4,77 µM	0,167	3,7%
Efedrin	10	5,02 µM	4,81 – 5,31 µM	0,158	3,2%
Pseudoefedrin	10	5,16 µM	4,93 – 5,54 µM	0,199	3,9%
Norefedrin	10	5,16 µM	4,95 – 5,48 µM	0,189	3,7%
Norpseudoefedrin	10	5,20 µM	5,01 – 5,56 µM	0,168	3,2%

#### 4.4.4 Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) og minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

Beregning av MDK og MKK er et mål på hvilke konsentrasjoner de ulike komponenter i metoden kan klare. På RE er det fastsatt påvisningsgrenser for hver komponent, så målet er at MKK ikke skal ligge over denne, men helst godt under, for sikkerhets margin..

I Tabell 4-12 har alle komponentene påvisningsgrense på 0,20 µM, bruk av areal ved beregning gir en bedre MDK og MKK. Dette er spesielt viktig for MDA, som ved høyde får en høyere MKK enn påvisningsgrensen.

Tabell 4-12 MDK og MKK for amfetamin, metamfetamin, MDMA og MDA.

	Amfetamin		Metamfetamin		MDMA		MDA	
	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal
0-prøve	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
Standardavvik (laveste kontroll)	0,015 (0,10 µM)	0,010 (0,10 µM)	0,008 (0,10 µM)	0,007 (0,10 µM)	0,008 (0,10 µM)	0,007 (0,10 µM)	0,024 (0,10 µM)	0,015 (0,10 µM)
Gjennomsnitt	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
N	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>MDK</b>	<b>0,045µM</b>	<b>0,030µM</b>	<b>0,024µM</b>	<b>0,021µM</b>	<b>0,024µM</b>	<b>0,027µM</b>	<b>0,072µM</b>	<b>0,045µM</b>
6*std.avvik	0,090µM	0,060µM	0,048µM	0,040µM	0,048µM	0,054µM	0,144µM	0,090µM
<b>MKK</b>	<b>0,150µM</b>	<b>0,100µM</b>	<b>0,080µM</b>	<b>0,070µM</b>	<b>0,080µM</b>	<b>0,090µM</b>	<b>0,240µM</b>	<b>0,150µM</b>

For komponentene i Tabell 4-13 er påvisningsgrensen for MDEA på 0,20 µM og 0,05 µM for de tre andre. Her er det kun for mCPP at MKK ligger over påvisningsgrensen ved bruk av høyde beregning av respons, mens bruk av areal ligger godt under.

Tabell 4-13 MDK og MKK for MDEA, PMA, PMMA og mCPP.

	MDEA		PMA		PMMA		mCPP	
	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal
0-prøve	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
Standardavvik (laveste kontroll)	0,010 (0,10 µM)	0,005 (0,10 µM)	0,003 (0,015µM)	0,002 (0,015µM)	0,002 (0,015µM)	0,001 (0,015µM)	0,005 (0,015µM)	0,002 (0,015µM)
Gjennomsnitt	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
N	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>MDK</b>	<b>0,030µM</b>	<b>0,016µM</b>	<b>0,008µM</b>	<b>0,005µM</b>	<b>0,006µM</b>	<b>0,003µM</b>	<b>0,016µM</b>	<b>0,007µM</b>
6*std.avvik	0,060µM	0,032µM	0,016µM	0,010µM	0,012µM	0,007µM	0,032µM	0,013µM
<b>MKK</b>	<b>0,100µM</b>	<b>0,054µM</b>	<b>0,026µM</b>	<b>0,016µM</b>	<b>0,020µM</b>	<b>0,011µM</b>	<b>0,053µM</b>	<b>0,022µM</b>

For 2C-B og MDPV er påvisningsgrensen på 0,05 µM, Tabell 4-14 viser at 2C-B ligger over denne grensen for MKK beregnet fra standardavviket etter areal beregning. Når det gjelder katinon og metkatinon som har fått en \* ved standardavviket. På grunn av en litt høy laveste standard, blir standardavvik høyt, siden standardavviket er konsentrasjons avhengig. Det er utført en tilbake beregning av standardavvik til 0,1 µM ved å benytte RSD verdien til konsentrasjon på 0,3 µM. Katinon og metkatinon har begge en påvisningsgrense på 0,3 µM, godt over beregnet MKK verdi.



Tabell 4-14 MDK og MKK for 2C-B, MDPV, katinon og metkatinon.

	2C-B		MDPV		Katinon		Metkatinon	
	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal
0-prøve	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
Standardavvik (laveste kontroll)	0,003 (0,05µM)	0,005 (0,05µM)	0,002 (0,05µM)	0,001 (0,05µM)	0,009 * (0,30µM)	0,011 * (0,3µM)	0,005 * (0,3µM)	0,005 * (0,3µM)
Gjennomsnitt	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
N	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>MDK</b>	<b>0,009µM</b>	<b>0,016µM</b>	<b>0,006µM</b>	<b>0,003µM</b>	<b>0,026µM</b>	<b>0,034µM</b>	<b>0,015µM</b>	<b>0,015µM</b>
6*std.avvik	0,018µM	0,032µM	0,011µM	0,007µM	0,052µM	0,068µM	0,030µM	0,030µM
<b>MKK</b>	<b>0,030µM</b>	<b>0,054µM</b>	<b>0,019µM</b>	<b>0,011µM</b>	<b>0,087µM</b>	<b>0,113µM</b>	<b>0,051µM</b>	<b>0,051µM</b>

For alle komponentene i Tabell 4-15 er det samme problem som for katinon og metkatinon, en høy laveste kontroll, derfor er det også her gjort en tilbake beregning av standardavviket. Alle komponentene har en beregnet MKK som ligger godt under påvisningsgrensene på 0,5 µM.

Tabell 4-15 MDK og MKK for efedrin, pseudoefedrin, norefedrin og norpseudoefedrin.

	Efedrin		Pseudoefedrin		Norefedrin		Norpseudoefedrin	
	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal	høyde	areal
0-prøve	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
Standardavvik (laveste kontroll)	0,016 * (0,5µM)	0,008 * (0,5µM)	0,016 * (0,5µM)	0,015 * (0,5µM)	0,012 * (0,5µM)	0,011 * (0,5µM)	0,012 * (0,5µM)	0,017 * (0,5µM)
Gjennomsnitt	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
N	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>MDK</b>	<b>0,049µM</b>	<b>0,023µM</b>	<b>0,046µM</b>	<b>0,045µM</b>	<b>0,036µM</b>	<b>0,034µM</b>	<b>0,035µM</b>	<b>0,051µM</b>
6*std.avvik	0,098µM	0,047µM	0,093µM	0,089µM	0,073µM	0,067µM	0,070µM	0,101µM
<b>MKK</b>	<b>0,163µM</b>	<b>0,078µM</b>	<b>0,155µM</b>	<b>0,149µM</b>	<b>0,121µM</b>	<b>0,112µM</b>	<b>0,116µM</b>	<b>0,169µM</b>

#### 4.4.5 Overdrag

Overdrag må man være oppmerksom på, det viser Tabell 4-16. Det er sjelden konsentrasjonen på prøver er over høyeste standard, i testen her er konsentrasjonene dobbelt så høye som høyeste standard. Det er særlig viktig å være oppmerksomme på MDPV, som gir overdrag i 2 prøver bak, men også høye konsentrasjoner av MDEA, PMA, PMMA, mCPP og 2C-B som kan gi overdrag over påvisningsgrensen bak. Alle disse komponentene er sjeldne, og veldig sjeldne med høye konsentrasjoner. Paralleller som analyseres med ulik rekkefølge vil kunne oppdage overdrag, men det er viktig å følge godt med på prøver med høye konsentrasjoner Det er behov for å jobbe videre med problemet.

Tabell 4-16 Resultat av overdrags test.

Analytt	Antall	Kons.	Overdrag 1 (Minst - maks)	Overdrag 2 (Minst - maks)	Maks overdrag utgjør % av påvisningsgrensen.
Amfetamin	4	40 µM	0,03% - 0,10%	0	18% av 0,20 µM
Metamfetamin	4	40 µM	0,08% - 0,17%	0	29% av 0,20 µM
MDMA	4	40 µM	0 - 0,26%	0	46% av 0,20 µM
MDA	4	40 µM	0 - 0,11%	0	22% av 0,20 µM
MDEA	4	40 µM	0,20% - 0,41%	0	74% av 0,20 µM
PMA	4	10 µM	0 - 0,17%	0	86% av 0,05 µM
PMMA	4	10 µM	0,22% - 1,27%	0	260% av 0,05 µM
mCPP	4	10 µM	0 - 0,20%	0	94% av 0,05 µM
2C-B	4	10 µM	0,39% - 1,05%	0	146% av 0,05 µM
MDPV	4	10 µM	1,12% - 2,34%	0,06% - 0,14%	374% av 0,05 µM
Katinon	4	10 µM	0	0	0% av 0,30 µM
Metkatinon	4	10 µM	0	0	0% av 0,30 µM
Efedrin	4	10 µM	0	0	0% av 0,50 µM
Pseudoefedrin	4	10 µM	0	0	0% av 0,50 µM
Norefedrin	4	10 µM	0	0	0% av 0,50 µM
Norpseudoefedrin	4	10 µM	0	0	0% av 0,50 µM

#### 4.4.6 Ekstraksjonsutbytte

I Tabell 4-17 er resultat av utbytte test 1, der korrigert utbytte er vurdert etter øyemål på tap av ekstrakt ved bruk av flere kanals pipette. Test 2 viser korrigert utbytte målt nøyaktig. Utbytte i test 1 er på mellom 60% – 67%, mens i test 2 blir utbytte lavere på grunn av tap av ekstrakter ved måling av volum. Det blir derfor test 1 som gir riktig utbytte, når det ikke tas hensyn til tapet på grunn av bruk av flere kanals pipette. Hvis det tas hensyn til dette, blir det korrigert utbytte i test 2 som blir mest nøyaktig, her er utbyttet på mellom 80% - 85%. Det blir et tap på ca 20% av utbyttet på grunn av felling av blodprøvene og filtrering, og et volumtap som utgjør ca 20% på grunn av bruk av 96-kanals pipette..

Ved prøveopparbeidelse har ikke tapet av volum betydning for resultatet, siden ekstraktene settes rett på instrument uten inndamping og re løsing. Det blir kun tapet på 20% under felling og filtrering som får betydning, det blir en svakere konsentrasjon på ekstraktene. Et ekstraksjonsutbytte på 80% i konsentrasjon gir et helt akseptabelt utbytte.

Tabell 4-17 Resultat på utbytte tester.

Analytt	Test 1			Test 2		
	Antall prøver	Utbytte (minst – maks)	Korrigert utbytte (minst – maks)	Antall prøver	Utbytte (minst – maks)	Korrigert utbytte (minst – maks)
Amfetamin	5	61% (51% - 72%)	78% (64% - 92%)	3	52% (48% - 57%)	83% (81% - 84%)
Metamfetamin	5	62% (54% - 67%)	79% (67% - 87%)	3	52% (48% - 56%)	83% (81% - 85%)
MDMA	5	62% (50% - 67%)	79% (63% - 87%)	3	53% (51% - 58%)	84% (84% - 85%)
MDA	5	63% (49% - 72%)	80% (62% - 92%)	3	51% (48% - 55%)	82% (81% - 83%)
MDEA	5	62% (51% - 68%)	79% (64% - 88%)	3	51% (47% - 56%)	84% (80% - 83%)
PMA	5	64% (52% - 74%)	81% (65% - 94%)	3	53% (48% - 61%)	84% (81% - 88%)
PMMA	5	60% (49% - 71%)	77% (62% - 91%)	3	54% (50% - 60%)	85% (83% - 87%)
mCPP	5	60% (47% - 73%)	77% (60% - 93%)	3	52% (49% - 56%)	83% (82% - 85%)
2C-B	5	61% (50% - 70%)	78% (63% - 90%)	3	53% (49% - 57%)	84% (82% - 86%)
MDPV	5	62% (50% - 69%)	79% (63% - 89%)	3	52% (47% - 58%)	83% (80% - 85%)
Katinon	2	66% (64% - 68%)	82% (77% - 88%)	1	48%	81%
Metkatinon	2	66% (65% - 66%)	82% (78% - 86%)	1	47%	80%
Efedrin	2	66% (65% - 66%)	82% (78% - 86%)	1	49%	82%
Pseudoefedrin	2	65% (60% - 69%)	81% (73% - 89%)	1	48%	81%
Norefedrin	2	67% (60% - 69%)	83% (79% - 87%)	1	50%	83%
Norpseudoefedrin	2	66% (60% - 69%)	83% (79% - 87%)	1	50%	83%

#### 4.4.7 Matrikseffekter

I Tabell 4-18 er det et par tilfeller av ione forsterkelse, amfetamin 0,50  $\mu\text{M}$  i blod har i den ene parallellen en respons som er 184% høyere enn amfetamin 0,50  $\mu\text{M}$  i milli-Q-vann. MDA 10 $\mu\text{M}$  i blod har en respons på 234% høyere enn samme prøve i milli-Q-vann, også her gjelder det kun den ene parallellen. Hvorfor dette skjer, og hvorfor kun med en parallell er vanskelig å vurdere, det er tydelig at noe skjer med disse prøvene. For amfetamin som har egen intern standard med samme retensjonstid, antas det at samme respons økning skjer i intern standarden, men for MDA som benytter MDMA-d5 som intern standard, vil antageligvis denne respons økningen få betydning for resultatet.

Utenom disse to utslagene, er det jevne responser uansett blod, og RSD verdiene er lave, en økning på de to nevnte prøvene. Det er ingen tydelige eller gjentakende matrikseffekter.

Tabell 4-18 Resultat av matrikseffekt test.

Analytt	Konsentrasjon	Antall	Matrikseffekt Gjennomsnitt	Matrikseffekt Lav - høy	RSD (%)
Amfetamin	0,50 µM	12	111%	99% - 184%	0,21%
	10 µM	12	104%	99% - 109%	0,03%
Metamfetamin	0,50 µM	12	103%	96% - 110%	0,05%
	10 µM	12	101%	91% - 110%	0,05%
MDMA	0,50 µM	12	105%	97% - 113%	0,04%
	10 µM	12	106%	95% - 112%	0,05%
MDA	0,50 µM	12	105%	85% - 125%	0,10%
	10 µM	12	115%	98% - 234%	0,33%
MDEA	0,50 µM	12	105%	94% - 115%	0,06%
	10 µM	12	106%	94% - 115%	0,06%
PMA	0,10 µM	12	94%	83% - 119%	0,11%
	2,5 µM	12	98%	91% - 106%	0,06%
PMMA	0,10 µM	12	113%	94% - 132%	0,10%
	2,5 µM	12	104%	91% - 111%	0,05%
mCPP	0,10 µM	12	103%	81% - 115%	0,10%
	2,5 µM	12	102%	92% - 111%	0,06%
2C-B	0,10 µM	12	113%	79% - 142%	0,19%
	2,5 µM	12	115%	95% - 142%	0,12%
MDPV	0,10 µM	12	105%	99% - 118%	0,05%
	2,5 µM	12	104%	96% - 110%	0,04%
Katinon	0,30 µM	12	97%	86% - 115%	0,10%
	5,0 µM	12	101%	92% - 109%	0,05%
Metkatinon	0,30 µM	12	110%	98% - 135%	0,10%
	5,0 µM	12	100%	91% - 109%	0,05%
Efedrin	0,50 µM	12	97%	84% - 110%	0,07%
	5,0 µM	12	102%	94% - 109%	0,04%
Norefedrin	0,50 µM	12	102%	86% - 114%	0,08%
	5,0 µM	12	102%	93% - 108%	0,04%

Ved vurdering av stabilitet på intern standard med tanke på matrikseffekter, blir det variasjon innen serie som er av betydning. Ved å beregne gjennomsnitt respons over 10 serier, blir det også med en serie til serie variasjon, det blir vanskelig å si om variasjonen skyldes matrikseffekter eller variasjon på grunn av instrument som taper eller vinner respons på grunn av bruk og vedlikehold. Tabell 4-19 viser at responsen beregnet som gjennomsnitt av 10 serier har en RSD verdi på 15 – 18% for de tre intern standardene, som tyder på en variasjon som skyldes enten matrikseffekter eller variasjon mellom serier.

Når variasjonen blir beregnet for hver serie, blir gjennomsnittet for disse 10 seriene vurdert, responsen er jevnere, RSD gjennomsnitt på 5% for alle tre intern standardene, se Tabell 4-19. Maks RSD er 7 – 8% for alle tre intern standarder, som gjelder samme serie. I denne serien startet responsen relativt lavt, og økte gjennom de første 15 prøvene i serien, en kjent effekt ved analyse etter spytt metode som benytter samme instrument.

Stabiliteten på intern standard tyder på lite problemer på matrikseffekter, det er større variasjon mellom seriene enn innen seriene.

Tabell 4-19 Stabilitet til respons på intern standard vurdert på 10 serier.

Komponent	Gjennomsnitt etter beregning av 10 serier			Alle prøvene i de 10 seriene beregnet sammen.		
	Snitt antall prøver (minst – maks)	Snitt respons høyde (minst – maks snitt)	Snitt RSD (minst – maks)	Antall prøver	Snitt respons høyde	RSD
<b>13C6amfetamin</b>	46 (40 – 48)	1562736 (1130246-1890413)	5% (4% - 8%)	455	1558385	15%
<b>13C6metamfetamin</b>	46 (40 - 48)	2858230 (2081482- 3831664)	5% (4% - 8%)	455	2853124	17%
<b>MDMA-d5</b>	46 (40 – 48)	1397374 (1010517- 1911973)	5% (3% - 7%)	455	1394225	18%

#### 4.4.8 Stabilitet og robusthet

##### 4.4.8.1 Holdbarhet på ekstraktene.

Testen på holdbarheten, der de samme ekstraktene blir analysert 10 ganger over en periode på 14 dager, er god, se Tabell 4-20. Resultatene i denne testen er like resultatene i presisjon innen serie, Tabell 4-10, der samme prøve ble analysert 10 ganger samme dag, som viser at holdbarheten på ekstraktene er god.

I tabellen er det PMA, mCPP og 2C-B, som har stygge RSD verdier på 0,015  $\mu\text{M}$ , som tidligere resultater er disse komponentene ustabile ved påvisningsgrensen på 0,05  $\mu\text{M}$  i kapittel 4.4.3, derfor vektlegges ikke disse resultatene i vurdering av holdbarhet på ekstraktene.

Tabell 4-20 Resultat på holdbarhet til kontroller, der ekstraktene ble analysert 10 ganger over 14 dager.

Analytt	Antall	Konsentrasjon gjennomsnitt	Minst - maks	SD	RSD
Amfetamin	10	0,09 µM	0,09 – 0,11 µM	0,007	7,9%
	10	0,29 µM	0,24 – 0,29 µM	0,013	4,8%
	10	2,75 µM	2,70 – 2,83 µM	0,052	1,9%
Metamfetmin	10	0,09 µM	0,08 – 0,11 µM	0,008	9,0%
	10	0,26 µM	0,25 – 0,27 µM	0,007	2,6%
	10	2,61 µM	2,54 – 2,69 µM	0,046	1,8%
MDMA	10	0,08 µM	0,07 – 0,10 µM	0,008	9,0%
	10	0,24 µM	0,22 – 0,27 µM	0,012	5,3%
	10	2,49 µM	2,39 – 2,56 µM	0,056	2,3%
MDA	10	0,08 µM	0,06 – 0,09 µM	0,012	16,0%
	10	0,25 µM	0,21 – 0,28 µM	0,021	8,3%
	10	2,61 µM	2,42 – 2,73 µM	0,095	3,6%
MDEA	10	0,08 µM	0,07 – 0,09 µM	0,004	5,4%
	10	0,23 µM	0,22 – 0,25 µM	0,007	3,0%
	10	2,46 µM	2,38 – 2,52 µM	0,044	1,8%
PMA	10	0,018 µM	0,012 – 0,025 µM	0,0042	23,1%
	10	0,056 µM	0,040 – 0,065 µM	0,0071	12,8%
	10	1,150 µM	1,096 – 1,201 µM	0,0375	3,3%
PMMA	10	0,018 µM	0,015 – 0,021 µM	0,0020	11,2%
	10	0,057 µM	0,049 – 0,066 µM	0,0047	8,3%
	10	1,078 µM	0,994 – 1,100 µM	0,0315	2,9%
mCPP	10	0,012 µM	0,007 – 0,018 µM	0,0031	26,4%
	10	0,039 µM	0,030 – 0,045 µM	0,0445	11,5%
	10	0,962 µM	0,898 – 1,030 µM	0,0430	4,5%
2C-B	10	0,015 µM	0,007 – 0,023 µM	0,0050	34,0%
	10	0,054 µM	0,034 – 0,071 µM	0,0121	22,6%
	10	1,020 µM	0,953 – 1,068 µM	0,0416	4,1%
MDPV	10	0,018 µM	0,017 – 0,020 µM	0,0012	6,4%
	10	0,059 µM	0,049 – 0,074 µM	0,0098	16,7%
	10	1,023 µM	0,983 – 1,072 µM	0,0271	2,7%
Katinon	10	0,41 µM	0,38 – 0,41 µM	0,020	4,8%
	10	4,87 µM	4,73 – 5,25 µM	0,158	3,2%
Metkatinon	10	0,48 µM	0,43 – 0,57 µM	0,037	7,8%
	10	4,82 µM	4,43 – 5,42 µM	0,264	5,5%
Efedrin	10	0,47 µM	0,44 – 0,49 µM	0,014	2,9%
	10	4,34 µM	4,21 – 4,82 µM	0,181	4,2%
Pseudoefedrin	10	0,57 µM	0,55 – 0,63 µM	0,024	4,2%
	10	5,38 µM	5,04 – 5,80 µM	0,203	3,8%
Norefedrin	10	0,51 µM	0,49 – 0,55 µM	0,020	3,9%
	10	4,67 µM	4,53 – 4,78 µM	0,091	1,9%
Norpseudoefedrin	10	0,54 µM	0,51 – 0,58 µM	0,020	3,8%
	10	5,35 µM	5,21 – 5,49 µM	0,086	1,6%

Tabell 4-21 viser samme resultater, som Tabell 4-20, ukjente prøver tåler å stå i prøvetårnet til UPLC-MS/MS en å vente på analyse. For amfetamin er det en høy RSD på 10,3%, det gjelder for prøve med lav konsentrasjon på 0,09 µM, et litt ustabil område for amfetamin. Det samme gjelder PMMA som har en høy RSD for en prøve med konsentrasjon på 0,03 µM. I et ustabil område for analytten, vil variasjonen like gjerne være like stor om den ble analysert samme dag, eller om den blir analysert over 14 dager. Disse resultatene er vanskelige å vurdere i forhold til holdbarhet.

Tabell 4-21 Resultat på holdbarhet til ukjente prøver, der ekstraktene er analysert 10 ganger over 14 dager.

Analytt	Antall saker	Konsentrasjons område	RSD gjennomsnitt	Lavest – høyest RSD
Amfetamin	9	0,09 – 2,05 µM	3,8%	1,9 – 10,3%
Metamfetamin	9	0,60 – 13,34 µM	2,2%	1,4 – 4,7%
MDMA	5	0,76 – 3,75 µM	4,0%	2,6 – 5,3%
PMA	1	0,04 µM	17,4%	
PMMA	5	0,03 – 0,30 µM	7,2%	3,7 – 9,9%

#### 4.4.8.2 Signal og støy forhold

Ved vurdering av signal/ støy forhold (S/N) er det benyttet kontroll ved påvisningsgrensen for alle komponentene, og en kontroll som ligger på ½ eller 1/3 av påvisningsgrensen for flere av komponentene. S/N varierer veldig mye fra prøve til prøve, derfor er det de lave S/N og antall lave S/N som er mest interessante. På RE er det et krav om at  $S/N > 10$ , derfor er  $S/N < 10$  markert ut i rødt og antall saker med  $S/N < 20$  skrevet inn i parentes i Tabell 4-22.

Det er i hovedsak PMA, mCPP og 2C-B, som har flere verdier med  $S/N < 20$ , disse 3 har også verdier under 20 ved påvisningsgrensen. De andre komponentene har ikke problemer med å ligge høyere enn kravet på  $S/N > 10$ , men Tabell 4-22 viser at mange av komponentene har verdier ned mot 20-30 i S/N. Disse komponentene har en S/N gjennomsnittsverdi over 100, men variasjonen er stor, med en RSD verdi på over 100 % for flere av komponentene.

Tabell 4-22 Signal/støy forhold for de laveste konsentrasjoner til komponentene.

Analytt	Konsentrasjon	Antall prøver	S/N gjennomsnitt	Minst – maks S/N (antall saker <20)	RSD
Amfetamin	0,10 µM	21	317	22 – 2268	198%
	0,20 µM	21	415	35 – 2625	158%
Metamfetamin	0,10 µM	21	348	37 – 986	92%
	0,20 µM	21	570	55 – 2000	85%
MDMA	0,10 µM	21	579	42 – 3731	170%
	0,20 µM	21	1316	54 – 11202	197%
MDA	0,10 µM	21	397	34 – 2733	159%
	0,20 µM	21	298	45 – 966	78%
MDEA	0,10 µM	21	180	17 – 579 (1)	99%
	0,20 µM	21	324	38 – 785	71%
PMA	0,015 µM	21	80	5 – 304 (3)	100%
	0,050 µM	21	114	15 – 688 (1)	148%
PMMA	0,015 µM	21	143	14 – 841 (1)	161%
	0,050 µM	21	393	31 – 2196	119%
mCPP	0,015 µM	21	88	11 – 324 (6)	109%
	0,050 µM	21	95	15 – 295 (1)	79%
2C-B	0,015 µM	21	50	4 – 260 (10)	139%
	0,050 µM	21	122	7 – 672 (5)	129%
MDPV	0,015 µM	21	1224	403 – 3249	64%
	0,050 µM	21	2879	114 – 9033	71%
Katinon	0,30 µM	21	84	20 – 176	55%
Metkatinon	0,30 µM	21	846	45 – 7776	202%
Efedrin	0,50 µM	21	231	27 – 578	64%
Pseudoefedrin	0,50 µM	21	124	15 – 281 (1)	58%
Norefedrin	0,50 µM	21	519	164 – 957	39%
Norpseudoefedrin	0,50 µM	21	300	92 – 509	41%

#### 4.4.8.3 Resultat av inndamping forsøk.

Dersom ekstraktene dampes inn fra ca 600-650 µL til ca 150-200 µL, er forventet økning i høyde respons og S/N på 300-350%. Volumet er vurdert med øyemål, derfor blir det her bare ca mål. Tabell 4-23 viser at responsen øker som forventet, når det gjelder S/N, blir det en økning for de fleste komponenter. Men noen komponenter har minimal økning i dette forsøket, verst er dette for PMA, mCPP og 2C-B, disse ligger fremdeles i grenseområdet til kravet på S/N > 10. Verdier under 20 i S/N er merket rødt og antall saker er satt i parentes.



Tabell 4-23 Respons og signal/støy forhold ved inndamping av ekstrakter til 200µL.

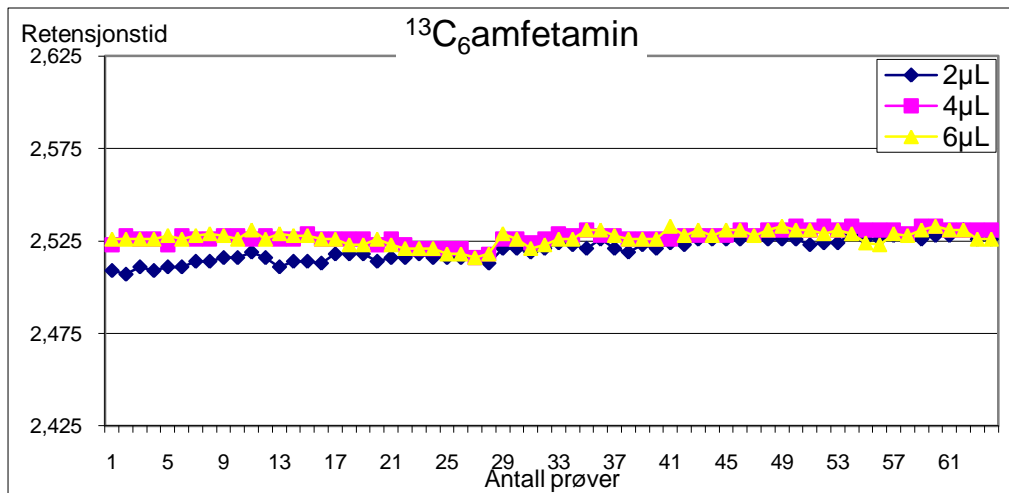
analytt	N	Uten inndamping		Med inndamping		Endring respons ved inndamp	Uten inndamping			Med inndamping			Endring snitt S/N ved inndamp
		Snitt respons	RSD	Snitt respons	RSD		Snitt S/N	Minst S/N	RSD	Snitt S/N	Minst S/N	RSD	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> amfetamin	36	1937896	3,7%	6378232	5,5%	329%	3106	433	74%	8634	1055	200%	278%
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> metamfetamin	36	3259060	3,7%	11708546	6,5%	359%	107984	502	79%	119937	15400	121%	111%
MDMA-d5	36	1630388	4,3%	5434812	8,1%	333%	2470	369	102%	6147	1106	65%	249%
amfetamin	18	122940	6,8%	407981	6,5%	332%	960	27	108%	946	191	64%	99%
metamfetamin	18	288082	6,5%	1044540	4,4%	363%	6576	71	164%	41478	137	68%	631%
MDMA	18	199830	7,9%	675521	7,9%	338%	2831	153	189%	2223	155	102%	79%
MDA	18	111518	7,9%	393153	8,0%	353%	101	22	58%	309	55	59%	306%
MDEA	18	295314	6,7%	1084226	5,9%	367%	312	78	80%	528	85	52%	169%
PMA	18	19622	11%	70577	7,0%	360%	444	12 (2)	141%	728	14 (1)	142%	164%
PMMA	18	89165	4,6%	324383	6,3%	364%	151	39	65%	220	123	33%	146%
mCPP	18	21159	6,2%	66937	5,2%	316%	138	8 (1)	110%	151	17 (2)	111%	109%
2C-B	18	9476	17%	28915	12%	305%	166	16 (3)	116%	107	7 (4)	111%	64%
MDPV	18	85439	7,2%	281782	8,3%	330%	1684	397	68%	3450	1088	39%	205%
Kartinon	18	189038	6,9%	650966	4,2%	344%	109	45	30%	340	232	23%	312%
Metkatinon	18	253678	6,8%	762129	7,9%	300%	1917	97	153%	2167	399	108%	113%
Efedrin	18	229150	4,1%	785969	6,2%	343%	192	53	50%	567	261	31%	295%
Pseudoefedrin	18	151206	6,9%	482203	11%	319%	126	33	48%	354	176	37%	281%
Norefedrin	18	275771	3,1%	1004967	6,7%	364%	380	168	35%	1155	276	39%	304%
Norpseudoefedrin	18	184180	5,0%	627871	8,4%	341%	254	116	35%	714	180	40%	281%

#### 4.4.8.4 Injeksjonsvolum på 2µL, 4µL Og 6µL.

Injeksjon på 2 µL, 4 µL og 6 µL ga ingen signifikant forskjell på retensjonstid selv om ekstraktet som injiseres er nærmest 100% organisk, se Tabell 4-24. Retensjonstiden er litt lavere ved 2µL enn de to andre, dette er litt tilfeldig, fordi dette volumet ble analysert først. Av og til øker retensjonstiden litt over de første prøvene, før den stabiliserer seg, denne økningen gir ingen problemer under beregningen av serien, se Figur 4-19, som viser retensjonstiden til <sup>13</sup>C<sub>6</sub>amfetamin ved ulike injeksjonsvolum.

Tabell 4-24 Stabilitet på retensjonstid ved injeksjonsvolum på 2µL, 4µL og 6µL.

Analytt	N	2µL		4µL		6µL	
		retensjonstid	RSD	retensjonstid	RSD	retensjonstid	RSD
13C <sub>6</sub> amfetamin	64	2,520	0,24%	2,527	0,14%	2,527	0,15%
13C <sub>6</sub> metamfetamin	64	3,174	0,26%	3,184	0,25%	3,186	0,32%
MDMA-d6	64	3,178	0,24%	3,185	0,30%	3,186	0,38%



Figur 4-19 Plott av retensjonstid ved injeksjon av 2µL, 4µL og 6µL.

Hvordan høyde respons og S/N varierer ved ulike injeksjonsvolum, se Tabell 4-25. Her er det tatt med et gjennomsnitt av respons, gjennomsnitt av S/N og laveste S/N for alle komponenter, for intern standardene er det i tillegg tatt med RSD verdi for både respons og S/N. Økningen i respons er som forventet i forhold til økning i injeksjonsvolum, men det er lite økning i S/N. Nederst i tabellen er det beregnet et gjennomsnitt av resultatene i hver kolonne, disse verdiene er benyttet for å beregne % økning i respons og S/N for alle komponentene totalt. Responsen øker totalt mer enn forventet økning på 200% ved 4 µL og 300% ved 6 µL, men S/N blir totalt ikke bedre ved økt injeksjonsvolum. PMA og 2C-B har samme lave S/N ved alle tre injeksjonsvolum, mens mCPP er ut til å øke. Det er med et lite antall prøver for hver komponent, med den store variasjonen S/N har, kan verdiene slå litt tilfeldig i denne testen. Totalen med gjennomsnitt av alle komponentene blir derfor vektet mest i vurderingen.

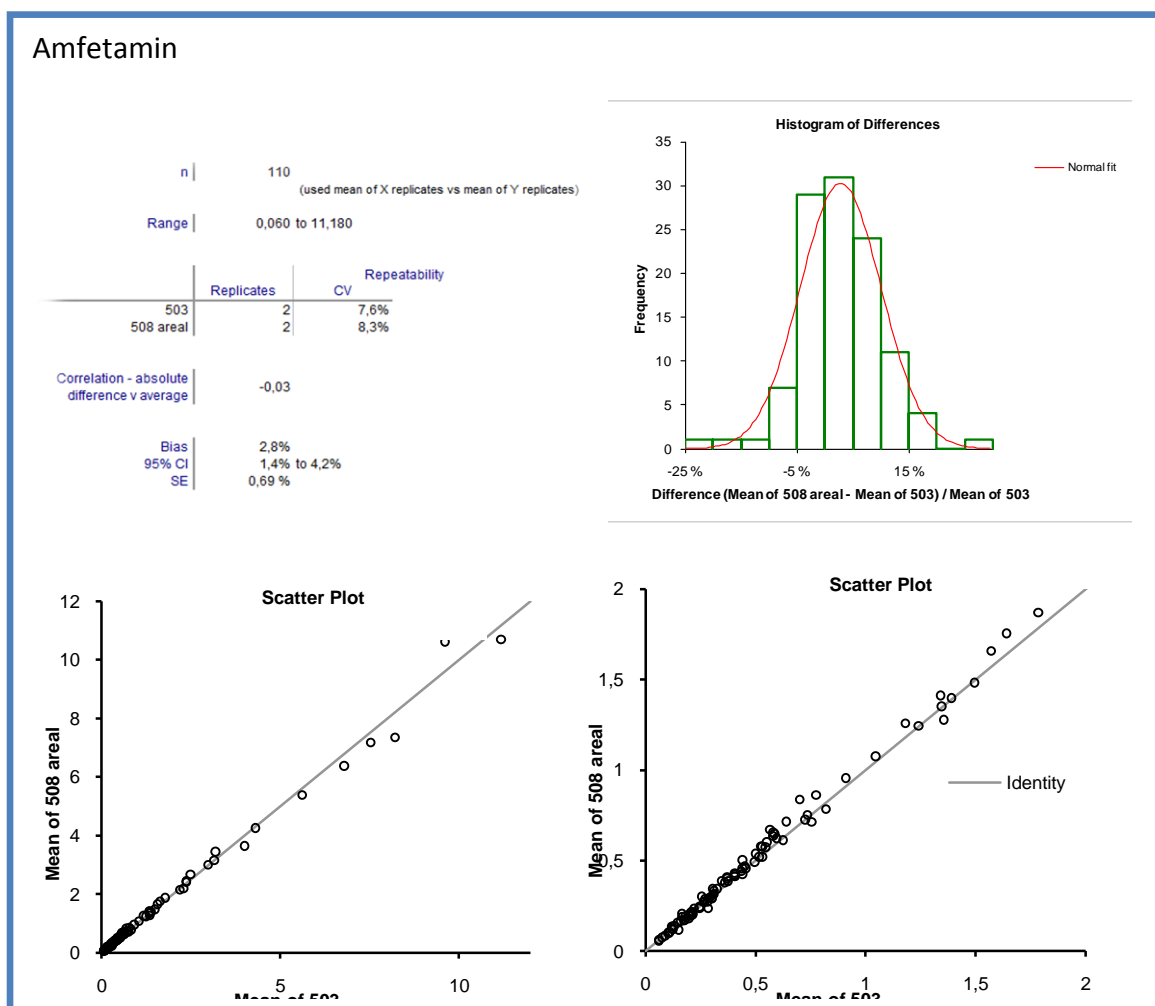
Tabell 4-25 Respons og S/N ved injeksjonsvolum på 2 µL, 4 µL og 6 µL.

Analytt	Kons.	Antall	2 µL			4 µL			6 µL		
			Snitt respons	Snitt S/N	Minste S/N	Snitt respons	Snitt S/N	Minste S/N	Snitt respons	Snitt S/N	Minste S/N
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> amfetamin	2,5 µM	64	2023910	4314	544	5026360	4605	689	7343947	5250	653
RSD			14%	262%		21%	73%		26%	73%	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> metamfetamin	2,5 µM	64	3315546	37168	811	8885835	58002	759	15382018	37775	2547
RSD			12%	165%		17%	162%		16%	72%	
MDMA-d5	2,5 µM	64	1563233	1673	166	4202809	4224	551	6625247	4308	1139
RSD			11%	70%		12%	174%		14%	79%	
amfetamin	0,10 µM	2	48819	195	156	137929	268	180	210731	252	199
	0,30 µM	3	124082	928	211	326854	716	542	507796	619	483
metamfetamin	0,10 µM	2	100109	1185	512	313525	987	490	575236	520	213
	0,30 µM	3	299782	4826	175	836653	9476	4789	1498645	6047	3504
MDMA	0,10 µM	2	63176	1575	57	182939	241	198	724760	949	475
	0,30 µM	3	168442	414	24	443366	542	167	296956	236	197
MDA	0,10 µM	2	16623	775	460	53481	269	113	91427	743	658
	0,30 µM	3	46962	463	71	141754	1590	158	176970	478	350
MDEA	0,10 µM	2	81575	206	204	269158	217	187	475456	237	227
	0,30 µM	3	230580	236	147	674490	299	109	1143108	486	435
PMA	0,05 µM	5	19858	250	89	59374	265	115	94294	243	44
PMMA	0,05 µM	5	82168	264	25	255475	294	94	469834	397	69
mCPP	0,05 µM	5	18733	70	25	48983	83	41	103033	235	99
2C-B	0,05 µM	5	22140	96	36	52550	150	35	80672	91	34
MDPV	0,05 µM	5	189884	2465	2193	495723	4961	4326	773488	7275	3357
Katinon	0,5 µM	4	280357	104	96	595200	224	177	646153	230	188
Metkatinon	0,5 µM	4	289990	483	329	652120	1078	647	906091	829	622
Efedrin	0,5 µM	4	233863	131	105	520056	249	147	716818	340	137
Pseudoefedrin	0,5 µM	4	156306	90	71	345344	166	101	516277	262	91
Norefedrin	0,5 µM	4	370763	452	293	654959	891	677	705698	499	200
Norpseudoefedrin	0,5 µM	4	225443	268	175	442554	550	450	496307	359	127
<b>Gjennomsnitt av alle komponenter</b>	<b>Snitt</b>	<b>266</b>	<b>415514</b>	<b>2443</b>	<b>291</b>	<b>1067395</b>	<b>3764</b>	<b>656</b>	<b>1690040</b>	<b>2861</b>	<b>669</b>
	Minst % økning	fra 2µL	16623	70	24	48983	83	35	80672	91	34
						257%	154%		407%	117%	

#### 4.4.9 Sammenlikning med eksisterende metode

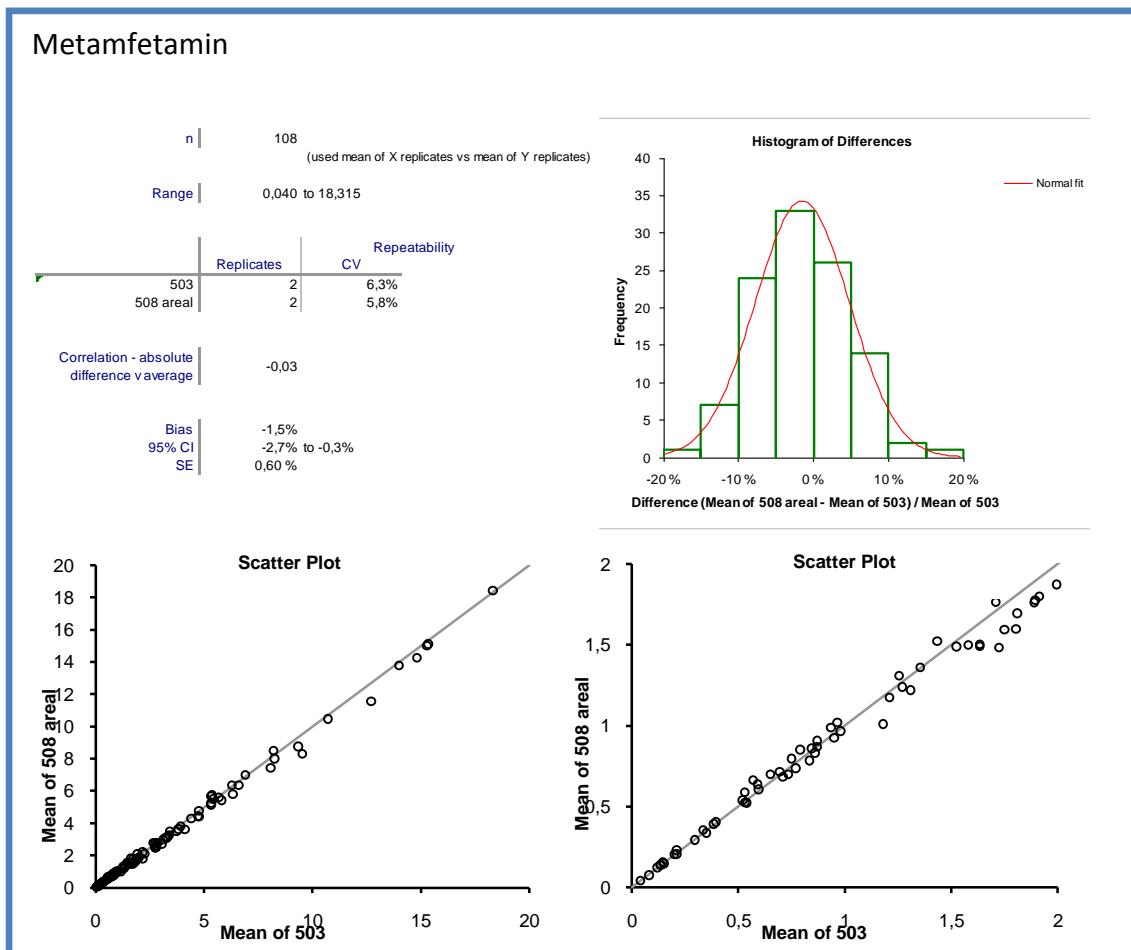
Ved sammenlikning av resultater analysert på ny og eksisterende metode, ble Analyse It, v2.11, Method Comparison – Difference plot, benyttet. På RE benyttes metode nummer, eksisterende amfetamin metode heter 503, og ny heter 508.

Figur 4-20 viser resultatene til 110 saker med amfetamin i konsentrasjons område 0,06  $\mu\text{M}$  til 11,18  $\mu\text{M}$ , ved bruk av areal beregning på ny metode. Alle sakene har paralleller, som har god repeterbar het på begge metoder, CV er det samme som RSD. Det er godt samsvar mellom ny og eksisterende metode, med en bias på 2,8%, vil si at ny metode gjennomsnittlig ligger 2,8% lavere enn gammel metode. Scatter plot viser en jevn fordeling av plott over linjen som markerer identiske resultat, det er nærmest identiske resultat mellom de to metodene.



Figur 4-20 Metodesammenlikning for amfetamin

Resultatene til metamfetamin viser også godt samsvar mellom ny og eksisterende metode, også god repeterbarhet, se Figur 4-21. Figuren viser at ny og gammel metode gir samme resultat på de 108 sakene i konsentrasjons område 0,04 µM til 18,31 µM.



Figur 4-21 Metodesammenligning for metamfetamin

Det er stort sett amfetamin og metamfetamin i prøvene til bekreftelse av amfetaminer, men noen få funn av andre komponenter er satt opp i Tabell 4-26. På grunn av litt få funn, ble det rekvirert noen saker i ettetid når det var positive funn på eksisterende metode.

Av andre funn stemmer de fleste resultatene overens med eksisterende metode. PMMA hele 6 av 12 saker som avviker >20%, skyldes dette bruk av forskjellige standarder på gammel og ny metode. Når det gjelder blant annet PMA og PMMA, hadde disse et for stort avvik i riktighet i kapittel 4.4.3, det ble derfor i første omgang laget nye stamløsninger til standarder. Det er bruksløsninger av de nye stamløsningene som er benyttet på ny metode, derfor har vi et stort avvik på 6 av PMMA og 1 PMA. MDPV er ikke med i eksisterende metode, resultatet er sammenlignet med resultat fra screening metode.

Tabell 4-26 Andre funn som ble sammenlignet mellom ny og gammel metode, antall saker og antall saker som avviker mer enn 20 % med gammel metode.

Komponente	Antall saker	Antall med avvik > 20%
MDMA	5	0
PMMA	12	6
PMA	4	1
mCPP	1	0
MDPV	1	0 *

#### 4.4.10 Spesifisitet

Det er ikke ekstrahert eget forsøk i denne oppgaven, men det samme pH og nesten samme gradient program som publisert opiat i urin metode som testet 96 ulike komponenters retensjonstid, se appendiks [26]. I den publiserte metoden er gradient programmet litt raskere, fordi det var behov for å bremse gradient programmet i denne metoden ved 2-3 minutter, se Tabell 4-1. I forhold til publisert metode har mobilfasen pH 10,2 blitt endret fra 5 mM ammonium bikarbonat buffer til 5 mM ammonium format buffer.

#### 4.5 Videre arbeid

REAR har fått flere nye instrumenter, en Water Xevo TQ-S ble installert rett før jul og en til skal installeres i disse dager, instrumentet har en høyere følsomhet (ca 20X) enn instrumentet benyttet i oppgaven. Dette instrumentet er nå tatt i bruk til forsøk med tanke på metoden, injeksjonsvolum er redusert til 0,5 µL, og det utføres ulike justeringer for å prøve øke følsomheten spesielt for amfetamin, MDA, PMA, mCPP og 2C-B. Det vil bli utført en enkel validering, for å vise at resultatene er minst like bra på Xevo TQ-S, som på Xevo TQ.

Metodebeskrivelse og metodedokumentasjon skal fullføres, og resultater skal inn i valideringsrapport. Valideringsrapporten benyttes for å akkreditere komponentene i metoden. Før metoden kan tas i bruk i rutinen på RE, må amfetamin, metamfetamin og MDMA akkrediteres, siden disse 3 komponentene er akkreditert i eksisterende metode.

Videre skal det jobbes med en publikasjon av resultatene fra denne oppgaven.

## 5 Konklusjon

FHI-RE har fått utviklet en metode til kvantitativ bekreftelse av amfetaminer i blod, ved bruk av UPLC-MS/MS.

Prøveopparbeidelsen utføres med en felling av blod med ACN:MeOH før filtrering med CaptivaND lipid 96-brønnsfilterplate. CaptivaND lipid filterplater er enkelt å jobbe med, og fjerner mye av fosfolipidene fra matriks.

Kolonnen er omvendtfase separasjonsteknikk, C18. Bufferen som ga best respons er ammoniumformatbuffer pH 10,2, som sammen med MeOH er mobilfasen i systemet. Gradient programmet gir god separasjon for komponentene. Det er valgt 2 MRM overganger for hver analytt.

Det er benyttet C13-merket internstandard for Amfetamin og Metamfetamin og deuterium merket internstandard for MDMA

Valideringen viste god stabilitet for retensjonstider. Ved bruk av areal ved beregning, er alle komponentene lineære i standard kurve området, presisjonen er bra, og beregning av MDK og MKK ga tilfredsstillende resultater i forhold til fastsatte påvisningsgrenser. Det er behov for å jobbe litt mer med PMA, mCPP og 2C-B, som har påvisningsgrense i et litt varierende område. Riktigheten var bra for de fleste komponentene, det er laget nye standard og kontroll løsninger, for de med for stort avvik.

Man må være oppmerksomme på overdrag ved høye konsentrasjoner, spesielt for ecstasy lignende stoffer. Ekstraksjonsutbytte er tilfredsstillende, ekstraktene har god holdbarhet, og det er ingen tydelige, gjentakende matrikseffekter, utenom et par ione forsterkelses.

Stabiliteten og robustheten til metoden er bra, og resultater fra ny og eksisterende metode gir nærmest identiske svar for amfetamin, metamfetamin og MDMA. Lite sammenlignings materiale for de andre komponenter, litt avvik for PMMA og PMA på grunn av riktighet på løsninger.

Sammenlignet med eksisterende metode vil det spares mye tid under prøveopparbeidelsen. Ny metode vil gi bedre ergonomi gjennom mindre belastninger for skuldre og ermer. Sammenlignet med GCSM vil det være enklere å implementere nye komponenter i UPLC-MS/MS metoden. Man er ikke begrenset av at komponentene skal over i gassfase og en slipper derivatsiering.

## 6 Referanseliste

- [1]. Folkehelseinstituttet. (2012). *Amfetamin - fakta om amfetamin og metamfetamin*. Tilgjengelig fra: [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft\\_5648&MainArea\\_5661=5648:0:15,2917:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_5648=5544:47081::1:5647:5:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5648&MainArea_5661=5648:0:15,2917:1:0:0:::0:0&MainLeft_5648=5544:47081::1:5647:5:::0:0).
- [2]. Folkehelseinstituttet. (2011). *Ecstasy - faktaark*. Tilgjengelig fra: [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft\\_5648&MainArea\\_5661=5648:0:15,2917:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_5648=5544:48062::1:5647:19:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5648&MainArea_5661=5648:0:15,2917:1:0:0:::0:0&MainLeft_5648=5544:48062::1:5647:19:::0:0).
- [3]. Folkehelseinstituttet. (2011). *Khat - faktaark*. Tilgjengelig fra: [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft\\_5648&MainArea\\_5661=5648:0:15,2917:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_5648=5544:65963::1:5647:38:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5648&MainArea_5661=5648:0:15,2917:1:0:0:::0:0&MainLeft_5648=5544:65963::1:5647:38:::0:0).
- [4]. Landsforeningen-uventet-barnedød. (2010). *Hostemedisinen efedrin kan være farlig for små barn*. Tilgjengelig fra: <http://www.lub.no/hostemedisinen-efedrin-kan-vere-farlig-for-sma-barn>.
- [5]. Lovdata. Forskrift om narkotika m.v (Narkotikalisten).
- [6]. Regjeringen. (2010-2011). *Helse og omsorgdepartementet Kap.710 Nasjonalt folkehelseinstitutt*. Tilgjengelig fra: <http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/dok/regpubl/prop/2010-2011/prop-1-s-20102011/5/2/1.html?id=617589>.
- [7]. SOFT/AAFS. (2006). *Forensic toxology laboratory guidelines*. Tilgjengelig fra: [http://www.soft-tox.org/files/Guidelines\\_2006\\_Final.pdf](http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf).
- [8]. Regjeringen. (2007). *Helse- og omsorgdepartementet, Lovgivning*. Tilgjengelig fra: <http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/tema/rus/forebygginglovgivning.html?id=449058>.
- [9]. Vindenes, V., Jordbru, D., Knapskog, A. B., Kvan, E., Mathisrud, G., Slordal, L. & Morland, J. (2011). Impairment based legislative limits for driving under the influence of non-alcohol drugs in Norway. *Forensic Sci Int*.
- [10]. Vevelstad, M., Øiestad, E. L., Middelkoop, G., Hasvold, I., Lilleng, P., Delaveris, G. J. M., Eggen, T., Mørland, J. & Arnestad, M. (2011). The PMMA epidemic in Norway: Comparison of fatal and non-fatal intoxications. *Forensic Science International* (0).
- [11]. Al-Samarraie, M., Khiabani, H. Z. & Opdal, M. S. (2007). Khat - et nytt rusmiddel i Norge. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 127: 574-579.
- [12]. Berg, A., Furu, K., Einen, M. & Spigset, O. (2010). Bør barn behandles med efedrin mikstur? *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 130: 2474-2479.
- [13]. Folkehelseinstituttet. (2011). *Rusmiddelstatistikk*. Tilgjengelig fra: [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainArea\\_5661&MainArea\\_5661=5583:0:15,1359:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_5583=5603:91725::1:5585:1:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainArea_5661&MainArea_5661=5583:0:15,1359:1:0:0:::0:0&MainLeft_5583=5603:91725::1:5585:1:::0:0).
- [14]. Gjerde, H., Hasvold, I., Pettersen, G. & Christoffersen, A. S. (1993). Determination of amphetamine and metamphetamine in blood using derivatization with perfluorooctanyl chloride and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 17: 65-69.
- [15]. Miller, J., M. (2005). *Chromatography, Concepts & Contrasts*. 2 utg. New Jersey: A John Wiley & sons, inc.,.
- [16]. Greibrokk, T., Lundanes, E. & Rasmussen, K., E. (1994). *Kromatografi*. 3 utg. Oslo. 300 s.
- [17]. Wikipedia. *van Deemter*. Tilgjengelig fra: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Van-Deemter\\_png.PNG?uselang=de](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Van-Deemter_png.PNG?uselang=de).
- [18]. E, S. M. (2005). UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Chromatography & Related Technologies*, 28 (7-8): 1253.
- [19]. Hoffmann, E. d. & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry, Principles and Application*. 3 utg. Wiley. Chichester. 489 s.

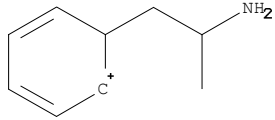
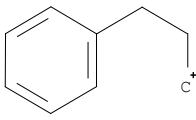
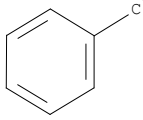
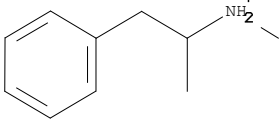
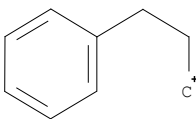
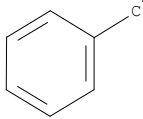
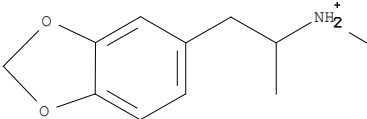
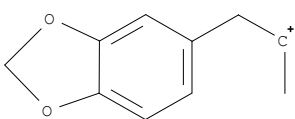
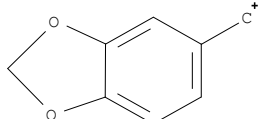
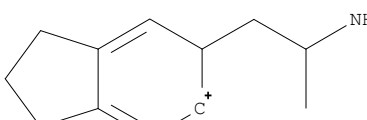
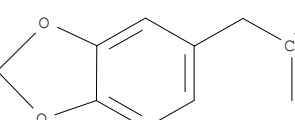
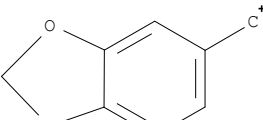
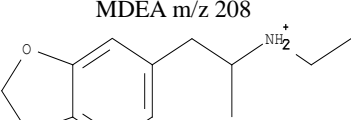
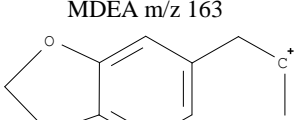
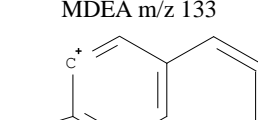
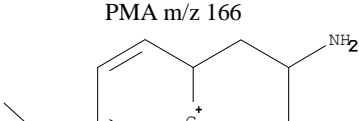
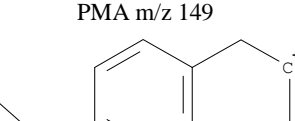
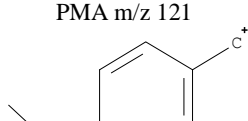
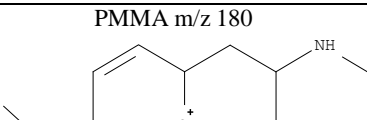
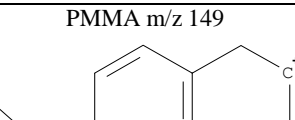
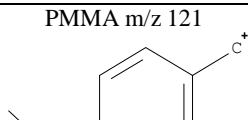


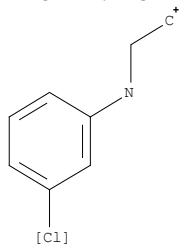
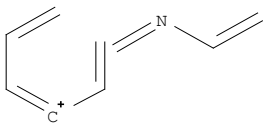
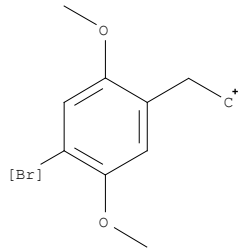
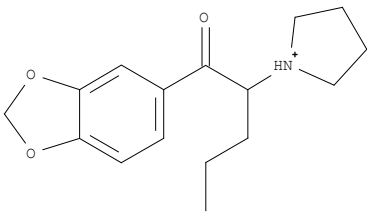
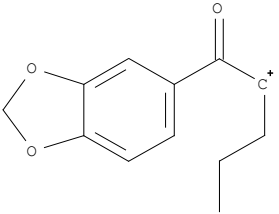
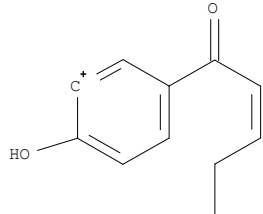
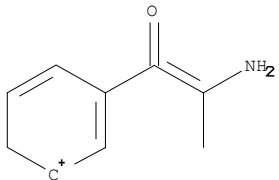
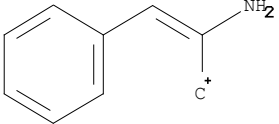
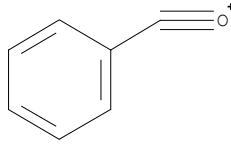
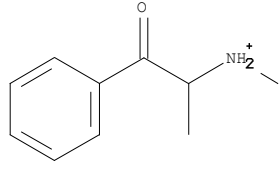
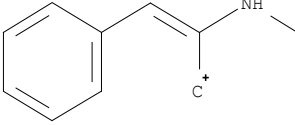
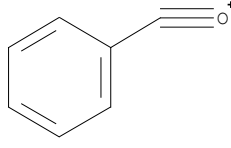
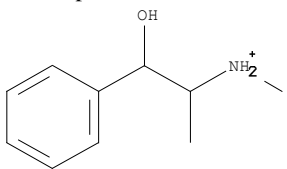
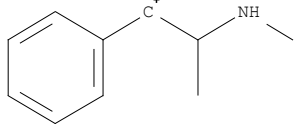
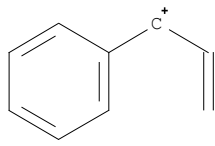
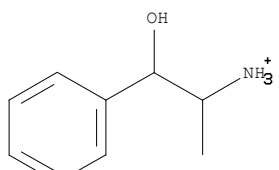
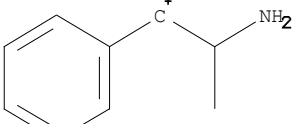
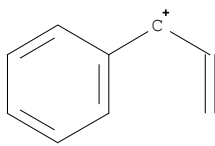
- [20]. Tandem Labs. *Managing Phospholipid-Based Matrix Effects In Bioanalysis*. Salt Lake City. Tilgjengelig fra: [http://www.tandemlabs.com/documents/IMSC\\_06\\_Web.pdf](http://www.tandemlabs.com/documents/IMSC_06_Web.pdf).
- [21]. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*, 75 (13): 3019-30.
- [22]. Store Norske Leksikon. *Fosfolipid*. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/fosfolipider>.
- [23]. Jemal, M., Ouyang, Z. & Xia, Y. Q. (2010). Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance, usage of incurred sample and well thought-out chromatography. *Biomed Chromatogr*, 24 (1): 2-19.
- [24]. Wikipedia. *Phospholipid*. Tilgjengelig fra: <http://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipid>.
- [25]. Berg, T. & Strand, D. H. (2011). (13)C labelled internal standards-A solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *J Chromatogr A*, 1218 (52): 9366-74.
- [26]. Berg, T., Lundanes, E., Christophersen, A. S. & Strand, D. H. (2009). Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (4): 421-32.
- [27]. Karinen, R., Andersen, J. M., Ripel, A., Hasvold, I., Hopen, A. B., Morland, J. & Christophersen, A. S. (2009). Determination of heroin and its main metabolites in small sample volumes of whole blood and brain tissue by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 33 (7): 345-50.
- [28]. Dahl, S. R., Olsen, K. M. & Strand, D. H. (2011). Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B*, 885-886: 37-42.
- [29]. US Food and Drug Administration. *Bioanalytical method validation*. Tilgjengelig fra: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/FieldScience/ucm171610.htm>.

## 7 Appendiks

### 7.1 Oversikt over struktur på foreldre ion og fragment ioner i MRM-overgangene i metoden.

Tabell 7-1 Forslag til kjemisk struktur på foreldre ion og flere fragment ioner brukt i MRM overgangene i metoden

<p>Amfetamin m/z 136</p> 	<p>Amfetamin m/z 119</p> 	<p>Amfetamin m/z 91</p> 
<p>Metamfetamin m/z 150</p> 	<p>Metamfetamin m/z 119</p> 	<p>Metamfetamin m/z 91</p> 
<p>MDMA m/z 194</p> 	<p>MDMA m/z 163</p> 	<p>MDMA m/z 135</p> 
<p>MDA m/z 180</p> 	<p>MDA m/z 163</p> 	<p>MDA m/z 135</p> 
<p>MDEA m/z 208</p> 	<p>MDEA m/z 163</p> 	<p>MDEA m/z 133</p> 
<p>PMA m/z 166</p> 	<p>PMA m/z 149</p> 	<p>PMA m/z 121</p> 
<p>PMMA m/z 180</p> 	<p>PMMA m/z 149</p> 	<p>PMMA m/z 121</p> 

<p>mCPP m/z 154</p>  <p>[Cl]</p>	<p>mCPP m/z 119</p> 	<p>2C-B m/z 243</p>  <p>[Br]</p>
<p>MDPV m/z 276</p> 	<p>MDPV m/z 205</p> 	<p>MDPV m/z 175</p>  <p>HO</p>
<p>Katiron m/z 150</p> 	<p>Katiron m/z 132</p> 	<p>Katiron m/z 105</p> 
<p>Metkatiron m/z 164</p> 	<p>Metkatiron m/z 146</p> 	<p>Metkatiron m/z 105</p> 
<p>Efedrin/ pseudoefedrin m/z 166</p> 	<p>Efedrin/ pseudoefedrin m/z 148</p> 	<p>Efedrin/ pseudoefedrin m/z 117</p> 
<p>Norefedrin/ norpseudoefedrin m/z 152</p> 	<p>Norefedrin/ norpseudoefedrin m/z 134</p> 	<p>Norefedrin/ norpseudoefedrin m/z 117</p> 

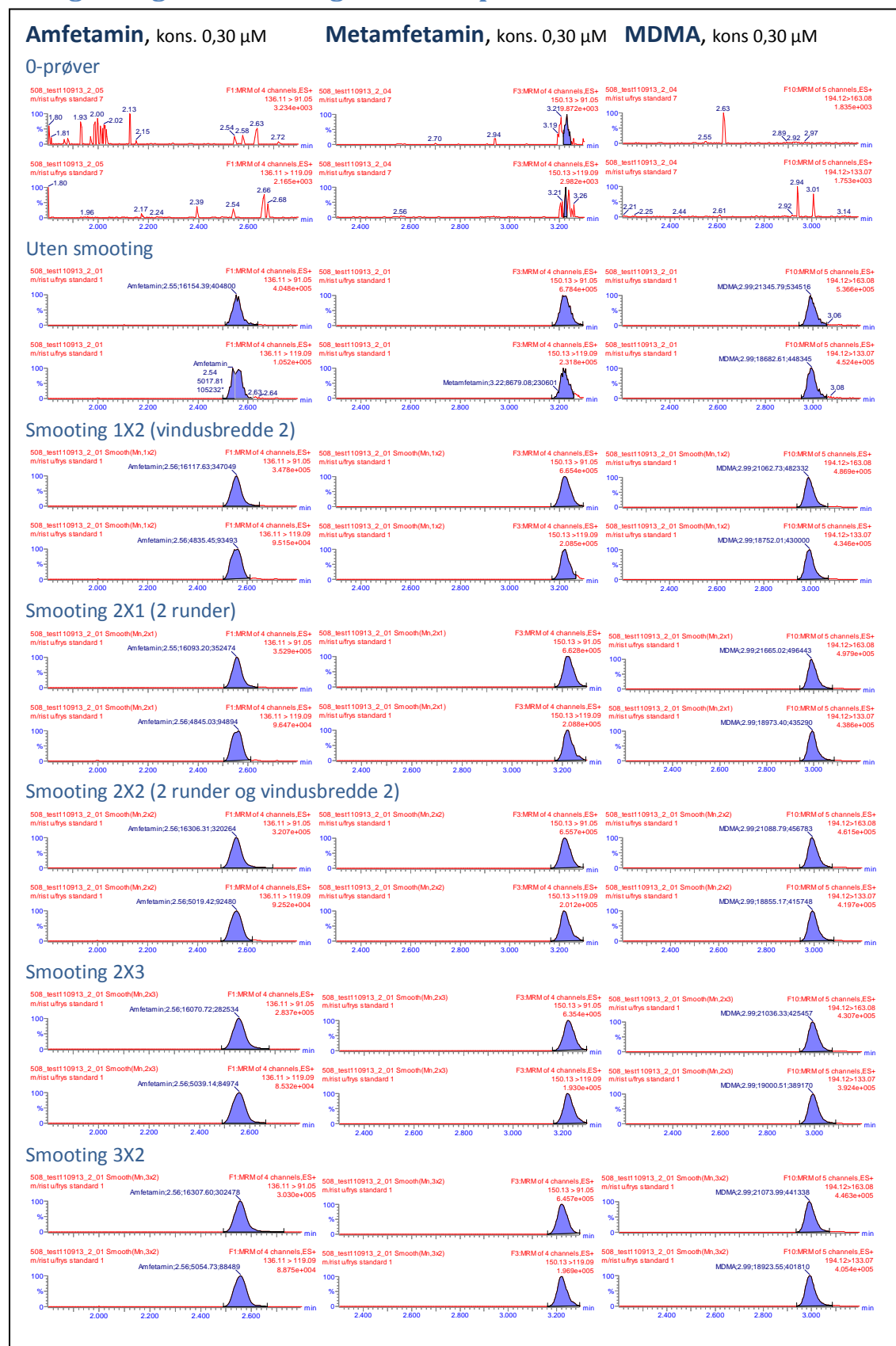
Tabell 7-2 Regneark benyttet til å regne eksakte masser på analytt og ioner i metoden. Hvilke og antall atomer for de ulike massene til fragment ionene brukt i MRM overgangene for amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA, MDEA, PMA, PMMA og intern standardene vises i denne tabellen.

	C <sup>12</sup>	C <sup>13</sup>	H	D	N	O	F	Na	Si <sup>28</sup>	S <sup>37</sup>	Cl <sup>35</sup>	Cl <sup>37</sup>	Br <sup>79</sup>	Br <sup>81</sup>	
Amfetamin	9		13		1										135,10
[Amfetamin]H <sup>+</sup>	9		14		1										136,11
[Amfetamin]H <sup>+</sup>	9		11												119,09
[Amfetamin]H <sup>+</sup>	7		7												91,05
[AmfetaminD11]	9		2	11	1										146,17
[AmfetaminD11]H <sup>+</sup>	9		3	11	1										147,18
[AmfetaminD11]H <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O	9			11											130,15
[AmfetaminD6]H <sup>+</sup> - C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	7			7											98,10
[13C6-Amfetamin]	3	6	13		1										141,12
[13C6-Amfetamin]H <sup>+</sup>	3	6	14		1										142,13
[13C6-Amfetamin]H <sup>+</sup>	3	6	11												125,11
[13C6-Amfetamin]H <sup>+</sup>	1	6	7												97,07
Metamfetamin	10		15		1										149,12
[Metamfetamin]H <sup>+</sup>	10		16		1										150,13
[Metamfetamin]H <sup>+</sup> -	9		11												119,09
[Metamfetamin]H <sup>+</sup> -	7		7												91,05
Metamfetamin-D11	10		4	11	1										160,19
[Metamfetamin-D11]H <sup>+</sup>	10		5	11	1										161,20
[Metamfetamin-D11]H <sup>+</sup> -	9		3	8											127,14
[Metamfetamin-D11]H <sup>+</sup> -	7		1	6											97,09
13C6-Metamfetamin	4	6	15		1										155,14
[13C6-Metamfetamin]H <sup>+</sup>	4	6	16		1										156,15
[13C6-Metamfetamin]H <sup>+</sup> -	3	6	11												125,11
[13C6-Metamfetamin]H <sup>+</sup> -	1	6	7												97,07
MDMA	11		15		1	2									193,11
[MDMA]H <sup>+</sup>	11		16		1	2									194,12
[MDMA]H <sup>+</sup>	10		11			2									163,08
[MDMA]H <sup>+</sup>	8		7			2									135,04
[MDMA]H <sup>+</sup>	9		9			1									133,07
MDMA-D5	11		10	5	1	2									198,14
[MDMA-D5]H <sup>+</sup>	11		11	5	1	2									199,15
[MDMA-D5]H <sup>+</sup>	10		9	2		2									165,09
[MDMA-D5]H <sup>+</sup>	9		7	2		1									135,08
MDA	10		13		1	2									179,09
[MDA]H <sup>+</sup>	10		14		1	2									180,10
[MDA]H <sup>+</sup>	10		11			2									163,08
[MDA]H <sup>+</sup>	8		7			2									135,04
[MDA]H <sup>+</sup>	9		9			1									133,07
MDEA	12		17		1	2									207,13
[MDEA]H <sup>+</sup>	12		18		1	2									208,13
[MDEA]H <sup>+</sup>	10		11			2									163,08
[MDEA]H <sup>+</sup>	9		9			1									133,07
PMA	10		15		1	1									165,12
[PMA]H <sup>+</sup>	10		16		1	1									166,12
[PMA]H <sup>+</sup>	10		13			1									149,10
[PMA]H <sup>+</sup> -	8		9			1									121,07
PMMA	11		17		1	1									179,13
[PMMA]H <sup>+</sup>	11		18		1	1									180,14
[PMMA]H <sup>+</sup>	10		13			1									149,10
[PMMA]H <sup>+</sup>	8		9			1									121,07

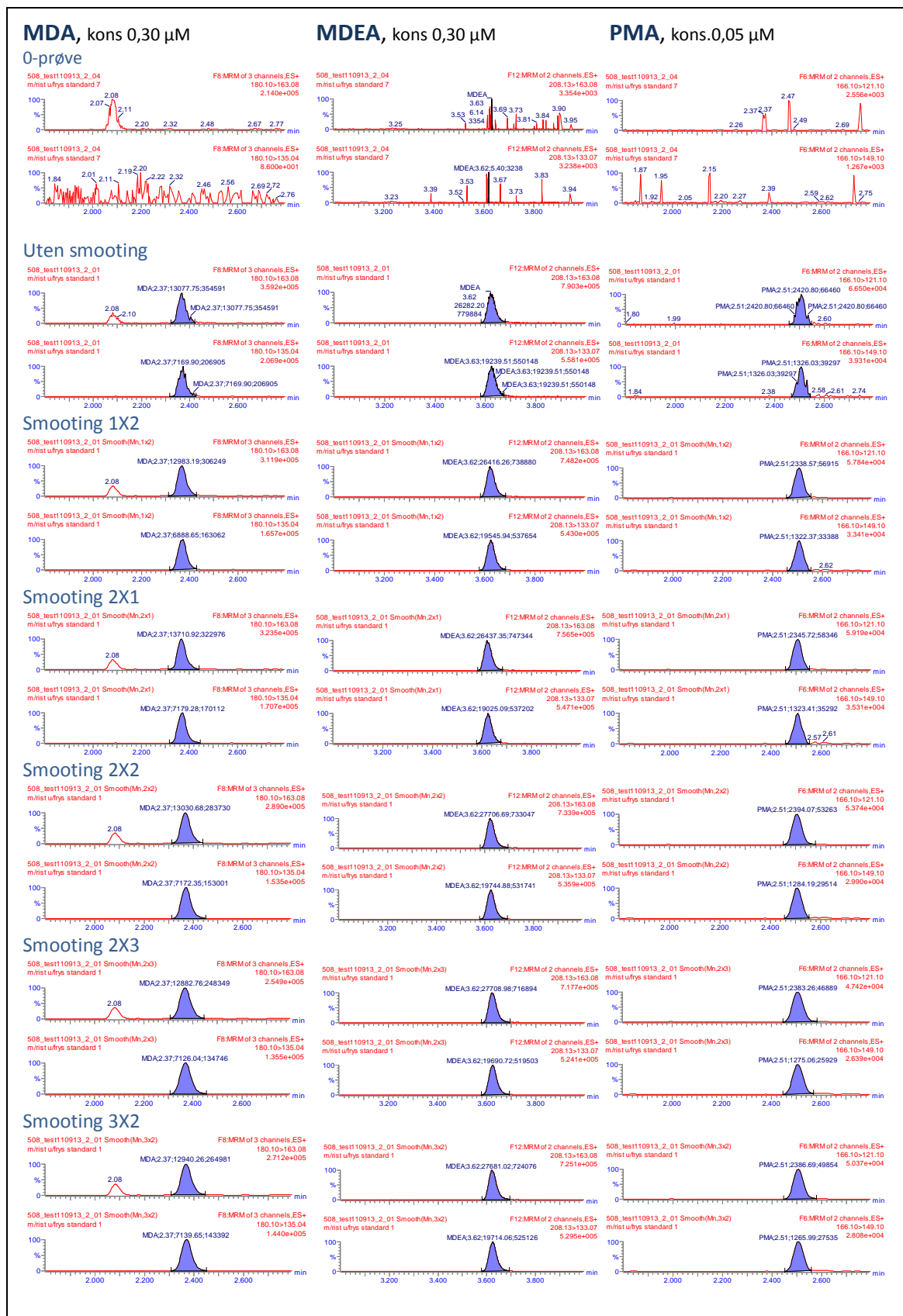
Tabell 7-3 Regneark benyttet for eksakt beregning av masser til analytt og ioner i metoden. Hvilke og antall atomer for de ulike massene brukt i fragment ionene til mCPP, 2C-B, MDPV, efedrin, pseudoefedrin, norefedrin og norpseudoefedrin vises i tabellen her.

	C <sup>12</sup>	C <sup>13</sup>	H	D	N	O	F	Na	Si <sup>28</sup>	S <sup>37</sup>	Cl <sup>35</sup>	Cl <sup>37</sup>	Br <sup>79</sup>	Br <sup>81</sup>	
mCPP	10		13		2						1				196,08
[mCPP]H+	10		14		2						1				197,08
[mCPP]H+	10		14		2							1			199,08
[mCPP]H+	8		9		1						1				154,04
[mCPP]H+	8		9		1							1			156,04
[mCPP]H+	8		9		1										119,07
2C-B	10		14		1	2							1		259,02
[2C-B]H+	10		15		1	2							1		260,03
[2C-B]H+	10		15		1	2								1	262,03
[2C-B]H+	10		12			2							1		243,00
[2C-B]H+	10		12			2								1	245,00
MDPV	16		21		1	3									275,15
[MDPV]H+	16		22		1	3									276,16
[MDPV]H+	12		13			3									205,09
[MDPV]H+	11		11			2									175,08
[MDPV]H+	8		16		1										126,13
Katinon	9		11		1	1									149,08
[Katinon]H+	9		12		1	1									150,09
[Katinon]H+	9		10		1										132,08
[Katinon]H+	7		5			1									105,03
Metkatinon	10		13		1	1									163,10
[Metkatinon]H+	10		14		1	1									164,11
[Metkatinon]H+	10		12		1										146,10
[Metkatinon]H+	9		9		0	1									133,07
[Metkatinon]H+	7		5			1									105,03
Efedrin	10		15		1	1									165,12
[Efedrin]H+	10		16		1	1									166,12
[Efedrin]H+	10		14		1										148,11
[Efedrin]H+	9		9												117,07
*Pseudoefedrin															
Katin/ norpseudoefedrin	9		13		1	1									151,10
[Katin]H+	9		14		1	1									152,11
[Katin]H+	9		12		1										134,10
[Katin]H+	9		9												117,07
*Fenylpropanolamin/ norefedrin															

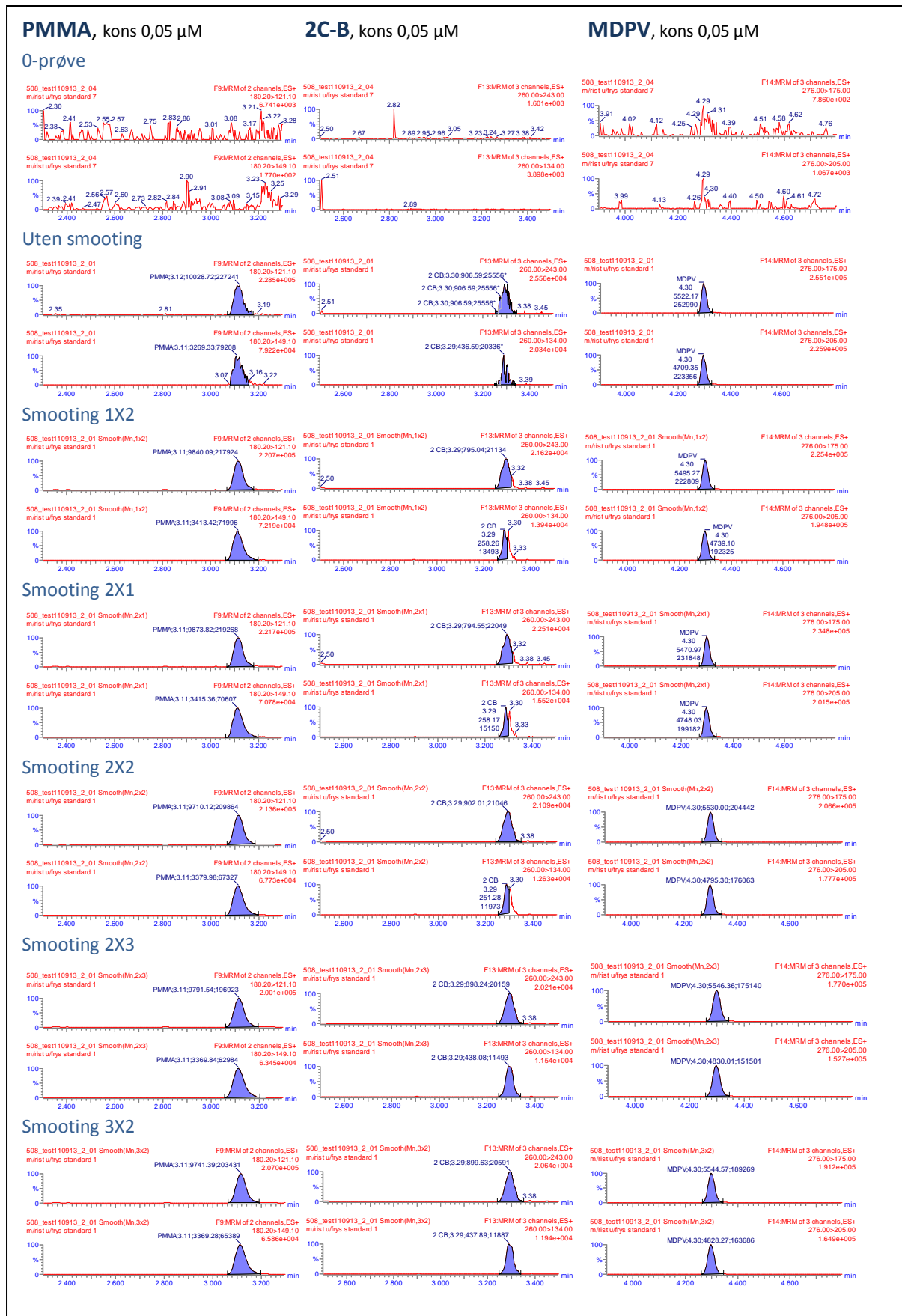
## 7.2 Kromatogram av komponentene i TargetLynx, topper med og uten glatting er sammenlignet med 0-prøve.



Figur 7-1 Kromatogram med MRM overgangene ved ulik glatting av toppene for amfetamin, metamfetamin og MDMA, sammenlignet med negativ prøve.

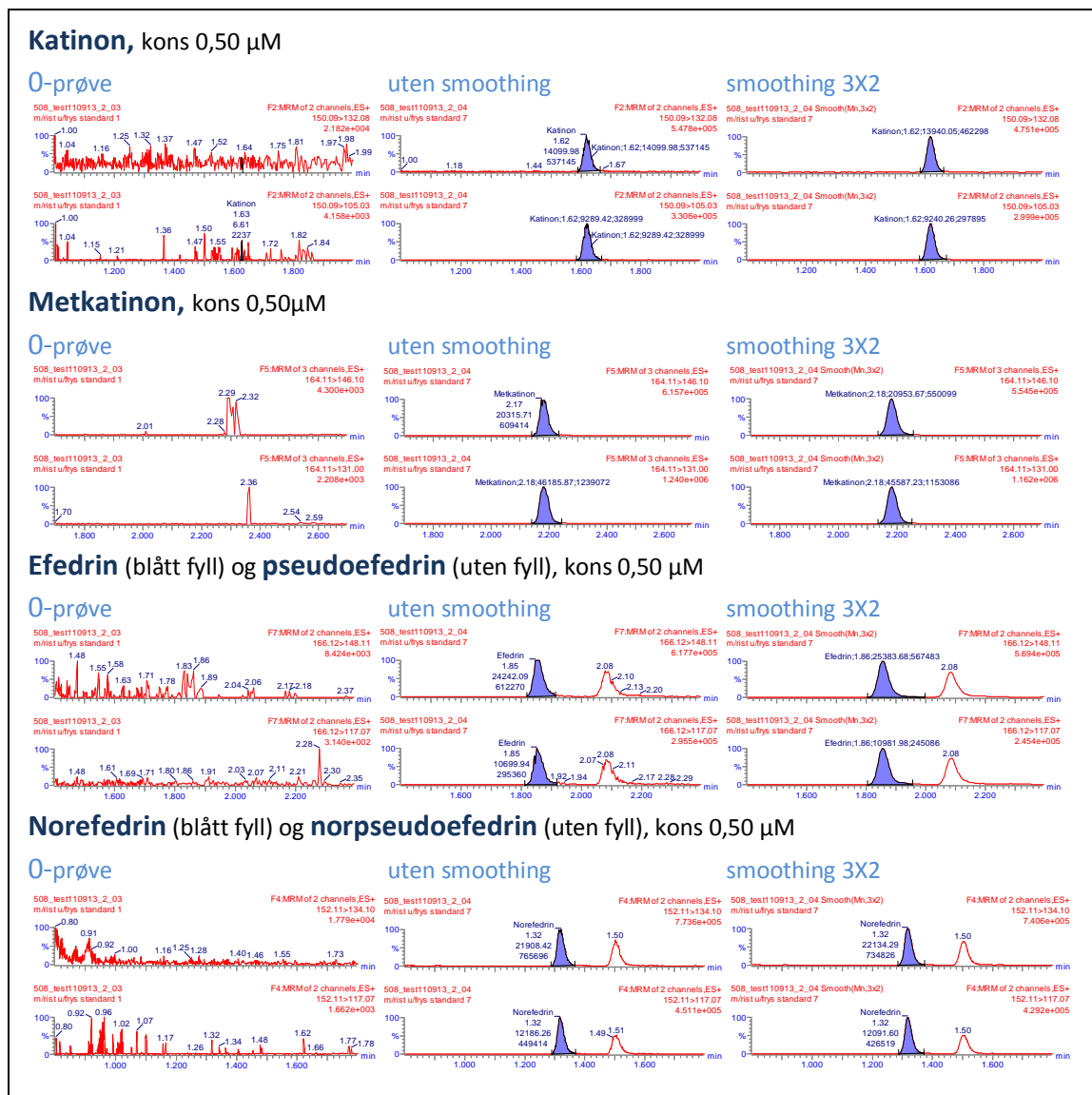


Figur 7-2 Kromatogram med MRM overgangene ved ulik glatting av toppene, for MDA, MDEA og PMA, sammenlignet ned negativ prøve.



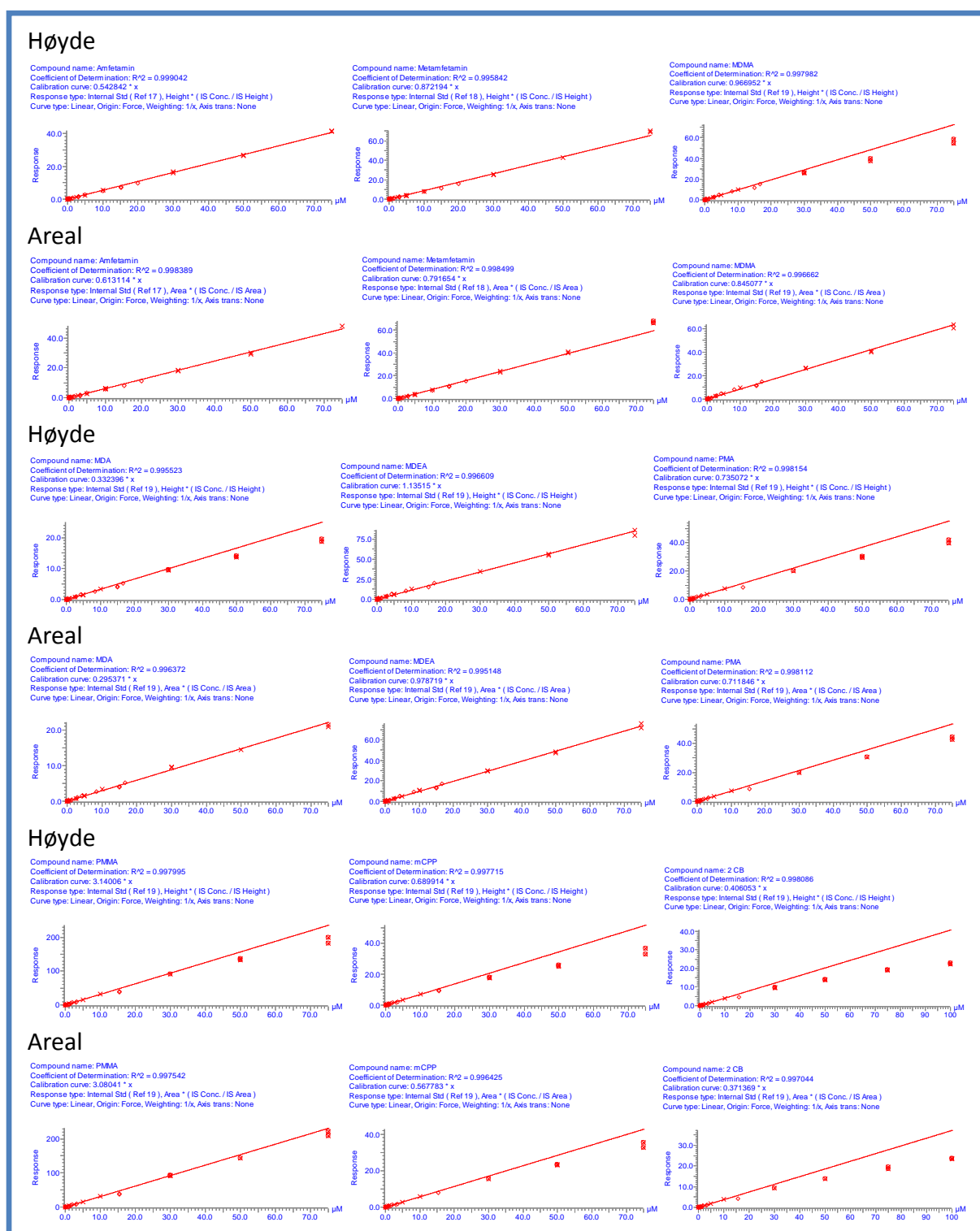
Figur 7-3 Kromatogram av MRM overgangene ved ulik glatting av toppene for PMMA, 2C-B og MDPV, som er sammenlignet med negativ prøve.



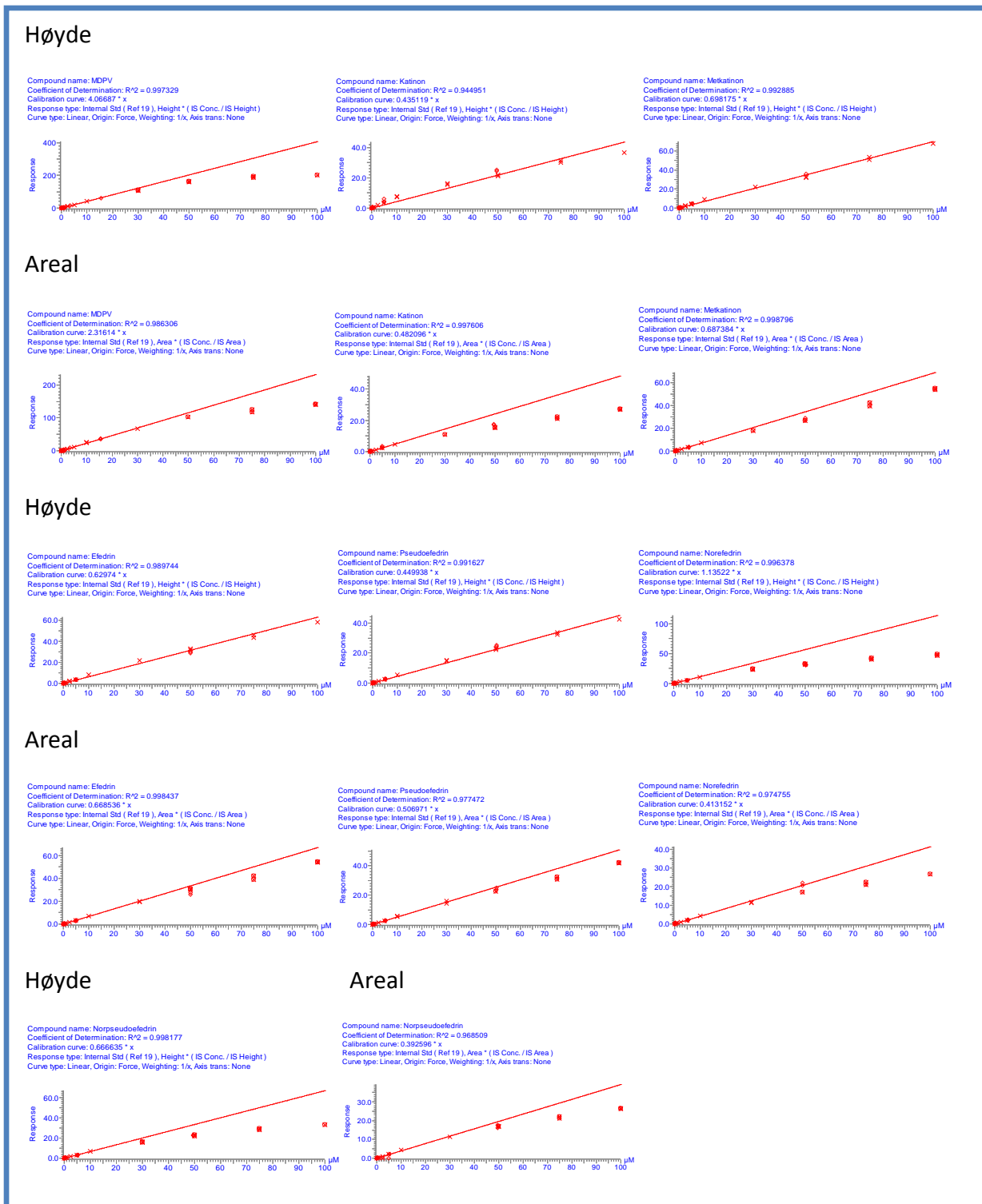


Figur 7-4 Kromatogram av MRM overgangene ved ulik glatting av toppene til katinon, metkatinon, efedrin, pseudoefedrin, norefedrin og norpseudoefedrin, sammenlignet med negativ prøve.

### 7.3 Linearitet for komponentene, fra 0 til 100µM, både ved bruk av høyde og areal i beregningen.



Figur 7-5 Linearitet for amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA, MDEA, PMA, PMMA, mCPP og 2C-B, som er testet opp til 75µM og en (2C-B) er testet opp til 100µM. Linearitet både ved bruk av høyde og areal ved beregning, ved 2µL injeksjon uten inndampning i prøveopparbeidelsen.

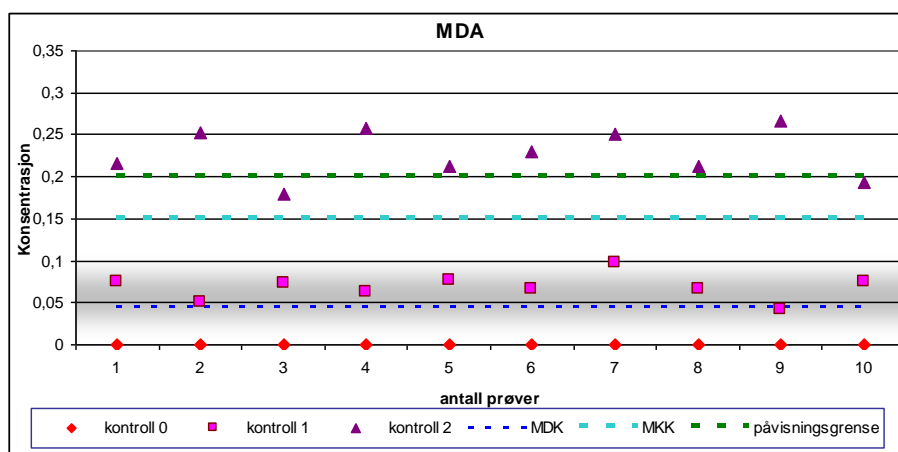


Figur 7-6 Linearitet for MDPV, katinon, metkatinon, efedrin, pseudoefedrin, norefedrin og norpseudoefedrin, fra 0 til 100µM. Både ved høyde og areal beregning, ved 2µL injeksjon, uten inndamping i prøveopparbeidelsen.

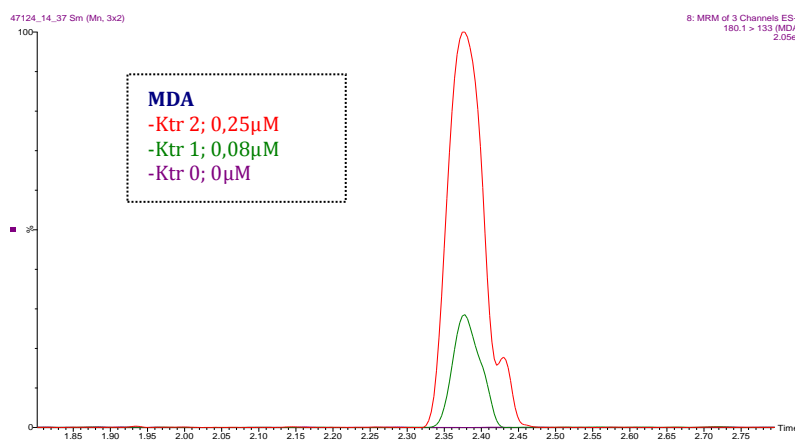
## 7.4 Presisjon og riktighet for andre komponenter enn amfetamin, metamfetamin og MDMA.

Tabell 7-4 Presisjon og riktighet for MDA

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0µM			0 %		
Kontroll 1; 0,08 µM	høyde	10	0,08 µM	0,05 µM	0,13 µM	-2,5%	0,024	31,3%
Kontroll 1; 0,08 µM	areal	10	0,07 µM	0,04 µM	0,10 µM	-14,1%	0,015	22,5%
Kontroll 2; 0,25 µM	høyde	20	0,24 µM	0,18 µM	0,29 µM	-4,0%	0,035	14,5%
Kontroll 2; 0,25 µM	areal	20	0,23 µM	0,18 µM	0,27 µM	-7,9%	0,025	10,8%
Kontroll 3; 2,50 µM	høyde	10	2,45 µM	2,36 µM	2,54 µM	-2,2%	0,064	2,6%
Kontroll 3; 2,50 µM	areal	10	2,43 µM	2,24 µM	2,56 µM	3,1%	0,091	3,7%



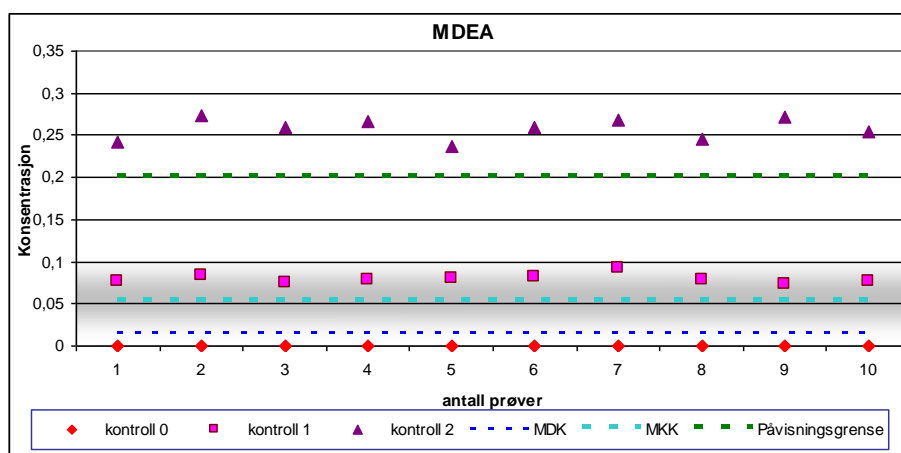
Figur 7-7 Plott av MDA kontroll 0, 1 og 2, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



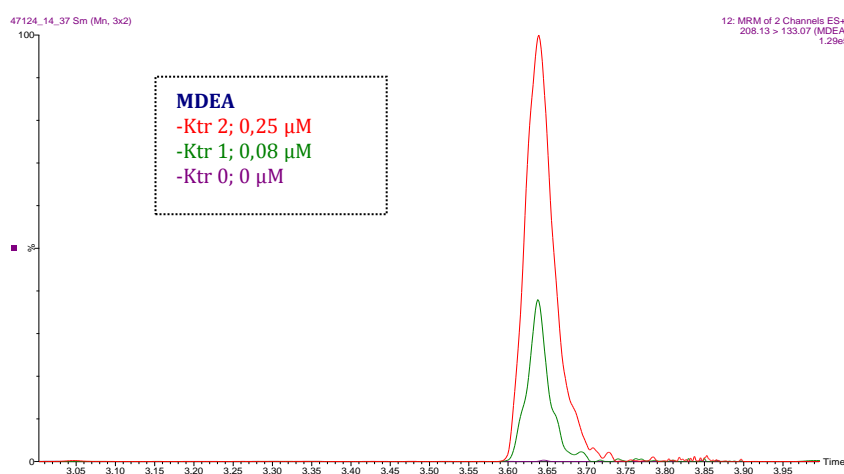
Figur 7-8 Kromatogram av MDA, der kontroll 0,1 og 2 er lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Tabell 7-5 Presisjon og riktighet for MDEA

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0 $\mu\text{M}$			0%		
Kontroll 1; 0,08 $\mu\text{M}$	høyde	10	0,08 $\mu\text{M}$	0,07 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$	-5,0%	0,010	11,5%
Kontroll 1; 0,08 $\mu\text{M}$	areal	10	0,08 $\mu\text{M}$	0,09 $\mu\text{M}$	0,08 $\mu\text{M}$	-0,3%	0,005	6,5%
Kontroll 2; 0,25 $\mu\text{M}$	høyde	20	0,25 $\mu\text{M}$	0,21 $\mu\text{M}$	0,28 $\mu\text{M}$	-0,8%	0,017	6,7%
Kontroll 2; 0,25 $\mu\text{M}$	areal	20	0,25 $\mu\text{M}$	0,21 $\mu\text{M}$	0,28 $\mu\text{M}$	0,0%	0,017	7,0%
Kontroll 3; 2,50 $\mu\text{M}$	høyde	10	2,49 $\mu\text{M}$	2,25 $\mu\text{M}$	2,64 $\mu\text{M}$	-0,4%	0,113	4,5%
Kontroll 3; 2,50 $\mu\text{M}$	areal	10	2,54 $\mu\text{M}$	2,22 $\mu\text{M}$	2,69 $\mu\text{M}$	1,1%	0,135	5,3%



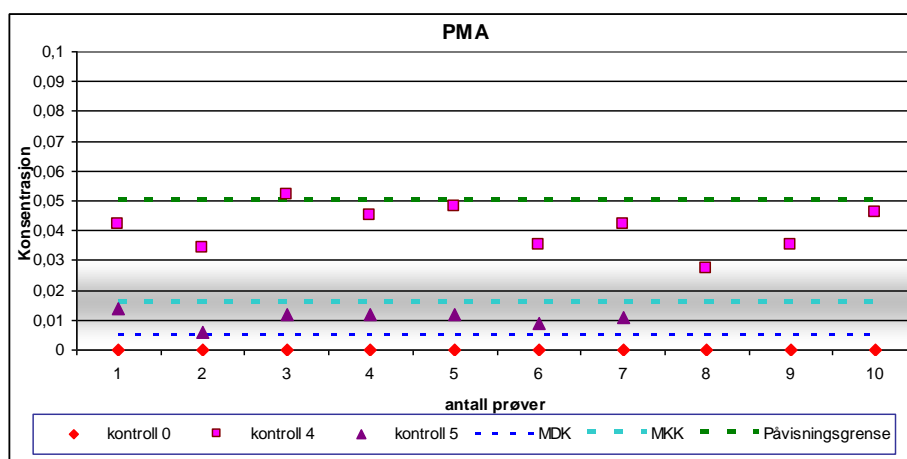
Figur 7-9 Plott av MDEA kontroll 0, 1 og 2, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



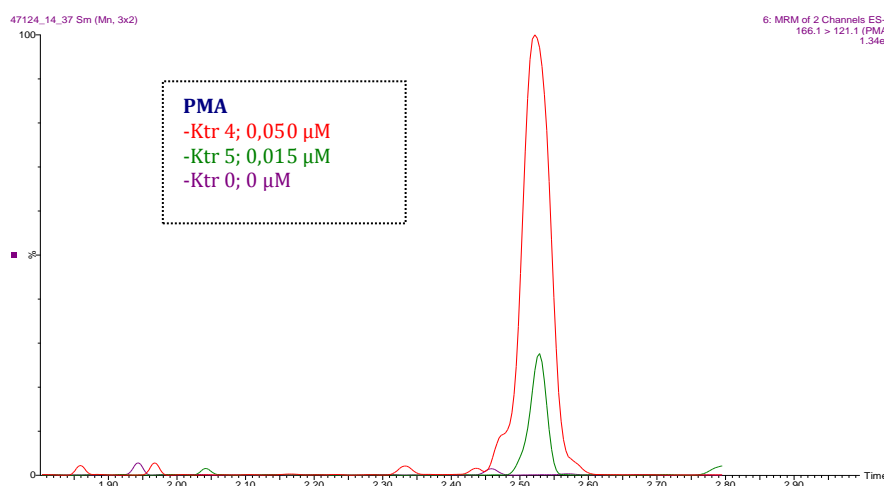
Figur 7-10 Kromatogram av MDEA, der kontroll 0, 1 og 2 er lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Tabell 7-6 Presisjon og riktighet for PMA

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0µM			0%		
Kontroll 5; 0,015 µM	høyde	7	0,011 µM	0,006 µM	0,014 µM	-27,0%	0,0026	24,0%
Kontroll 5; 0,015 µM	areal	7	0,010 µM	0,008 µM	0,012 µM	-32,0%	0,0016	15,8%
Kontroll 4; 0,05 µM	høyde	20	0,039 µM	0,027 µM	0,052 µM	-21,8%	0,009	21,8%
Kontroll 4; 0,05 µM	areal	20	0,038 µM	0,027 µM	0,050 µM	-24,5%	0,007	18,5%
Kontroll 3; 1,00 µM	høyde	10	0,807 µM	0,779 µM	0,851 µM	-19,3%	0,027	3,3%
Kontroll 3; 1,00 µM	areal	10	0,802 µM	0,768 µM	0,851 µM	-19,8%	0,026	3,2%



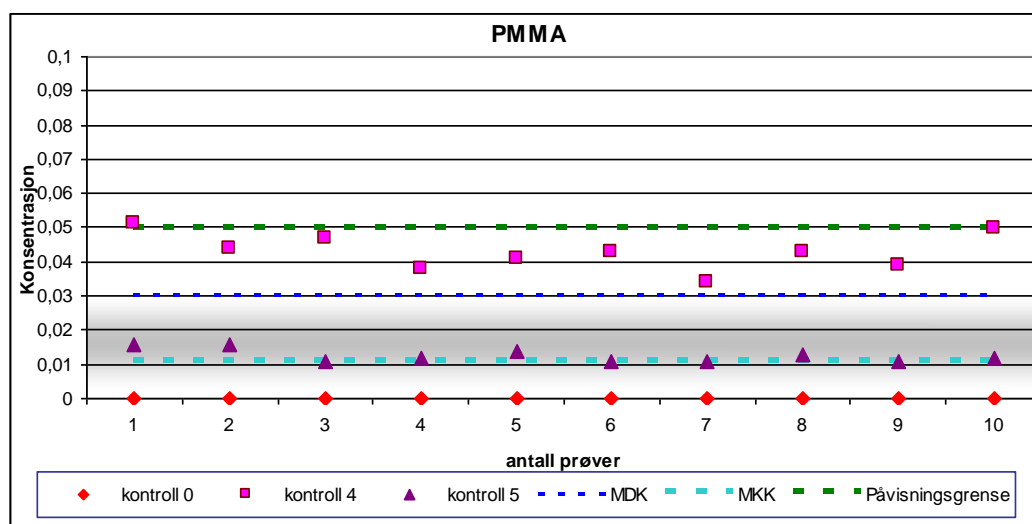
Figur 7-11 Plott av PMA kontroll 0, 4 og 5, sammen med påvisningsrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



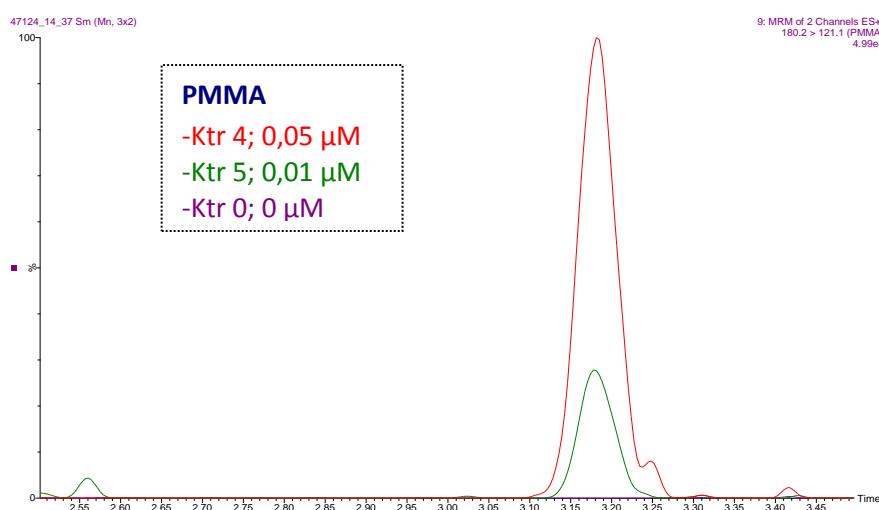
Figur 7-12 Kromatogram av PMA, der kontroll 0, 4 og 5 er lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Tabell 7-7 Presisjon og riktighet for PMMA.

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0µM			0 %		
Kontroll 5; 0,015 µM	høyde	10	0,013 µM	0,011 µM	0,016 µM	-15,3%	0,0020	15,8%
Kontroll 5; 0,015 µM	areal	10	0,012 µM	0,011 µM	0,014 µM	-18,0%	0,0011	8,6%
Kontroll 4; 0,050 µM	høyde	20	0,042 µM	0,034 µM	0,051 µM	-16,0%	0,0046	11,1%
Kontroll 4; 0,050 µM	areal	20	0,041 µM	0,035 µM	0,050 µM	-17,3%	0,005	10,9%
Kontroll 3; 1,00 µM	høyde	10	0,815 µM	0,757 µM	0,846 µM	-18,5%	0,027	3,3%
Kontroll 3; 1,00 µM	areal	10	0,805 µM	0,720 µM	0,856 µM	-19,5%	0,045	5,6%



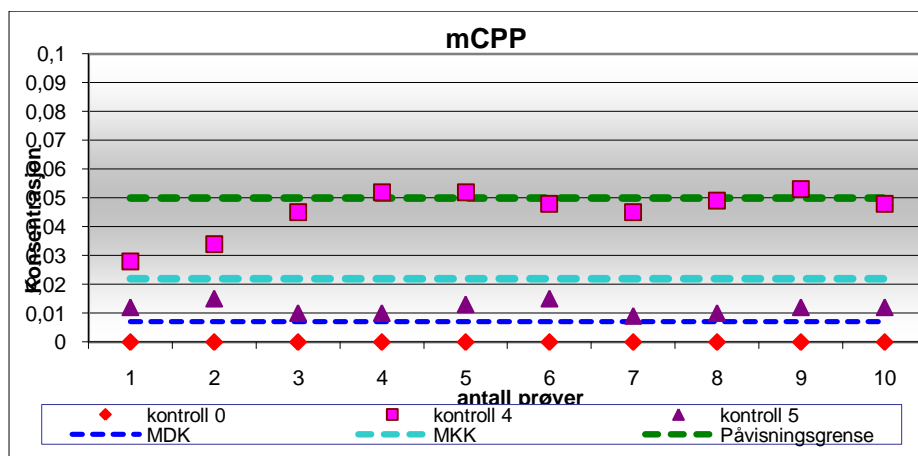
Figur 7-13 Plott av PMMA kontroll 0, 4 og 5, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



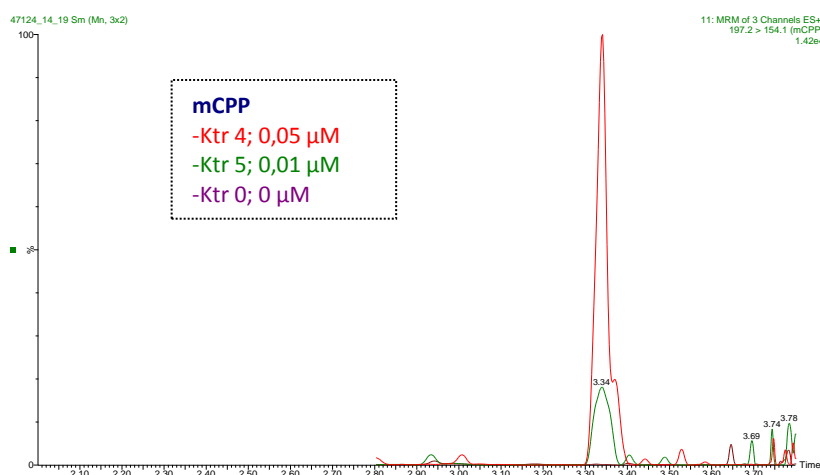
Figur 7-14 Kromatogram av PMMA, der kontroll 0, 4 og 5 er lagt over hverandre for å sammenligne topper.

Tabell 7-8 Presisjon og riktighet for mCPP.

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0 $\mu\text{M}$			0%		
Kontroll 5; 0,015 $\mu\text{M}$	høyde	10	0,014 $\mu\text{M}$	0,008 $\mu\text{M}$	0,020 $\mu\text{M}$	-7,5%	0,0053	38,0%
Kontroll 5; 0,015 $\mu\text{M}$	areal	10	0,012 $\mu\text{M}$	0,009 $\mu\text{M}$	0,015 $\mu\text{M}$	-21,3%	0,0022	18,8%
Kontroll 4; 0,05 $\mu\text{M}$	høyde	20	0,057 $\mu\text{M}$	0,040 $\mu\text{M}$	0,080 $\mu\text{M}$	-14,2%	0,0099	17,3%
Kontroll 4; 0,05 $\mu\text{M}$	areal	20	0,048 $\mu\text{M}$	0,028 $\mu\text{M}$	0,071 $\mu\text{M}$	-3,8%	0,011	23,6%
Kontroll 3; 1,00 $\mu\text{M}$	høyde	10	1,024 $\mu\text{M}$	0,897 $\mu\text{M}$	1,181 $\mu\text{M}$	1,4%	0,071	6,9%
Kontroll 3; 1,00 $\mu\text{M}$	areal	10	0,989 $\mu\text{M}$	1,045 $\mu\text{M}$	0,917 $\mu\text{M}$	-1,1%	0,052	5,2%



Figur 7-15 Plott av mCPP kontroll 0, 4 og 5, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.

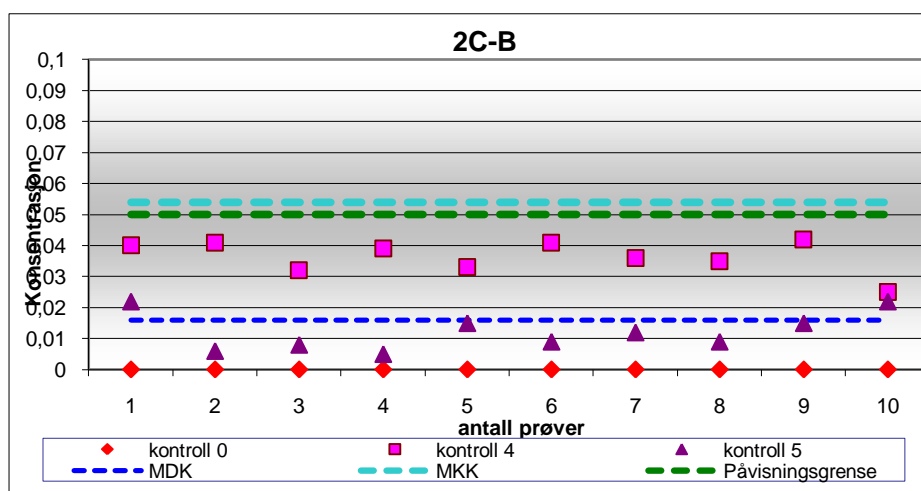


Figur 7-16 Kromatogram av mCPP, der kontroll 0, 4 og 5 er lagt over hverandre, for å sammenligne toppene.

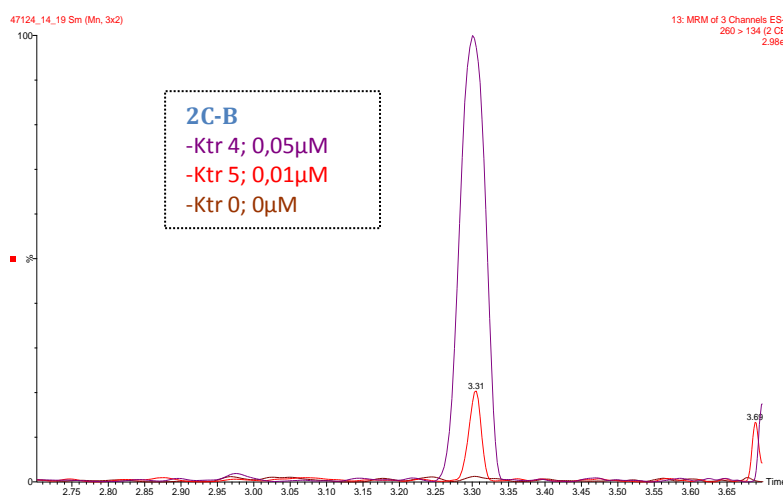


Tabell 7-9 Presisjon og riktighet for 2C-B.

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0µM			0%		
Kontroll 5; 0,015 µM	høyde	10	0,014 µM	0,009 µM	0,018 µM	-9,2%	0,0030	21,8%
Kontroll 5; 0,015 µM	areal	10	0,012 µM	0,005 µM	0,022 µM	-18,0%	0,0052	43,7%
Kontroll 4; 0,05 µM	høyde	20	0,045 µM	0,030 µM	0,074 µM	-10,8%	0,0098	21,9%
Kontroll 4; 0,05 µM	areal	20	0,038 µM	0,025 µM	0,051 µM	-24,0%	0,011	14,5%
Kontroll 3; 1,00 µM	høyde	10	0,828 µM	0,693 µM	0,996 µM	-17,2%	0,078	9,5%
Kontroll 3; 1,00 µM	areal	10	0,802 µM	0,752 µM	0,847 µM	-19,8%	0,034	4,2%



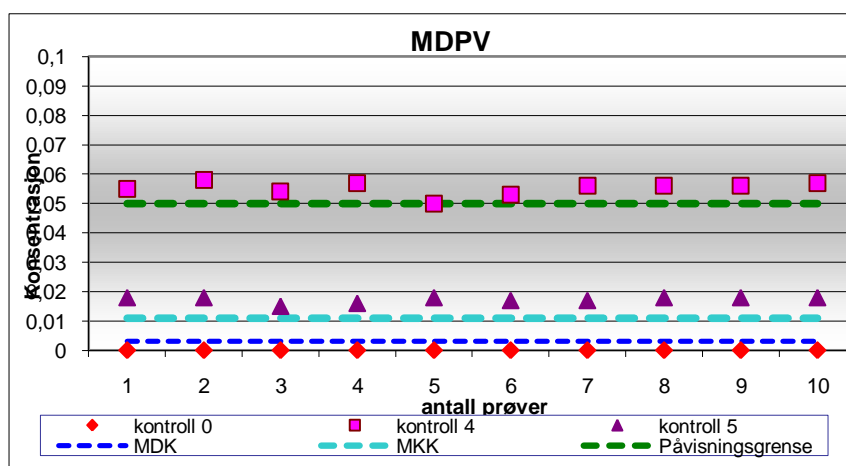
Figur 7-17 Plott av 2C-B kontroll 0, 4 og 5, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



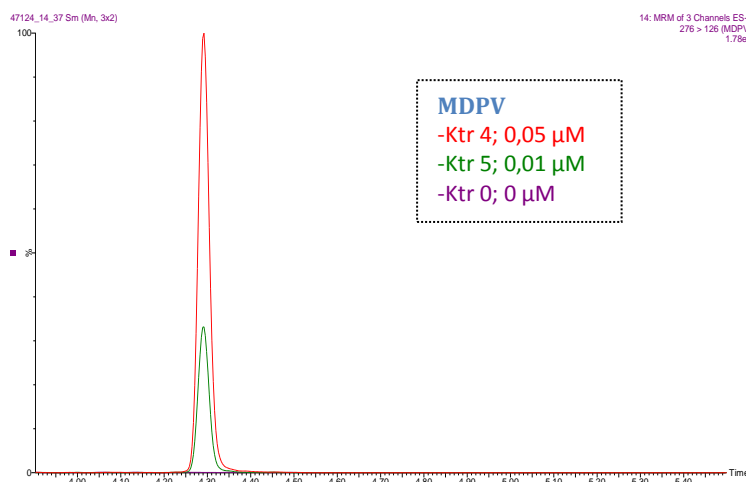
Figur 7-18 Kromatogram av 2C-B, der kontroll 0, 4 og 5 er lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Tabell 7-10 Presisjon og riktighet for MDPV

Konsentrasjon	Areal/høyde	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0		10	0 µM			0%		
Kontroll 5; 0,015 µM	høyde	10	0,017 µM	0,012 µM	0,018 µM	11,3%	0,0019	11,7%
Kontroll 5; 0,015 µM	areal	10	0,017 µM	0,015 µM	0,018 µM	15,3%	0,0011	6,2%
Kontroll 4; 0,050 µM	høyde	20	0,054 µM	0,030 µM	0,058 µM	7,9%	0,0061	11,3%
Kontroll 4; 0,050 µM	areal	20	0,056 µM	0,027 µM	0,061 µM	11,2%	0,0072	12,9%
Kontroll 3; 1,00 µM	høyde	10	1,078 µM	0,973 µM	1,170 µM	7,8%	0,056	5,2%
Kontroll 3; 1,00 µM	areal	10	1,113 µM	1,037 µM	1,196 µM	11,3%	0,046	4,1%



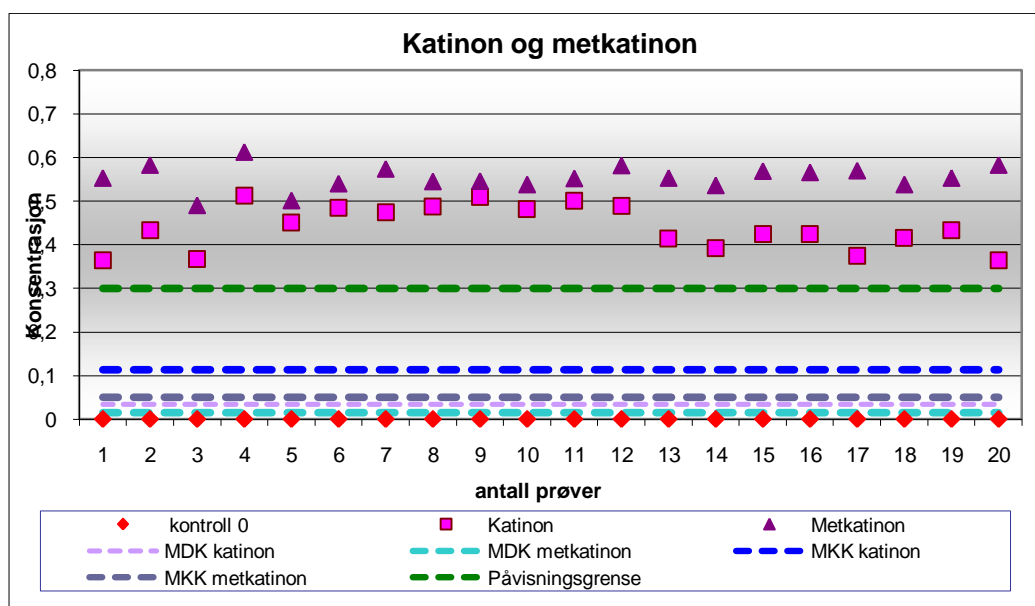
Figur 7-19 Plott av MDPV kontroll 0, 4 og 5, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



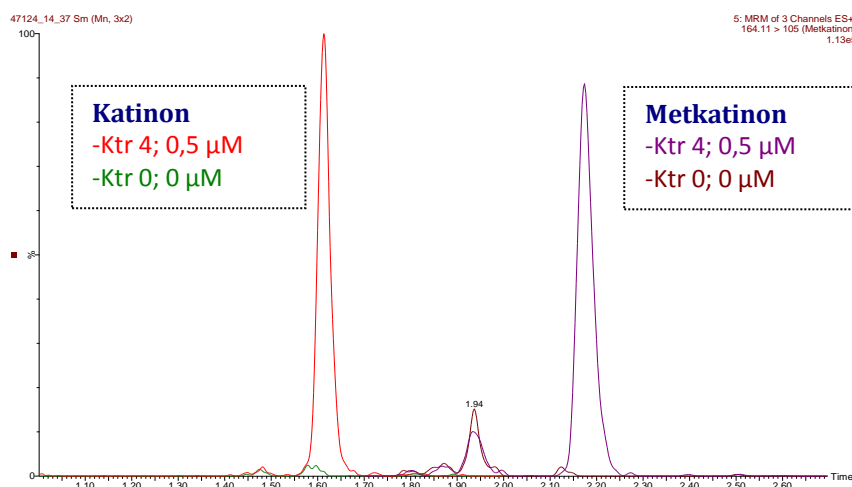
Figur 7-20 Kromatogram av MDPV, kontroll 0, 4 og 5 er lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Tabell 7-11 Presisjon og riktighet for katinon og metkatinon

Kons.	Areal/høyde	Komponent	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0			10	0 µM			0%		
Kontroll 4; 0,5 µM	høyde	Katinon	20	0,41 µM	0,37 µM	0,54 µM	-17,3%	0,036	8,7%
		Metkatinon	20	0,55 µM	0,51 µM	0,59 µM	10,2%	0,028	5,1%
Kontroll 4; 0,5 µM	areal	Katinon	20	0,44 µM	0,37 µM	0,51 µM	-11,1%	0,050	11,3%
		Metkatinon	20	0,55 µM	0,49 µM	0,61 µM	10,9%	0,028	5,1%
Kontroll 6; 5,0 µM	høyde	Katinon	10	3,74 µM	3,44 µM	4,08 µM	-24,5%	0,208	5,5%
		Metkatinon	10	5,29 µM	5,07 µM	5,77 µM	5,9%	0,210	3,9%
Kontroll 6; 5,0 µM	areal	Katinon	10	3,76 µM	3,54 µM	4,07 µM	-24,1%	0,148	3,9%
		Metkatinon	10	5,27 µM	5,04 µM	5,57 µM	5,4%	0,161	3,0%



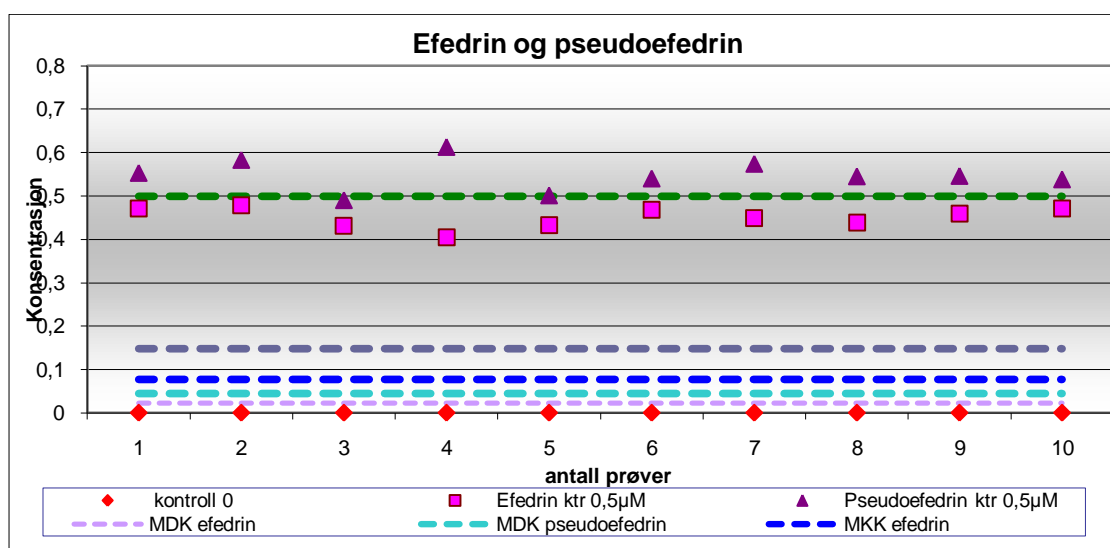
Figur 7-21 Plott av katinon og metkatinon kontroll 4, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



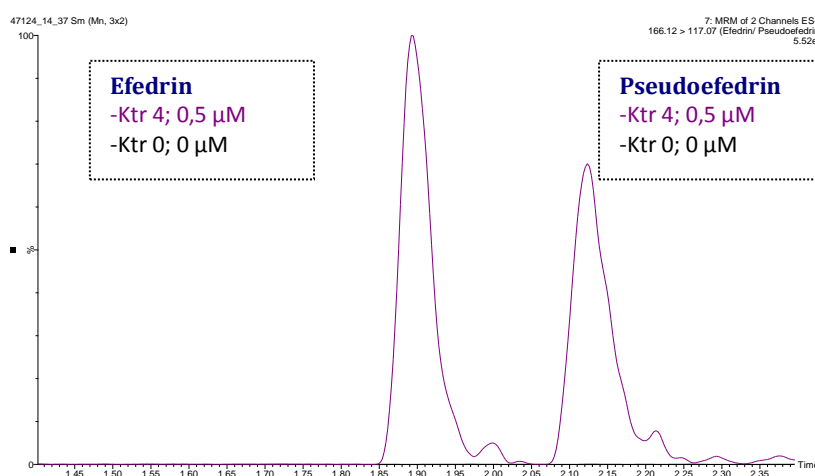
Figur 7-22 Kromatogram av katinon og metkatinon, kontroll 0 og 4 lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Tabell 7-12 Presisjon og riktighet for efedrin og pseudoefedrin

Kons.	Areal/høyde	Komponent	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0			10	0 $\mu\text{M}$			0%		
Kontroll 5 0,5 $\mu\text{M}$	høyde	Efedrin	10	0,47 $\mu\text{M}$	0,40 $\mu\text{M}$	0,56 $\mu\text{M}$	-7,0%	0,050	10,8%
		Pseudoefedrin	10	0,48 $\mu\text{M}$	0,41 $\mu\text{M}$	0,58 $\mu\text{M}$	-3,4%	0,050	10,3%
Kontroll 5 0,5 $\mu\text{M}$	areal	Efedrin	10	0,45 $\mu\text{M}$	0,41 $\mu\text{M}$	0,48 $\mu\text{M}$	-9,9%	0,023	5,2%
		Pseudoefedrin	10	0,55 $\mu\text{M}$	0,43 $\mu\text{M}$	0,59 $\mu\text{M}$	0,4%	0,050	9,9%
Kontroll 6 5,0 $\mu\text{M}$	høyde	Efedrin	10	4,52 $\mu\text{M}$	3,98 $\mu\text{M}$	5,12 $\mu\text{M}$	-9,5%	0,321	7,1%
		Pseudoefedrin	10	5,30 $\mu\text{M}$	4,65 $\mu\text{M}$	5,54 $\mu\text{M}$	6,0%	0,264	4,9%
Kontroll 6 5,0 $\mu\text{M}$	areal	Efedrin	10	4,48 $\mu\text{M}$	4,11 $\mu\text{M}$	4,73 $\mu\text{M}$	-10,8%	0,249	5,6%
		Pseudoefedrin	10	5,34 $\mu\text{M}$	4,34 $\mu\text{M}$	5,76 $\mu\text{M}$	6,7%	0,445	8,3%



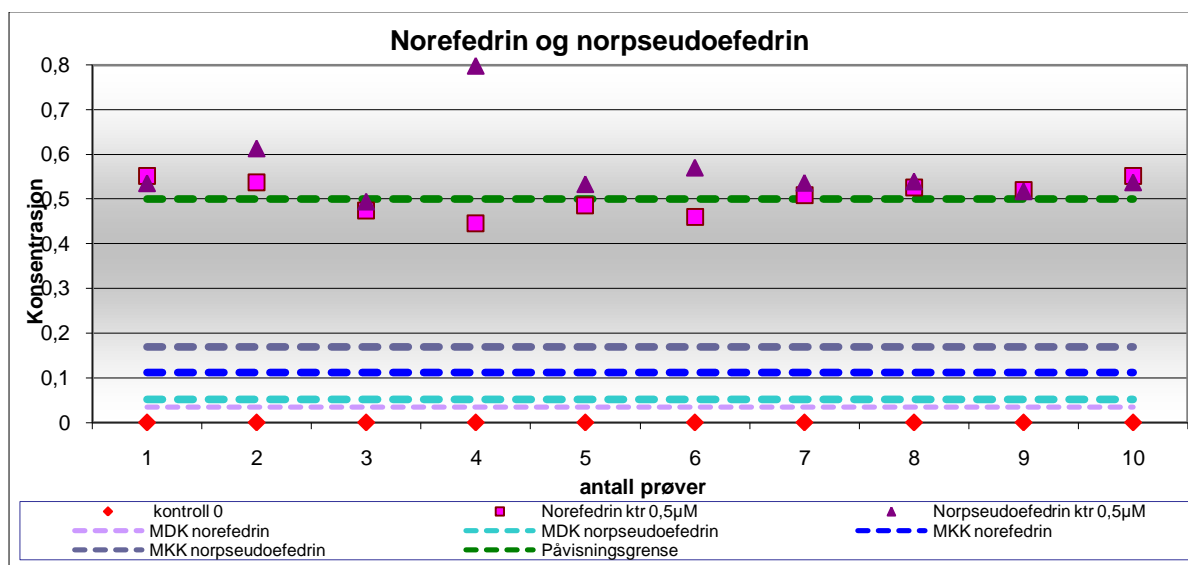
Figur 7-23 Plott av efedrin og pseudoefedrin kontroll 5, sammen med påvisningsgrense og beregnet MDK og MKK fra areal resultater.



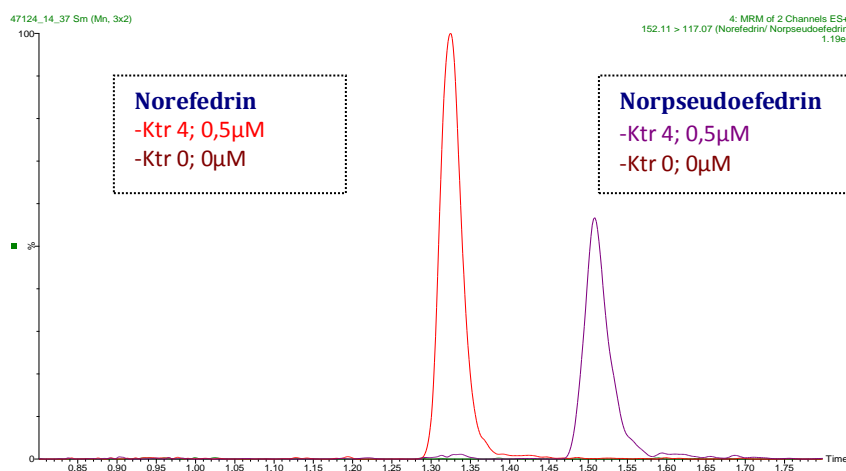
Figur 7-24 Kromatogram av efedrin og pseudoefedrin, der kontroll 0 og 5 er lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

Tabell 7-13 Presisjon og riktighet for norefedrin og norpseudofedrin

Kons.	Areal/høyde	Komponent	N	Gj.snitt	Minst verdi	Størst verdi	Avvik fra teoretisk	Standard avvik	RSD
Kontroll 0			10	0 $\mu$ M			0%		
Kontroll 4; 0,5 $\mu$ M	høyde	Norefedrin	10	0,52 $\mu$ M	0,45 $\mu$ M	0,57 $\mu$ M	3,3%	0,042	8,1%
		Norpseudofedrin	10	0,56 $\mu$ M	0,49 $\mu$ M	0,63 $\mu$ M	12,6%	0,044	7,7%
Kontroll 4; 0,5 $\mu$ M	areal	Norefedrin	10	0,51 $\mu$ M	0,45 $\mu$ M	0,55 $\mu$ M	1,2%	0,038	7,5%
		Norpseudofedrin	10	0,56 $\mu$ M	0,49 $\mu$ M	0,80 $\mu$ M	12,8%	0,063	11,2%
Kontroll 6; 5,0 $\mu$ M	høyde	Norefedrin	10	4,68 $\mu$ M	4,46 $\mu$ M	5,07 $\mu$ M	-6,4%	0,188	4,0%
		Norpseudofedrin	10	5,20 $\mu$ M	4,80 $\mu$ M	5,58 $\mu$ M	4,0%	0,217	4,2%
Kontroll 6; 5,0 $\mu$ M	areal	Norefedrin	10	4,70 $\mu$ M	4,40 $\mu$ M	5,10 $\mu$ M	-6,1%	0,203	4,3%
		Norpseudofedrin	10	5,27 $\mu$ M	4,93 $\mu$ M	5,57 $\mu$ M	5,4%	0,199	3,8%



Figur 7-25 Plott av norefedrin og norpseudofedrin kontroll 0 og 4, sammen med påvisningsgrense og MDK og MKK fra areal resultater.



Figur 7-26 Kromatogram av norefedrin og norpseudofedrin, kontroll 0 og 4 er lagt over hverandre for å sammenligne toppene.

## 7.5 Spesifisitet

Tabell 7-14 Retensjonstid og MH+ (ES+) ioner for flere legemidler og rusmidler, sortert etter økende retensjonstid. Komponenter som er med i metoden er i satt i bokser. Tabell hentet fra [26]

Analytt	RT (min.)	MH+
Teofyllin	0,65	181
Paracetamol	0,77	152
Morfin-3-glucuronid	0,9	462
Normorfin	0,95	272
Morfin-6-glucuronid	1,04	462
<b>Benzoylcegonin-d8</b>	<b>1,12</b>	<b>298</b>
<b>Benzoylcegonin</b>	<b>1,14</b>	<b>290</b>
Fenylpropanolamin	1,23	152
7-Aminonitrazepam	1,28	252
7-Aminoklonazepam	1,3	286
Katin	1,39	152
Lamotrigin	1,45	256
Norkodein	1,48	286
7-Aminoflunitrazepam	1,53	284
<b>Morfin-d6</b>	<b>1,54</b>	<b>292</b>
<b>Morfin</b>	<b>1,57</b>	<b>286</b>
Hydromorfon	1,58	286
Efedrin	1,66	166
2-oxo-3-OH-LSD	1,87	356
Oksymorfon	1,89	302
2-oxo-3-OH-LAMPA	1,92	356
Norbuprenofin-glucuronid	2,01	590
MDA	2,05	180
<b>6-mam-d6</b>	<b>2,14</b>	<b>334</b>
<b>6-mam</b>	<b>2,16</b>	<b>328</b>
Amfetamin	2,2	136
Moklobemid	2,21	269
Ketobemidon	2,37	248
<b>Kodein-d6</b>	<b>2,44</b>	<b>306</b>
<b>Kodein</b>	<b>2,48</b>	<b>300</b>
MDMA	2,53	194
Hydrokodon	2,54	300
Stryknin	2,55	335
Amisulprid	2,55	370
Stryknin	2,55	335
Nitrazepam	2,59	282
Zopiklon	2,62	389
Dihydrokodein	2,63	302
Klonazepam	2,65	316
Karbamazepin	2,67	237
Metamfetamin	2,74	150
Flunitrazepam	2,81	314
LSD-d3	2,87	327
<b>Oksykodon-d6</b>	<b>2,88</b>	<b>322</b>
<b>Folkodin</b>	<b>2,88</b>	<b>399</b>
LSD	2,89	324
<b>Oksykodon</b>	<b>2,92</b>	<b>316</b>
MDEA	3,13	208
<b>Etylmorfin</b>	<b>3,15</b>	<b>314</b>
Oxazepam	3,18	287

Analytt	RT (min.)	MH+
Karisoprodol	3,18	261
Ketamin	3,2	238
Zolpidem	3,28	308
Alprazolam	3,32	309
Acetylkodein	3,39	342
N-desmetyldiazepam	3,58	271
Reboxetin	3,63	314
Petidin	3,63	248
Norbuprenorfin-d3	3,66	417
Norbuprenorfin	3,67	414
<b>Kokain-d3</b>	<b>3,68</b>	<b>307</b>
Diazepam	3,69	285
<b>Kokain</b>	<b>3,69</b>	<b>304</b>
Midazolam	3,71	326
Tramadol	3,74	264
Olanzapin	3,78	313
Risperidon	3,78	411
Mirtazapin	3,82	266
Citalopram	3,87	325
Quetiapin	3,89	384
Haloperidol	3,93	376
Fluvoksamin	3,94	319
Paroxetin	3,94	330
Klozapin	3,95	327
Venlafaxin	3,96	278
Buprenofin-glucuronid	3,96	644
Fentanyl	4,06	337
Fluoksetin	4,09	310
Doxepin	4,13	280
Mianserin	4,14	265
Orfenadrin	4,15	270
Nortriptylin	4,17	264
Dextropropoxyfen	4,19	340
Nefazodon	4,21	470
Perfenazin	4,21	404
Prometazin	4,21	285
Dixyrazin	4,23	428
Zuclopentixol	4,25	401
Metadon	4,26	310
Flupentixol	4,27	435
Sertalin	4,31	306
Levomopromazin	4,31	329
Amitriptylin	4,33	278
Alimemazin	4,33	299
Klorpromazin	4,36	319
Klomipramin	4,39	315
Trimipramin	4,41	295
Klorprotixen	4,42	316
Buprenorfin	4,56	468